

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 901**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2008 PCT/EP2008/000081**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2008 WO08083949**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2008 E 08701020 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2101823**

54 Título: **Anticuerpo codificado por un ARN**

30 Prioridad:

09.01.2007 DE 102007001370

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HOERR, INGMAR;
 PROBST, JOCHEN y
 PASCOLO, STEVE**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 614 901 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

Anticuerpo codificado por un ARN

5 La presente solicitud describe un ARNm codificador de anticuerpos, modificado o no modificado, para su uso en la preparación de una composición farmacéutica, en particular como vacuna pasiva, para el tratamiento de tumores y enfermedades cancerosas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunes, por ejemplo también en la terapia génica.

10 Los casos de tumores y enfermedades cancerosas, junto con las enfermedades cardiovasculares e infecciosas, son una de las causas de muerte más frecuentes en las sociedades modernas y normalmente están asociados con unos gastos considerables durante la terapia y las medidas de rehabilitación posteriores. El tratamiento de tumores y enfermedades cancerosas depende en gran medida, por ejemplo, de la naturaleza del tumor existente y en la actualidad se lleva a cabo convencionalmente mediante el uso de radioterapia o quimioterapia, además de intervenciones invasivas. Sin embargo, estas terapias constituyen una carga excepcional para el sistema inmunológico y en algunos casos solo pueden ser empleadas en limitada medida. Además, estas formas de terapia normalmente requieren largas pausas entre los tratamientos individuales para la regeneración del sistema inmunológico. En los últimos años, junto con estos "métodos convencionales" han surgido en particular programas de biología molecular como técnicas prometedoras para el tratamiento o para ayudar en estas terapias.

20 Un ejemplo de estos métodos de biología molecular comprende el uso de anticuerpos o inmunoglobulinas como efectores esenciales del sistema inmunológico. Los anticuerpos o inmunoglobulinas pueden ser generados bien *in vitro*, empleando métodos de biología molecular conocidos, bien por el sistema inmunológico del propio organismo a tratar. El sistema inmunológico de los vertebrados superiores tiene dos funciones independientes del sistema inmunológico: el sistema inmunológico innato, que reacciona de forma no específica frente a patógenos (por ejemplo fagocitosis mediada por macrófagos) y el sistema inmunológico adaptativo, que reacciona específicamente frente a patógenos mediante células efectoras especializadas (por ejemplo células B y T). Los antígenos o inmunoglobulinas segregados por células plasmáticas durante una respuesta inmunológica forman parte de dicho sistema inmunológico adaptativo. Junto con el sistema del complemento, constituyen la rama humoral de la respuesta inmunológica.

30 Junto con su importancia esencial para el sistema inmunológico de los vertebrados superiores, precisamente debido a su alta afinidad y especificidad por un antígeno particular, los anticuerpos son un medio excepcional tanto en la investigación bioquímica y de biología molecular como en diagnóstico y aplicaciones médicas. Los anticuerpos se pueden unir específicamente a sus estructuras diana (por ejemplo antígenos, que esencialmente comprenden proteínas, péptidos, en algunos casos lípidos, hidratos de carbono, etc.) y de este modo bloquear (inhibir) o, en caso apropiado, marcar las mismas. Además, pueden activar el sistema inmunológico por medio de su parte Fc, con lo que las células marcadas son destruidas. Actualmente se pueden encontrar más de 100 anticuerpos terapéuticos en estudios clínicos. Los anticuerpos que pueden emplearse en la terapia del cáncer representan, con mucho, el papel más importante en este contexto. La mayor parte de los anticuerpos preparados para esto actualmente son anticuerpos monoclonales procedentes originalmente de ratones, por ejemplo. Con el fin de prevenir una reacción inmunológica contra estos anticuerpos monoclonales, para la terapia actualmente se emplean sobre todo anticuerpos humanizados o humanos (véase David Male; "Immunologie auf einen Blick [Inmunología de un Vistazo]", 1ª edición alemana, 2005, Editorial Elsevier-Urban & Fischer; Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport y Mark Shlomchik, Immunobiology, 5ª edición, 2001, Garland Publishing; Disertación de Christian Klein, Monoklonale Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente gegen sekundäre Arzneipflanzenmetabolite [Anticuerpos Monoclonales y Fragmentos de Anticuerpos Recombinantes contra Metabolitos de Plantas Medicinales Secundarios], 2004; Andreas Schmiel y Stefan Dübel, Rekombinante Antikörper & Phagen-Display [Anticuerpo Recombinante y Despliegue en Fagos], 2004, Molekulare Biotechnologie [Biotecnología Molecular] (Wiley-VCH)).

50 Los anticuerpos se pueden asignar en general al grupo de las inmunoglobulinas. Estas inmunoglobulinas se pueden diferenciar a su vez en cinco clases principales de inmunoglobulinas en función de su cadena pesada, los anticuerpos IgM (μ), IgD (δ), IgG (γ), IgA (α) e IgE (ϵ), constituyendo los anticuerpos IgG la proporción más grande. Estas inmunoglobulinas se pueden diferenciar además en los isotipos κ y λ en función de sus cadenas ligeras.

55 A pesar de su diferente especificidad, los anticuerpos son estructuralmente bastante similares en su construcción. Los anticuerpos IgG normalmente están formados por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas proteínicas pesadas que están unidas entre sí por puentes disulfuro. La cadena ligera comprende el dominio variable N-terminal V_L y el dominio constante C-terminal C_L . La cadena pesada de un anticuerpo IgG

se puede dividir en un dominio variable N-terminal V_H y tres dominios constantes C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} (véase la Figura 1). Si bien la secuencia de aminoácidos es en gran medida la misma en la región de los dominios constantes, dentro de los dominios variables normalmente se encuentran amplias diferencias de secuencia.

5 El repertorio de anticuerpos de un humano comprende aproximadamente al menos 10^{11} especificidades de anticuerpo diferentes. En los vertebrados superiores, la formación de anticuerpos se produce naturalmente en el sistema inmunológico por recombinación somática. En este contexto, de hecho, un organismo es teóricamente capaz de generar un anticuerpo con una especificidad apropiada contra cualquier antígeno. Sin embargo, si cada uno de estos anticuerpos tuviera que ser codificado por un gen endógeno, romperían el genoma humano. En lugar de esto, en los humanos, los genes de anticuerpo están compuestos por un gran número de segmentos génicos individuales. La parte del gen de anticuerpo que codifica la región variable de una cadena ligera está formada por un segmento de gen V y un segmento de gen J. En este contexto existen numerosos segmentos V y J diferentes, que se pueden combinar entre sí prácticamente de cualquier modo deseado. En este contexto, la región variable de una cadena pesada está compuesta por tres segmentos génicos diferentes. Además de los segmentos V y J, aquí también se encuentran segmentos D adicionales. Los segmentos V_H , D_H y J_H también se pueden combinar entre sí prácticamente de cualquier modo deseado para formar la región variable de la cadena pesada (véase la Figura 2). El mecanismo mediante el cual los diversos segmentos génicos se combinan para formar genes de anticuerpo completos se denomina reordenación de inmunoglobulina o recombinación somática. Tiene lugar exclusivamente en los linfocitos T en determinados momentos del desarrollo celular.

20 Además de la reordenación génica pura, también existen otros mecanismos para aumentar la diversidad de anticuerpos. En este contexto se deben mencionar en primer lugar dos mecanismos que van acompañados de recombinación somática: La diversidad de unión describe en este contexto la unión imprecisa controlada entre sí de los segmentos de gen reordenados, como resultado de lo cual se producen eliminaciones e inserciones aleatorias de nucleótidos en los sitios de segmentación. Otra diversidad combinatoria resulta de la posibilidad de combinar una cadena ligera reordenada particular con una cadena pesada reordenada particular. Por último, la diversidad de anticuerpos también se incrementa adicionalmente después de una reordenación con éxito y activación posterior de células B, ya que se produce una maduración de afinidad de anticuerpos debido a una mayor tasa de mutación en la región de las regiones variables de células B activadas (hipermutación somática).

30 Además de la formación de anticuerpos que tiene lugar de forma natural por el sistema inmunológico del organismo particular, también es posible generar anticuerpos por métodos de biología molecular. Sin embargo, con el fin de utilizar el sistema elaborado para especificación de formación de anticuerpos y especificación de éstos para antígenos o ácidos nucleicos particulares, en la actualidad normalmente se induce la formación de anticuerpos en organismos seleccionados mediante inyección de un antígeno particular, aislándose después el antígeno del organismo para su uso posterior. En este contexto, los linfocitos B del organismo convencionalmente se purifican selectivamente y se fusionan con una célula de mieloma inmortal para formar una célula de hibridoma. Después se determinan las células que segregan los anticuerpos específicos del antígeno correspondiente por métodos de selección.

40 Además del uso de células de hibridoma, también es posible una preparación recombinante de estos anticuerpos con la especificidad deseada después de aislamiento y secuenciación. Para ello, normalmente se utilizan células que proporcionan las modificaciones postraduccionales necesarias. En base a la reacción inmunológica con formación de anticuerpos antirratón humanos en el organismo humano en caso de anticuerpos nativos producidos en ratones (o en otros huéspedes), aquí se preparan preferiblemente anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos.

45 Después de la expresión, estos anticuerpos, opcionalmente preparados mediante métodos recombinantes, se pueden emplear como agentes tanto en la investigación bioquímica y de biología molecular como en diagnóstico y en aplicaciones médicas.

50 Sin embargo, en usos médicos, en muchos casos los anticuerpos difícilmente se pueden emplear directamente, ya que normalmente solo tienen una vida media *in vivo* muy corta y, por tanto, posiblemente no pueden alcanzar de ningún modo su antígeno diana o su ácido nucleico diana. Esto requiere o bien altas concentraciones de compuesto activo del anticuerpo deseado o bien métodos alternativos adecuados para proporcionar grandes cantidades de anticuerpos *in vivo*.

55 Estos métodos incluyen, por ejemplo, métodos de medicina molecular de terapia génica y vacunación genética que, cuando se utilizan generalmente en la terapia y prevención de enfermedades, tienen efectos considerables en la práctica médica. Ambos métodos se basan en introducir ácidos nucleicos en células o en tejido del paciente y en el procesamiento posterior por las células o el tejido, respectivamente, de la información codificada por los ácidos nucleicos introducidos, es decir, la expresión de los polipéptidos deseados, por ejemplo anticuerpos, en las células o el tejido, respectivamente.

Hasta la fecha, el procedimiento convencional de los métodos de terapia génica y de vacunación genética se basa en el uso de ADN para disgregar la información genética necesaria en la célula. En este contexto se han desarrollado diversos métodos para introducir ADN en las células, por ejemplo transfección de fosfato de calcio, transfección de polipreno, fusión de protoplastos, electroporación, microinyección, lipofección y uso de cañones génicos, habiendo surgido en particular la lipofección como un método adecuado.

Otro método que ha sido propuesto en particular en el caso de los métodos de vacunación genética es el uso de virus de ADN como vehículos de ADN. Estos virus tienen la ventaja de que permiten lograr una tasa de transfección muy alta debido a sus propiedades infecciosas. Los virus utilizados están modificados genéticamente, de modo que en la célula transfectada no se forma ninguna partícula infecciosa funcional. Sin embargo, en los últimos años se ha criticado el uso de virus ADN como vehículos de ADN por el riesgo de que una recombinación de virus no activos produzca virus activos.

No obstante, el uso de ADN como agente en la terapia génica y la vacunación genética, o para la inmunización pasiva (mediante vacunas pasivas), por ejemplo mediante el uso de secuencias codificadoras para anticuerpos, también puede ser menos ventajoso desde algunos puntos de vista. El ADN solo se degrada de forma relativamente lenta en el torrente sanguíneo, de modo que, cuando se utiliza ADN (extraño) como secuencia codificadora para una proteína deseada, se puede producir la formación de anticuerpos anti-ADN, que ha sido confirmada en un modelo animal en ratones (Gilkeson *et al.*, J. Clin. Invest. 1995, 95: 1398-1402). Por tanto, la posible persistencia de ADN (extraño) en el organismo puede conducir a una hiperactivación del sistema inmunológico, lo que, como es sabido, conduce a una esplenomegalia en ratones (Montheith *et al.*, Anticancer Drug Res. 1997, 12(5): 421-432). Además, el ADN (extraño) puede interactuar con el genoma del huésped, y en particular provocar mutaciones por integración en el genoma del huésped. Por ejemplo, el ADN (extraño) introducido se puede insertar en un gen intacto, lo que representa una mutación que puede impedir o incluso inactivar por completo la función del gen endógeno. Por otro lado, estos acontecimientos de integración pueden destruir sistemas enzimáticos que son vitales para la célula, y además también existe el peligro de una transformación de la célula así modificada en un estado degenerado si la integración del ADN extraño modifica un gen decisivo para la regulación del crecimiento celular. Por consiguiente, con los métodos de terapia génica y vacunación genética, y también de inmunización pasiva, utilizados hasta la fecha no se puede excluir por completo el riesgo de desarrollo de cáncer cuando se utiliza ADN (extraño). En este contexto, la inmunización pasiva (mediante las denominadas "vacunas pasivas") se debe diferenciar estrictamente de la llamada inmunización activa. En la inmunización activa, normalmente se administra un antígeno ("vacuna activa"), tras lo cual el organismo forma anticuerpos contra dicho antígeno. Por tanto, la inmunización activa produce una inmunización permanente del organismo contra el antígeno particular, lo que puede asociarse con las desventajas arriba descritas. En cambio, en la inmunización pasiva solo se administra al organismo un antisuero o el propio anticuerpo purificado ("vacuna pasiva"). La secuencia codificadora para el anticuerpo también se puede administrar, tal como se describe más arriba, como una llamada vacuna pasiva para la inmunización pasiva.

Ivanovska *et al.* (Vaccine, vol. 24, nº 11, 2006, pp. 1830-1837) describen la vacunación basada en ADN empleando anticuerpos codificadores de ADN de interés. Describen un ADN codificador de una proteína de fusión scFv-HgA para tratar la gripe. Bakker *et al.* (Molecular Therapy, vol. 10, nº 3, 2004, pp. 411-416) describen niveles de anticuerpos alcanzables mediante vacunación con ADN. La vacunación con ADN ha sido explicada por Zeytin *et al.* (Cancer Gene Therapy, vol. 7, nº 11, 2000, pp. 1426-1436), que describen el uso de ADN codificador de un scFv anti-idiotípico de linfoma de células B. Bandbon *et al.* (Medical Hypotheses, vol. 67, nº 1, 2006, pp. 71-74) se refieren a plásmidos que codifican alérgenos y un fragmento variable de cadena simple anti-IgE como una nueva vacuna de ADN para la terapia y prevención de alergias. Kitaguchi *et al.* (International Journal of Molecular Medicine, vol. 16, nº 4, 2005, pp. 683-688) describen la vacunación con ADNc de ratones mediante un ADNc que codifica un anticuerpo anti-VHB.

Otras propuestas de la técnica se refieren a la vacunación pasiva mediante vectores de retrovirus que codifican anticuerpos. A este respecto, Khare *et al.* (Anticancer Research, vol. 22, 2002, pp. 2443-2446) describen la supresión del crecimiento tumoral mediante un vector retroviral que presenta un anticuerpo scFv dirigido contra CEA y que porta el gen inos. Los vectores retrovirales también han sido explicados por Finger *et al.* (Cancer Gene Therapy, vol. 12, nº 5, 2005, pp. 464-474). En dicho documento se describe la replicación de vectores retrovirales que median en la producción y secreción continua de productos génicos terapéuticos a partir de células cancerosas, más concretamente para expresar scFv específico de lamina o específico de células T.

Por ejemplo, Carralot *et al.* (CMLS Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 61, nº 18, 2004, pp. 2418-2424) o Pascolo *et al.* (Methods in Molecular Medicine, Vol. 127, 2006, pp. 23-40) describen la vacunación basada en antígeno con ARNm que codifica el antígeno.

En resumen, existe una demanda creciente y un interés considerable en relación con agentes adecuados para emplear anticuerpos eficazmente *in vivo*, en particular para proporcionar mayores cantidades de compuestos activos de anticuerpos *in vivo*, sin los riesgos asociados hasta ahora al uso de ADN.

5 Este objeto se logra de acuerdo con la invención mediante un ARNm (secuencia) para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas, cardiovasculares, infecciosas o autoinmunes mediante la expresión intracelular del anticuerpo codificado, codificando el ARNm (secuencia) un anticuerpo o conteniendo dicho ARNm al menos una región codificadora que codifica al menos un anticuerpo, respectivamente, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada que contienen en ambos casos dominios variables y constantes. En relación con
 10 la presente invención, un ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención incluye cualquier ARNm de este tipo que codifique un anticuerpo. Más generalmente, el ARNm para su uso de acuerdo con la presente invención (dirigido a la expresión intracelular) contiene al menos una región codificadora, codificando la o las regiones codificadoras al menos un anticuerpo. Si la molécula de ARNm de la invención contiene más de una región codificadora, la segunda, tercera, etc. región codificadora puede codificar también anticuerpos que pueden ser iguales o distintos a los de la primera región codificadora de anticuerpos. En una
 15 realización preferente, el ARNm contiene al menos dos regiones codificadoras, codificando todas ellas anticuerpos idénticos o diferentes. En otra realización de la presente invención, un ARNm puede codificar más de un anticuerpo dentro de la misma región codificadora. En resumen, el ARNm empleado por la presente invención puede ser mono-, bi- o multicistrónico, codificando al menos un anticuerpo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, teniendo ambas dominios variables y constantes.

20 El ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario, lineal o circular. El ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la presente invención está preferentemente en forma de ARNm monocatenario.

Un ARNm codificador de anticuerpos para su uso en la presente invención tiene preferiblemente una longitud de 50 a 15.000 nucleótidos, de forma especialmente preferente una longitud de 50 a 10.000 nucleótidos, de
 25 forma incluso más preferente una longitud de 500 a 10.000 nucleótidos y de forma totalmente preferente una longitud de 500 a 7.000, 500 a 5.000 o 700 a 3.000 nucleótidos.

En relación con la presente invención, los anticuerpos codificados por el ARNm se pueden seleccionar entre todos los anticuerpos, por ejemplo entre todos los anticuerpos generados por métodos recombinantes o naturales y conocidos por los expertos en la técnica anterior, en particular anticuerpos que son (o pueden ser)
 30 empleados con fines terapéuticos, para diagnosis o con fines de investigación, o que se han encontrado en caso de enfermedades particulares, por ejemplo enfermedades cancerosas, enfermedades infecciosas, etc.

En el contexto de la presente invención, en general los anticuerpos codificados por un ARNm incluyen todos los anticuerpos (arriba descritos) conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo anticuerpos naturales o anticuerpos generados en un organismo huésped mediante inmunización, anticuerpos preparados por métodos recombinantes, que han sido aislados e identificados a partir de anticuerpos naturales, o anticuerpos generados
 35 en un organismo huésped por inmunización (convencional) o han sido generados con ayuda de métodos de biología molecular, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, intracuerpos, es decir, anticuerpos expresados en células y posiblemente localizados en compartimentos celulares particulares, y fragmentos de los anticuerpos arriba mencionados. El término "anticuerpo" se ha de entender aquí en su sentido más amplio. En este contexto, los anticuerpos codificados por el ARNm comprenden una cadena ligera y una cadena pesada, teniendo ambas dominios variables y constantes. La cadena ligera comprende el dominio variable N-terminal V_L y el dominio constante C-terminal C_L . En cambio, la cadena pesada de un anticuerpo IgG se puede dividir en un dominio variable N-terminal V_H y tres dominios constantes C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} (véase la Figura 1).

45 Las moléculas de ARNm para su uso de acuerdo con la invención también se pueden preparar en base a anticuerpos policlonales o como un cóctel de ARNm codificador de anticuerpos, pueden tener carácter policlonal. En el contexto de esta invención, los anticuerpos policlonales consisten normalmente en mezclas de anticuerpos contra un antígeno o inmunógeno o epítipo de una proteína específico, que han sido generadas por inmunización de un organismo huésped, por ejemplo mamífero, es decir, animales, incluyendo bóvidos,
 50 cerdos, perros, gatos, burros, monos, incluyendo roedores, por ejemplo ratones, hámsteres, conejos, etc., y humanos. Los anticuerpos policlonales reconocen convencionalmente diferentes epítopos o regiones del mismo antígeno específico, siendo cada uno de estos epítopos a su vez capaz de generar un clon de linfocitos B que produce un anticuerpo contra dicho epítipo. A partir de estos anticuerpos policlonales o de sueros de anticuerpos obtenidos del organismo huésped se pueden obtener los anticuerpos individuales específicos
 55 contra los epítopos particulares mediante individualización en anticuerpos monoclonales. Por consiguiente, la presente descripción también proporciona ARNm que codifica un anticuerpo monoclonal obtenido mediante individualización de anticuerpos policlonales.

Por tanto, en el contexto de esta invención, los anticuerpos monoclonales son típicamente anticuerpos específicos para un antígeno o epítipo (de una proteína) particular, es decir, que se unen a este antígeno o epítipo (de una proteína) con alta afinidad, y que convencionalmente son expresados por una célula de hibridoma. En general, para preparar estos anticuerpos monoclonales, el antígeno o inmunógeno o epítipo de una proteína correspondiente se inyecta al menos una vez, pero normalmente varias veces, en un organismo huésped tal como se describe aquí, a consecuencia de lo cual el sistema inmunológico del organismo huésped, en presencia de adyuvantes adecuados, resulta estimulado preferentemente para la producción de anticuerpos por la activación de células B correspondientemente específicas. Después, los linfocitos B se purifican convencionalmente de modo selectivo a partir del bazo, u otros órganos o fluidos adecuados para ello, de un animal así inmunizado y se fusionan con una célula de mieloma inmortal para obtener la llamada célula de hibridoma. Después de aplicar métodos de selección y clonación de los hibridomas o células de hibridoma formados, se pueden determinar aquellos clones que reconocen, es decir, que expresan y segregan, anticuerpos con la especificidad deseada. Estos clones se pueden aislar y secuenciar con métodos de biología molecular conocidos. Los datos obtenidos de una secuenciación de este tipo pueden servir además en una síntesis de ácido nucleico para generar secuencias de ADN sintéticas o para rastrear una biblioteca de ADNc y para aislar los fragmentos de ADNc y generar un molde de ADN o de ácido nucleico para la síntesis *in vitro* o *in vivo* del ARNm de acuerdo con la invención que codifica un anticuerpo. En caso apropiado, el ARN contenido en los hibridomas también se puede aislar, por ejemplo por fraccionamiento, y a continuación las moléculas de ARNm de acuerdo con la invención que codifican el anticuerpo de hibridoma se pueden purificar por métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Sin embargo, las moléculas de ARNm que codifican anticuerpos monoclonales o policlonales no humanos, por ejemplo anticuerpos monoclonales murinos o anticuerpos monoclonales de otros organismos huésped o células de hibridoma no humanos tal como se describen aquí, solo son limitadamente adecuadas para el uso terapéutico en humanos, ya que en el propio organismo humano éstas provocan normalmente una reacción inmunológica con formación de anti-anticuerpos humanos dirigidos contra estos anticuerpos huésped no humanos. Como resultado, en general estos anticuerpos monoclonales o policlonales no humanos solo pueden ser administrados a una persona una única vez. Para evitar este problema, de acuerdo con la invención también se proporcionan moléculas de ARNm que codifican anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos.

En el contexto de la presente invención, los anticuerpos quiméricos preferentemente son anticuerpos donde los dominios constantes de un anticuerpo tal como se describe aquí han sido sustituidos por secuencias humanas. Preferentemente, los anticuerpos quiméricos se forman a partir de anticuerpos monoclonales o policlonales tal como se describen aquí.

En el contexto de la presente invención, los anticuerpos humanizados son anticuerpos donde los dominios constantes y variables arriba descritos de los anticuerpos monoclonales o policlonales no humanos, a excepción de las regiones hipervariables, han sido sustituidos por secuencias humanas.

En el contexto de la presente invención también se pueden utilizar moléculas de ARNm que codifican anticuerpos humanos, es decir, anticuerpos que tienen secuencias completamente humanas, tanto en los dominios constantes como en los dominios variables, incluyendo las regiones hipervariables. Estas moléculas de ARNm que codifican anticuerpos humanos se pueden aislar de tejido humano o pueden proceder de organismos huésped inmunizados tal como se describen aquí, por ejemplo ratones, que en este caso son transgénicos para el locus del gen IgG humano. Además, se proporcionan moléculas de ARNm que codifican anticuerpos humanos y que han sido aisladas por identificación de fagos (*phage display*) y clonadas con ayuda de métodos de biología molecular (véase más abajo).

Los anticuerpos codificados por ARNm incluyen preferentemente los llamados anticuerpos de longitud completa, es decir, anticuerpos que comprenden tanto la cadena pesada completa como la cadena ligera completa, tal como se describen más arriba.

En el contexto de la presente invención también se pueden proporcionar ARNm que codifican alternativamente uno o más fragmentos de anticuerpo de los anticuerpos arriba descritos, en lugar del anticuerpo de longitud completa correspondiente. Ejemplos de estos fragmentos de anticuerpo son cualquier fragmento de anticuerpo conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo Fab, Fab', F(ab')₂ y Fabc, fragmentos de los anticuerpos arriba mencionados, etc. En la Figura 4 se muestra un diagrama de la estructura de fragmentos de anticuerpo de este tipo a modo de ejemplo.

Por ejemplo, un fragmento Fab (*fragment antigen binding* - fragmento de unión al antígeno) comprende normalmente el dominio variable y un dominio constante de una cadena ligera y una cadena pesada, por ejemplo los dominios C_{H1} y V_H de la cadena pesada y la cadena ligera completa. Las dos cadenas están unidas entre sí por un puente disulfuro. Por tanto, un fragmento Fab contiene convencionalmente la región de unión de antígeno completa del anticuerpo original y normalmente tiene la misma afinidad por el antígeno, el

inmunógeno o un epítipo de una proteína. Los fragmentos de anticuerpo, tal como se ha descrito también más arriba en relación con los anticuerpos, se pueden preparar con ayuda de métodos de biología molecular. En este contexto, las secuencias de ADN que codifican los diversos dominios del fragmento de anticuerpo se clonan en un vector de expresión específico. El ARNm que codifica estos fragmentos de anticuerpo se puede

 5 expresar después, por ejemplo en células huésped adecuadas. Las células huésped adecuadas en relación con la presente invención incluyen, entre otras, *E. coli*, levaduras, plantas transgénicas o células de mamífero, etc. (véase más abajo). En cambio, el fragmento scFv (*single chain variable fragment* - fragmento variable de cadena simple) (no reivindicado) comprende normalmente el dominio variable de la cadena ligera y de la cadena pesada, que están unidas entre sí por un conector polipéptido artificial. En la clonación de estos

 10 fragmentos scFv (no reivindicados), preferentemente están previstos ARNm que codifican un V_H y un V_L, estando éstos unidos entre sí por un conector polipéptido. En general, para la provisión de este componente se utiliza a nivel de ARNm un polipéptido formado por 15-25 residuos de glicina, prolina y/o serina (véase la Figura 5) o la secuencia de nucleótidos asociada.

Además, en el contexto de la presente invención también se pueden proporcionar moléculas de ARNm que

 15 codifican anticuerpos biespecíficos. En el contexto de la presente invención, los anticuerpos biespecíficos son preferentemente anticuerpos que pueden actuar como adaptadores entre un efector y una diana correspondiente, por ejemplo para el reclutamiento de moléculas efectoras (por ejemplo toxinas, compuestos activos (fármacos), citoquinas, etc.), la fijación de dianas de células efectoras (por ejemplo CTL, células NK, macrófagos, granulocitos, etc. (véase, por ejemplo, el análisis de Kontermann R.E., *Acta Pharmacol. Sin.*, 2005,

 20 26(1): 1-9). En este contexto, los anticuerpos biespecíficos están construidos en principio tal como se ha descrito aquí en general para los anticuerpos, reconociendo estos anticuerpos biespecíficos dos antígenos, inmunógenos o epítopos diferentes, o compuestos activos, células u otras moléculas (o estructuras) tal como se menciona más arriba, es decir, las regiones de unión de antígeno del anticuerpo son específicas para dos moléculas (o estructuras) diferentes. Así, los diversos antígenos, inmunógenos o epítopos, por ejemplo, se

 25 pueden acercar espacialmente. Además, mediante la unión por ejemplo de un dominio de unión u otras especificidades, la función del anticuerpo se puede extender específicamente, por ejemplo de una proteína de unión, una inmunotoxina, etc. Los anticuerpos específicos se pueden utilizar, por ejemplo, para acercar espacialmente entre sí dos correactivos, por ejemplo dos células, dos proteínas, una proteína y el sustrato de la misma, etc., con el fin de promover una interacción entre éstos (por ejemplo interacciones proteína-proteína, conversiones de sustrato, modificaciones, etc.). Los anticuerpos biespecíficos se utilizan sobre todo para

 30 acercar espacialmente entre sí células efectoras (por ejemplo células T, células NK, macrófagos, etc.) y células diana (por ejemplo células tumorales, células infectadas, etc.). Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos pueden incluir, de forma no limitativa, por ejemplo aquellos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen por un lado con un factor de superficie tal como se describe aquí y, por otro lado, con un antígeno tal

 35 como se describe aquí, preferentemente un antígeno tumoral tal como se describe aquí. Esto incluye, por ejemplo, CD28 y un antígeno tumoral (Grosse-Hovest L. et al., 2003, *Eur. Immunol.* 33(5); 1334-40, (A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing)), CD19 y CD3 (antígeno tumoral CD19 de linfoma de células B), etc.

De forma no limitativa, de acuerdo con la presente invención, los ARNm que codifican anticuerpos codifican,

 40 entre otros, aquellos anticuerpos que se unen a antígenos o ácidos nucleicos específicos. En el contexto de la presente invención, los antígenos son normalmente moléculas que son reconocidas como exógenas por el sistema inmunológico y convencionalmente provocan una reacción o respuesta inmunológica con la formación de anticuerpos dirigidos específicamente contra las mismas. No obstante, los antígenos también pueden incluir,

 45 en especial en el caso de las enfermedades autoinmunes, moléculas o estructuras endógenas que son reconocidas incorrectamente como exógenas por el sistema inmunológico y por ello disparan una reacción inmunológica. Así, formulado alternativamente, los antígenos son todas las moléculas que son reconocidas por un anticuerpo en el contexto de la presente invención. Los antígenos comprenden esencialmente proteínas, péptidos o epítopos de estas proteínas o péptidos. En este contexto, los epítopos (también denominados

 50 "determinantes antigénicos") consisten normalmente en regiones pequeñas (secciones moleculares) que están situadas sobre la superficie de dichas estructuras de proteína o péptido y que tienen una longitud de 5 a 15, en casos excepcionales también hasta 25, preferentemente de 6 a 9 aminoácidos. Los antígenos también pueden incluir lípidos, carbohidratos, etc. En el contexto de la presente invención, los antígenos también incluyen, por

 55 ejemplo, los llamados inmunógenos, es decir, antígenos que conducen a una inmunidad del organismo transfectado con los mismos. Los antígenos incluyen, por ejemplo, de forma no limitativa, antígenos de superficie elular, antígenos tumorales, etc. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos se pueden unir a los siguientes antígenos (que normalmente están presentes en vertebrados), por ejemplo antígenos de superficie específicos de tumor (*tumour-specific surface antigens* - TSSA), por ejemplo 5T4, $\alpha 5\beta 1$ -

 60 integrina, 707-AP, AFP, ART-4, B7H4, BAGE, β -catenina/m, Bcr-abl, antígeno MN/C IX, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CD4, CD19, CD20, CD22, CD25, CDC27/m, CD 30, CD33, CD52, CD56, CD80, CDK4/m, CEA, CT, Cyp-B, DAM, EGFR, ErbB3, ELF2M, EMMPRIN, EpCam, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HAST-2, hTERT (o hTRT), iCE, IGF-1R, IL-2R, IL-5, KI-AA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/Melan-A, MART-2/Ski, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-

- 1, -2, -3, NA88-A, NY-ESO1, PAP, proteinasa-3, p190 menor bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, PSA, PSM, PSMA, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, survivina, TEL/AML1, TGF β , TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, VEGF y WT1, o secuencias, por ejemplo NY-Eso-1 o NY-Eso-B. Normalmente, los antígenos tumorales pueden ser, por ejemplo, responsables de metastasia, es decir, la disolución de células tumorales de su tejido nativo, la transferencia de las mismas al sistema vascular (sistema de vasos linfáticos o tumorales), la salida del sistema vascular y la colonización de un nuevo tejido. En este contexto presentan un interés particular los antígenos tumorales que producen interacciones célula-célula modificadas en comparación con el estado nativo.
- 5
- 10 Los anticuerpos codificados por el ARN también pueden estar dirigidos contra los antígenos tumorales mostrados en la tabla 1 o la tabla 2. En particular, el ARN que codifica estos anticuerpos puede emplearse para tratar (o para preparar un medicamento para tratar, respectivamente) las enfermedades cancerosas indicadas en la última columna de las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Antígenos expresados en enfermedades cancerosas

Antígeno tumoral	Nombre del antígeno tumoral	Cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas
5T4		cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de ovario
707-AP	707 alanina prolina	melanoma
9D7		carcinoma de células renales
AFP	alfa-fetoproteína	carcinoma hepatocelular, cáncer de vesícula biliar, cáncer testicular, cáncer de ovario, cáncer de vejiga
AlbZIP HPG1		cáncer de próstata
alfa5beta1-Integrina		
alfa5beta6-Integrina		cáncer de colon
alfa-metilacil- coenzima A racemasa		cáncer de próstata
ART-4	antígeno de adenocarcinoma reconocido por células T 4	cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas
B7H4		cáncer de ovario
BAGE-1	antígeno B	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células escamosas
BCL-2		leucemia
BING-4		melanoma
CA 15-3/CA 27-29		cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata
CA 19-9		cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de vesícula biliar, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón
CA 72-4		cáncer de ovario
CA125		cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de útero, carcinoma de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón
calreticulina		cáncer de vejiga
CAMEL	antígeno reconocido por CTL en melanoma	melanoma
CASP-8	caspara-8	cáncer de cabeza y cuello
catepsina B		cáncer de mama
catepsina L		cáncer de mama
CD19		malignidades de células B
CD20		
CD22		
CD25		
CD30		

ES 2 614 901 T3

Antígeno tumoral	Nombre del antígeno tumoral	Cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas
CD33		
CD4		
CD52		
CD55		
CD56		
CD80		
CEA	antígeno carcinoembrionario	carcinoma intestinal, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer de hígado cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, melanoma
CLCA2	canal 2 de cloruro activado por calcio	cáncer de pulmón
CML28		leucemia
Proteína de tipo coactosina		cáncer pancreático
Colágeno XXIII		cáncer de próstata
COX-2		cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer colorrectal
CT-9/BRD6	proteína específica de testículo de bromodominio	
Cten	proteína de tipo tensina C-terminal	cáncer de próstata
ciclina B1		
ciclina D1		cáncer de ovario
cyp-B	ciclofilina B	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, leucemia de células T, carcinoma de células escamosas,
CYPB1	citocromo P450 1B1	leucemia
DAM-10/MAGE-B1	melanoma de antígeno de diferenciación 10	melanoma, tumores cutáneos, cáncer de ovario, cáncer de pulmón
DAM-6/MAGE-B2	melanoma de antígeno de diferenciación 6	melanoma, tumores cutáneos, cáncer de ovario, cáncer de pulmón
EGFR/Her1		cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama
EMMPRIN	inductor de metaloproteínasa de matriz extracelular asociado con células tumorales/	cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, linfoma
EpCam	molécula de adhesión de células epiteliales	cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón
EphA2	receptor 2 de efrina de tipo A	glioma
EphA3	receptor 2 de efrina de tipo A	melanoma, sarcoma, cáncer de pulmón
ErbB3		cáncer de mama
EZH2	(potenciador de Zeste homólogo 2)	cáncer endometrial, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama
FGF-5	factor de crecimiento fibroblástico 5	carcinoma de células renales, cáncer de mama, cáncer de próstata
FN	fibronectina	melanoma
Fra-1	antígeno 1 relacionado con Fos	cáncer de mama, cáncer de esófago, carcinoma de células renales, cáncer de tiroides
G250/CAIX	glicoproteína 250	leucemia, carcinoma de células renales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino
GAGE-1	G antígeno 1	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma,
		cáncer de cabeza y cuello
GAGE-2	G antígeno 2	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-3	G antígeno 3	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello

ES 2 614 901 T3

Antígeno tumoral	Nombre del antígeno tumoral	Cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas
GAGE-4	G antígeno 4	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-5	G antígeno 5	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-6	G antígeno 6	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-7b	G antígeno 7b	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GAGE-8	G antígeno 8	cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, sarcoma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello
GDEP	gen expresado de forma diferencial en la próstata	cáncer de próstata
GnT-V	N-acetilglucosaminil-transferasa V	glioma, melanoma
gp100	glicoproteína 100 kDa	melanoma
GPC3	glipicano 3	carcinoma hepatocelular, melanoma
HAGE	antígeno de helicasa	cáncer de vejiga
HAST-2	tumor en anillo de sello humano 2	
hepsina		próstata
Her2/neu/ErbB2	receptor epidérmico humano 2/neurológico	cáncer de mama, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer gástrico
HERV-K-MEL		melanoma
HNE	elastasa de neutrófilo humana	leucemia
caja homeótica NKX 3.1		cáncer de próstata
HOM-TES-14/SCP-1		cáncer de ovario
HOM-TES-85		
HPV-E6		cáncer de cuello uterino
HPV-E7		cáncer de cuello uterino
HST-2		cáncer gástrico
hTERT	transcriptasa inversa de telomerasa humana	cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, sarcoma, linfoma no Hodgkin, leucemia aguda
iCE	carboxil esterasa intestinal	carcinoma de células renales
IGF-1R		cáncer colorrectal
IL-13Ra2	cadena de receptor alfa 2 de interleucina 13	glioblastoma
IL-2R		cáncer colorrectal
IL-5		
receptor de laminina inmadura		carcinoma de células renales
caliceína 2		cáncer de próstata
caliceína 4		cáncer de próstata
Ki67		cáncer de próstata, cáncer de mama, linfoma no Hodgkin, melanoma
KIAA0205		cáncer de vejiga
KK-LC-1	antígeno de cáncer de pulmón 1 Kita-kyushu	cáncer de pulmón
KM-HN-1		cáncer de lengua, carcinomas hepatocelulares, melanoma, cáncer gástrico, esofágico, cáncer de colon, cáncer de páncreas
LAGE-1	antígeno L	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma
livina		cáncer de vejiga, melanoma
MAGE-A1	antígeno de melanoma A1	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A10	antígeno de melanoma A10	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia

ES 2 614 901 T3

Antígeno tumoral	Nombre del antígeno tumoral	Cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas
MAGE-A12	antígeno de melanoma A12	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia, cáncer de próstata, mieloma, tumores cerebrales
MAGE-A2	antígeno de melanoma A2	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A3	antígeno de melanoma A3	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A4	antígeno de melanoma A4	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A6	antígeno de melanoma A6	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-A9	antígeno de melanoma A9	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón, sarcoma, leucemia
MAGE-B1	antígeno de melanoma B1	melanoma
MAGE-B10	antígeno de melanoma B10	melanoma
MAGE-B16	antígeno de melanoma B16	melanoma
MAGE-B17	antígeno de melanoma B17	melanoma
MAGE-B2	antígeno de melanoma B2	melanoma
MAGE-B3	antígeno de melanoma B3	melanoma
MAGE-B4	antígeno de melanoma B4	melanoma
MAGE-B5	antígeno de melanoma B5	melanoma
MAGE-B6	antígeno de melanoma B6	melanoma
MAGE-C1	antígeno de melanoma C1	cáncer de vejiga, melanoma
MAGE-C2	antígeno de melanoma C2	melanoma
MAGE-C3	antígeno de melanoma C3	melanoma
MAGE-D1	antígeno de melanoma D1	melanoma
MAGE-D2	antígeno de melanoma D2	melanoma
MAGE-D4	antígeno de melanoma D4	melanoma
MAGE-E1	antígeno de melanoma E1	cáncer de vejiga, melanoma
MAGE-E2	antígeno de melanoma E2	melanoma
MAGE-F1	antígeno de melanoma F1	melanoma
MAGE-H1	antígeno de melanoma H1	melanoma
MAGEL2	similar a MAGE 2	melanoma
mamoglobina A		cáncer de mama
MART-1/Melan-A	antígeno de melanoma reconocido por células T-1/ antígeno de melanoma A	melanoma
MART-2	antígeno de melanoma reconocido por células T-2	melanoma
proteína de matriz 22		cáncer de vejiga
MC1R	receptor de melanocortina 1	melanoma
M-CSF	gen de factor estimulador de colonias de macrófagos	cáncer de ovario
mesotelina		cáncer de ovario
MG50/PXDN		cáncer de mama, glioblastoma, melanoma
MMP 11	fosfoproteína en fase M 11	leucemia
antígeno MN/CA IX		carcinoma de células renales
MRP-3	proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos 3	cáncer de pulmón
MUC1	mucina 1	cáncer de mama
MUC2	mucina 2	cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de páncreas
NA88-A	NA clon de ADNc de paciente M88	melanoma

ES 2 614 901 T3

Antígeno tumoral	Nombre del antígeno tumoral	Cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas
N-acetilglucosaminiltransferasa-V		
Neo-PAP	Neo-poli(A) polimerasa	
NGEP		cáncer de próstata
NMP22		cáncer de vejiga
NPM/ALK	proteína de fusión de quinasa de nucleofosmina/ linfoma anaplásico	
NSE	enolasa específica de neuronas	cáncer de pulmón de células pequeñas, neuroblastoma, tumor de Wilms, melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de testículo, cáncer de páncreas
NY-ESO-1	New York esofágico 1	cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, sarcoma, linfoma B, hepatoma, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de mama
NY-ESO-B		
OA1	proteína de albinismo ocular de tipo 1	melanoma
OFA-iLRP	receptor de laminina inmadura de antígeno oncofetal	leucemia
OGT	gen de N-acetilglucosamina transferasa unida a O	
OS-9		
osteocalcina		cáncer de próstata
osteopontina		cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario
p15	proteína 15	
p15		melanoma
p190 menor bcr-abl		
p53		
PAGE-4	proteína 4 de tipo GAGE de próstata	cáncer de próstata
PAI-1	inhibidor activador de plasminógeno 1	cáncer de mama
PAI-2	inhibidor activador de plasminógeno 2	cáncer de mama
PAP	fosfatasa ácida de próstata	cáncer de próstata
PART-1		cáncer de próstata
PATE		cáncer de próstata
PDEF		cáncer de próstata
Pim-1-quinasa		
Pin 1	Propil isomerasa	cáncer de próstata
POTE		cáncer de próstata
PRAME	antígeno de melanoma expresado preferentemente	melanoma, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, sarcoma
proteína		cáncer de próstata
proteínasa-3		
PSA	antígeno específico de próstata	cáncer de próstata
PSCA		cáncer de próstata
PSGR		cáncer de próstata
PSM		
PSMA	antígeno de membrana específico de próstata	cáncer de próstata
RAGE-1	antígeno renal	cáncer de vejiga, cáncer renal, sarcoma, cáncer de colon
RHAMM/CD168	receptor para motilidad mediada por ácido hialurónico	leucemia
RU1	ubícuo renal 1	cáncer de vejiga, melanoma, cáncer renal

ES 2 614 901 T3

Antígeno tumoral	Nombre del antígeno tumoral	Cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas
RU2	ubiuco renal 1	cáncer de vejiga, melanoma, sarcoma, tumor cerebral.
		cáncer esofágico, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de mama
S-100		melanoma
SAGE	antígeno de sarcoma	
SART-1	tumor de rechazo de antígeno escamoso 1	cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de útero
SART-2	tumor de rechazo de antígeno escamoso 1	cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, melanoma, tumor cerebral
SART-3	tumor de rechazo de antígeno escamoso 1	cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, leucemia, melanoma, cáncer de esófago
SCC	antígeno de carcinoma de células escamosas	cáncer de pulmón
Sp17	proteína de esperma 17	mieloma múltiple
SSX-1	sarcoma sinovial X punto de ruptura 1	carcinoma hepatocelular, cáncer de mama
SSX-2/HOM-MEL-40	sarcoma sinovial X punto de ruptura 2	cáncer de mama
SSX-4	sarcoma sinovial X punto de ruptura 4	cáncer de vejiga, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama
STAMP-1		cáncer de próstata
STEAP	próstata antígeno epitelial transmembrana seis	cáncer de próstata
survivina		cáncer de vejiga
survivina-2B	survivina de retención de intrón 2	cáncer de vejiga
TA-90		melanoma
TAG-72		carcinoma de próstata
TARP		cáncer de próstata
TGFb	TGFbeta	
TGFbRII	receptor II TGFbeta	
TGM-4	transglutaminasa específica de próstata	cáncer de próstata
TRAG-3	proteína 3 asociada resistente al taxol	cáncer de mama, leucemia y melanoma
TRG	gen relacionado con la testina	
TRP-1	proteína 1 relacionada con la tirosina	melanoma
TRP-2/6b	TRP-2/nuevo exón 6b	melanoma, glioblastoma
TRP-2/INT2	TRP-2/intrón 2	melanoma, glioblastoma
Trp-p8		cáncer de próstata
Tirosinasa		melanoma
UPA	activador de plasminógeno de tipo quinasa	cáncer de mama
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular	
VEGFR-2/FLK-1	receptor 2 de factor de crecimiento endotelial vascular	
WT1	gen de tumor de Wilms	cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, leucemia

Tabla 2: Antígenos mutantes expresados en enfermedades cancerosas

Antígeno mutante	Nombre del antígeno mutante	Cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas
alfa-actinina-4/m		carcinoma de pulmón
ARTC1/m		melanoma

ES 2 614 901 T3

Antígeno mutante	Nombre del antígeno mutante	Cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas
	región de grupo de punto de ruptura - proteína de fusión de Abelson	
bcr/abl	proteína de fusión	CML
beta-Catenina/m	beta-Catenina	melanoma
BRCA1/m		cáncer de mama
BRCA2/m		cáncer de mama
CASP-5/m		cáncer colorrectal, cáncer gástrico, endometrial carcinoma
CASP-8/m		cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas
CDC27/m	ciclo de división celular 27	
CDK4/m	quinasa 4 dependiente de ciclina	melanoma
CDKN2A/m		melanoma
CML66		CML
COA-1/m		cáncer colorrectal
DEK-CAN	proteína de fusión	AML
EFTUD2/m		melanoma
ELF2/m	Factor de elongación 2	carcinoma de pulmón de células escamosas
ETV6-AML1	Gen 6 variante Ets / proteína de fusión génica de leucemia mieloide aguda 1	ALL
FN1/m	fibronectina 1	melanoma
GPNMB/m		melanoma
HLA-A*0201-R170I	cambio de arginina a isoleucina en el residuo 170 de la hélice alfa del dominio alfa 2 en el gen HLA-A2	carcinoma de células renales
HLA-A11/m		melanoma
HLA-A2/m		carcinoma de células renales
HSP70-2M	proteína de choque térmico 70-2 mutada	carcinoma de células renales, melanoma, neuroblastoma
KIAA0205/m		tumor de vejiga
K-Ras/m		carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal
LDLR-FUT	LDR-proteína de fusión de fucosiltransferasa	melanoma
MART2/m		melanoma
ME1/m		carcinoma de pulmón de células no pequeñas
MUM-1/m	ubicuo mutado 1 melanoma	melanoma
MUM-2/m	ubicuo mutado 2 melanoma	melanoma
MUM-3/m	ubicuo mutado 3 melanoma	melanoma
Miosina clase I/m		melanoma
neo-PAP/m		melanoma
NFYC/m		carcinoma de pulmón de células escamosas
N-Ras/m		melanoma
OGT/m		carcinoma colorrectal
OS-9/m		melanoma
p53/m		
Pml/RARa	leucemia promielocítica / receptor de ácido retinoico alfa	APL, PML
PRDX5/m		melanoma
PTPRK/m	tirosina fosfatasa kappa - proteína de tipo receptor	melanoma
RBAF600/m		melanoma
SIRT2/m		melanoma
SYT-SSX-1	sinaptotagmina I / proteína de fusión de sarcoma sinovial X	sarcoma
SYT-SSX-2	sinaptotagmina I / proteína de fusión de sarcoma sinovial X	sarcoma

Antígeno mutante	Nombre del antígeno mutante	Cánceres o enfermedades cancerosas relacionadas
TEL-AML1	leucemia de familia Ets de translocación / proteína de fusión de leucemia mieloide aguda 1	AML
TGFBR11	receptor II TGFbeta	carcinoma colorrectal
TPI/m	triosa fosfato isomerasa	melanoma

En una realización preferente de acuerdo con la invención, los anticuerpos codificados por el ARNm de la invención están dirigidos contra los siguientes antígenos (de proteína) (pudiendo emplearse las moléculas de ARNm para preparar un medicamento, por ejemplo una composición farmacéutica o de forma especialmente preferente una vacuna (pasiva) en el sentido de la presente invención), seleccionados de entre el grupo consistente en 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-actinina-4/m, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-catenina/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, 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 de tipo coactosina, colágeno XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A*0201-R171, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, caja homeótica NKX3.1, HOM-TE5-14/SCP-1, HOM-TE5-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmadura, calicreína-2, calicreína-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mamoglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, proteína de matriz 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP11, MN/CA antígeno IX, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clase I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, Neo-PAP/m, NFYC/m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-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-quinasa, Pin-1, Pml/PARalpha, 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, TGFbeta, TGFbe-taRII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, tirosinasa, UPA, VEGF, VEGFR-2/FLK-1, y WT1.

En una realización particularmente preferente, el ARNm codifica anticuerpos que están dirigidos contra antígenos de proteína seleccionados entre el grupo consistente en MAGE-A1, MAGE-A6, melan-A, GP100, tirosinasa, survivina, CEA, Her-2/neu, WT1, PRAME, EGFR1 (receptor de factor de crecimiento epidérmico 1), mucina-1 y SEC61G, hTERT, 5T4, NY-Esol, y TRP-2, de forma especialmente preferente entre secuencias del grupo consistente en MAGE-A1 [número de acceso M77481], MAGE-A6 [número de acceso NM_005363], melan-A [número de acceso NM_005511], GP100 [número de acceso M77348], tirosinasa [número de acceso NM_000372], survivina [número de acceso AF077350], CEA [número de acceso NM_004363], Her-2/neu [número de acceso M11730], WT1 [número de acceso NM_000378], PRAME [número de acceso NM_006115], EGFR1 (receptor de factor de crecimiento epidérmico 1) [número de acceso AF288738], mucina-1 [número de acceso NM_002456] y SEC61G [número de acceso NM_014302], hTERT [número de acceso NM_198253], 5T4 [número de acceso NM_006670], NY-Esol [número de acceso NM_001327], y TRP-2 [número de acceso NM_001922].

Los anticuerpos (y por tanto también los ARNm de acuerdo con la descripción en los que se basan estos anticuerpos) que se unen a los antígenos aquí descritos, y posiblemente a otros antígenos o ácidos nucleicos, se pueden identificar por ejemplo mediante el método de identificación de fagos desarrollado por George P. Smith. En este contexto, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se expresan normalmente sobre la superficie de fagos filamentosos (Smith, G.P., 1985, "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", Science 228; 1315-1317). Para ello, convencionalmente hay de 3 a 5 copias de la proteína de superficie gpIII en el extremo proximal del fago, con ayuda de las cuales el fago infecta células bacterianas a través del pilus F de éstas. En la identificación de fagos, por ejemplo, el ADN para un fragmento de anticuerpo que codifica el dominio variable de unión a antígeno se clona después en marco delante del gen gpIII. En la biosíntesis de proteínas, a partir de éste se forma una proteína de fusión, que se expresa sobre la superficie del virus sin que el fago pierda su capacidad infecciosa. Con ayuda de la técnica de identificación de fagos se pueden generar grandes bibliotecas de anticuerpos, expresando cada fago un

fragmento de anticuerpo diferente sobre la superficie. En este sentido, el ARN subyacente también está disponible. Un fragmento de anticuerpo particular se puede aislar de una librería de este tipo mediante un método denominado "barrido de fagos". Para ello, el antígeno correspondiente se une a una matriz y se incuba con la suspensión de fagos. Los fagos que presentan un fragmento de anticuerpo apropiado interactúan con el antígeno fijado, mientras que los otros fagos se eliminan en un paso de lavado. Los fagos aislados se multiplican, por ejemplo, en *E. coli*. El ADN se aísla en consecuencia y se determina la secuencia genética. Después se pueden desarrollar constructos de expresión que contienen el ADNc que codifica el anticuerpo completo o fragmentos del anticuerpo con ayuda de métodos de ingeniería genética. A partir de este ADNc se puede generar un ARN (ARNm) que codifica el anticuerpo, por transcripción *in vitro* (véase más abajo). De este modo se obtienen ácidos nucleicos o, respectivamente, ARNm codificadores de anticuerpos monoclonales, que son totalmente de origen humano.

En el contexto de la presente invención, un ARNm para su uso de acuerdo con la invención, que codifica anticuerpos tal como se ha descrito más arriba, es también adecuado para codificar los llamados intracuerpos, o para hacer posible una expresión de intracuerpos. En el contexto de la presente invención, los intracuerpos pueden incluir cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aquí descritos. Los intracuerpos son anticuerpos expresados intracelularmente, es decir, anticuerpos que son codificados por ácidos nucleicos localizados en la célula y expresados en la misma. Para ello, un ARNm para su uso de acuerdo con la invención, que codifica los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo tal como se describen más arriba, se introduce de antemano en las células, por ejemplo con ayuda de métodos de transfección de acuerdo con la invención u otros métodos de transfección adecuados (véase más abajo) y, en caso apropiado, después se trasplanta a un organismo o ser o se introduce directamente como ácidos nucleicos en un organismo o ser. En este contexto (independientemente de si se debe introducir en la célula un intracuerpo o un anticuerpo segregado), el ARNm para su uso de acuerdo con la invención (o un ácido nucleico correspondiente) se puede introducir en forma desnuda o como un complejo con soportes adecuados (por ejemplo liposomas) en el organismo o ser, o puede tener modificaciones (del ARN) que, en caso apropiado junto con uno de los métodos de transfección mencionados, conducen a una mejor absorción celular, por ejemplo cualquiera de las modificaciones de ARN aquí mencionadas, tales como modificaciones de lípidos del ARN para su uso de acuerdo con la invención. Un organismo o ser en relación con la presente invención significa típicamente mamíferos, es decir, animales, incluyendo bóvidos, cerdos, perros, gatos, burros, monos, roedores, por ejemplo ratones, hámsteres, conejos, etc., y humanos. Los intracuerpos pueden estar localizados y ser expresados en determinados sitios celulares. Por ejemplo, los intracuerpos pueden ser expresados en el citoplasma, disminuyendo normalmente la formación de puentes disulfuro bajo las condiciones reductoras del citoplasma. No obstante, se ha podido demostrar que los intracuerpos citoplasmáticos pueden ser funcionales. La expresión citoplasmática por el ARNm de uso de acuerdo con la invención abre la posibilidad de inhibir también proteínas citoplasmáticas. Esto no es posible con el tratamiento con anticuerpos monoclonales del estado anterior de la técnica, ya que estos anticuerpos solo pueden llegar a proteínas segregadas y localizadas en la membrana (extracelulares) debido a su secreción desde la célula después de la expresión intracelular (lo que constituye la diferencia principal entre anticuerpos e intracuerpos). Mediante expresión de un péptido señal, los intracuerpos pueden ser transportados al interior del retículo endoplasmático (RE) y después segregados como en el caso de los anticuerpos regulares. En este caso, normalmente únicamente las proteínas segregadas o localizadas en la membrana son una diana para estos anticuerpos. Mediante una codificación adicional de una señal de retención de RE C-terminal (por ejemplo KDEL), con el ARNm de uso de acuerdo con la invención, el intracuerpo puede permanecer en el RE (donde se puede unir a antígenos específicos localizados en el RE) y prevenir la secreción de su antígeno y/o transportar su antígeno o su molécula diana a la membrana plasmática. Dependiendo de las necesidades, los intracuerpos pueden incluir anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo tal como se describen más arriba. Preferentemente, los intracuerpos en el contexto de la presente invención incluyen en un principio anticuerpos de longitud completa, que son retenidos en la célula y no son segregados desde la misma (mediante cualquier técnica, por ejemplo secuencias de señal de retención, etc.). No obstante, si por ejemplo una expresión intracelular de anticuerpos de longitud completa no es técnicamente posible o apropiada, también se pueden emplear como intracuerpos fragmentos de anticuerpo tal como se describen más arriba.

Además, los anticuerpos codificados por el ARNm para su uso de acuerdo con la invención también incluyen aquellos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que tienen una identidad de secuencia con uno de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aquí descritos de al menos un 70%, un 80% o un 85%, preferentemente al menos un 90%, de forma especialmente preferente al menos un 95% y de forma totalmente preferente al menos un 99% de la longitud completa del ácido nucleico codificador o la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tal como se describe aquí. Preferentemente, estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo tienen la misma función biológica o, respectivamente, la actividad específica del anticuerpo de longitud completa correspondiente, por ejemplo la unión específica de antígenos o ácidos nucleicos particulares. Por consiguiente, es preferible que la o las regiones hipervariables estén conservadas o modificadas por con meramente conservadoras.

La función biológica de los anticuerpos aquí descritos, que son codificados por el ARNm de acuerdo con la invención, incluye por ejemplo la neutralización de antígenos, la activación de complementos u opsonización. En el caso de la neutralización de antígenos, el anticuerpo se puede unir a un antígeno y así neutralizarlo. En general, el anticuerpo se bloquea por la unión del antígeno y, en consecuencia, solo puede ejercer su efecto
 5 contra un antígeno, o dos antígenos en el caso de los anticuerpos biespecíficos. En el caso de la activación de complementos, el sistema complejo de proteínas de complemento, que depende de la parte Fc del anticuerpo, se puede activar mediante la unión de anticuerpos. Los productos finales de la cascada de complementos conducen normalmente a una lisis celular y a la creación de un medio flogístico (inflamatorio). En el caso de la opsonización, los patógenos o partículas extrañas se vuelven accesibles para los fagocitos mediante la unión
 10 por un anticuerpo a través de los dominios constantes del anticuerpo. Alternativamente, las células opsonizadas, que son reconocidas como extrañas, se pueden someter a lisis mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En este contexto, en particular las células NK pueden desempeñar funciones líticas de este modo por la activación de sus receptores Fc.

En relación con la presente invención, el término "identidad" significa que las secuencias se comparan entre sí como se indica a continuación. Con el fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos, en primer lugar las secuencias se pueden alinear entre sí para posibilitar a continuación su comparación. Para ello, por ejemplo se pueden insertar huecos en la secuencia de la primera secuencia de ácidos nucleicos y los nucleótidos se pueden comparar con la posición correspondiente de la segunda secuencia de ácidos nucleicos. Si una posición de la primera secuencia de ácidos nucleicos está ocupada por
 20 el mismo nucleótido que una posición de la segunda secuencia, las dos secuencias son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas dividido entre el número de todas las posiciones comparadas en las secuencias investigadas. Por ejemplo, si se toma una identidad de secuencia específica para un ácido nucleico particular (por ejemplo un ácido nucleico que codifica una proteína, tal como se describe más arriba) en comparación con un ácido nucleico de referencia (por ejemplo, un ácido nucleico del estado anterior de la técnica) de longitud definida, este porcentaje de identidad se indica relativamente con referencia a este ácido nucleico de referencia. Por tanto, comenzando
 25 por ejemplo por un ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de un 50% con un ácido nucleico de referencia de 100 nucleótidos de longitud, este ácido nucleico puede ser un ácido nucleico de 50 nucleótidos de longitud que es completamente idéntico a una sección de 50 nucleótidos de longitud del ácido nucleico de referencia. De hecho, también puede ser un ácido nucleico de 100 nucleótidos de longitud que presenta una identidad de un 50%, es decir, en este caso un 50% de ácidos nucleicos idénticos, con el ácido nucleico de referencia a lo largo de toda su longitud. Alternativamente, este ácido nucleico puede ser un ácido nucleico con una longitud de 200 nucleótidos que es completamente idéntico en una sección de 100 nucleótidos de longitud del ácido nucleico al ácido nucleico de referencia de 100 nucleótidos de longitud. Evidentemente, otros ácidos nucleicos también cumplen estos criterios. Las indicaciones de identidad descritas para ácidos nucleicos son igualmente aplicables a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo codificados por el ARNm de acuerdo con la invención. Lo mismo es aplicable a la determinación de la identidad de secuencia entre dos (poli)péptidos, en base a la comparación/ alineación de las respectivas secuencias de aminoácidos.

El porcentaje de identidad de dos secuencias se puede determinar con ayuda de un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente, pero no limitativo, de algoritmo matemático que puede emplearse para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin *et al.* (1993), PNAS USA, 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo está integrado en el programa NBLAST, con el que se pueden identificar secuencias que tienen una identidad deseada con las secuencias de la presente invención. Con el fin de obtener una alineación con huecos, tal como se describe aquí, se puede utilizar el programa "Gapped BLAST", tal como se describe en Altschul *et al.*
 45 (1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402. Si se utilizan programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros prefijados del programa particular (por ejemplo NBLAST). Las secuencias se pueden alinear además utilizando la versión 9 de GAP (*global alignment program* - programa de alineación global) del "Genetic Computing Group" utilizando la matriz prefijada (BLOSUM62) (valores - 4 a +11) con una penalización de hueco abierto de -12 (para el primer cero de un hueco) y una penalización de extensión de hueco de -4 (para cada cero sucesivo adicional en el hueco). Después de la alineación, el porcentaje de identidad se calcula expresando el número de conformidades como un contenido porcentual de los ácidos nucleicos en la secuencia reivindicada. Los métodos descritos para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos también se pueden utilizar correspondientemente, en caso necesario, en las secuencias de aminoácidos codificadas, por ejemplo los anticuerpos aquí descritos.

De acuerdo con una realización preferente, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención contiene una región codificadora, que codifica uno de los anticuerpos enumerados en la tabla 3. El ARNm codificador de anticuerpos se puede utilizar para tratar (o para proporcionar una composición farmacéutica para tratar) una de las enfermedades, afecciones, patologías enumeradas en la columna derecha de la tabla 3.

60

Tabla 3

Nombre	Diana	Aplicación clínica
Oregovomab (OvaRex)	CA125 (MUC-16)	Cáncer de ovario, cáncer de trompa de Falopio, cáncer de cavidad peritoneal
Cantuzumab	CanAg (MUC-1)	Cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, NSCLC
HuC242-DM4	CanAg (MUC-1)	Cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de páncreas
PAM4 (IMMU-107)	CanAg (MUC-1)	Cáncer de páncreas
HuC242-DM4	CanAg (MUC-1)	Cáncer colorrectal; cáncer de páncreas
HuHMF1	CanAg (MUC-1)	Cáncer de mama
WX-G250 (Rencarex)	Anhidrasa carbónica IX (G250)	Carcinoma de células renales
MT103	CD 19	Linfoma no Hodgkin
Ibritumomab (Zevalin)	CD20	Linfoma no Hodgkin, linfoma
Rituximab (Rituxan, MabThera)	CD20	Linfoma no Hodgkin, linfoma, leucemia linfocítica crónica
Tositumomab (Bexxar)	CD20	Linfoma no Hodgkin, linfoma, mieloma
Ofatumamab (HuMax-CD20)	CD20	Linfoma, leucemia linfocítica crónica de células B
Epratuzumab (Lympho-Cide)	CD22	Linfoma no Hodgkin, leucemia
MDX-060	CD30	Linfoma Hodgkin, linfoma
SGN-30	CD30	Linfoma Hodgkin, linfoma
Gemtuzumab (Mylotarg)	CD33	Leucemia
Zanolimumab (HuMax-CD4)	CD4	Linfoma de células T
SGN-40	CD40	Linfoma no Hodgkin, mieloma, leucemia, leucemia linfocítica crónica
Alemtuzumab (MabCampath)	CD52	Linfoma de células T, leucemia
HuN901-DM1	CD56	Mieloma
Galiximab	CD80	Linfoma no Hodgkin
Labetuzumab	CEA	Cáncer de colon, de páncreas, de ovario
Ipilimumab (MDX-010)	CTLA4	Sarcoma, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, leucemia, linfoma, tumores cerebrales y del sistema nervioso central, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de mama
Cetuximab (Erbix)	EGFR	Cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer de mama, mieloma, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, neoplasias orofaríngeas, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, sarcoma, cáncer de laringe; cáncer de hipofaringe
Panitumumab (Vectibix)	EGFR	Cáncer de colon, de pulmón, de mama; de vejiga; de ovario
Nimotuzumab (TheraCim)	EGFR	Tumores sólidos, cáncer de pulmón
Matuzumab	EGFR	Cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico
Zalutumumab	EGFR	Cáncer de cabeza y cuello, cáncer de células escamosas
Pertuzumab (Omnitarg)	EGFR und HER2/neu	Cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata
Catumaxomab (Removab)	EpCam	Cáncer de ovario, neoplasias de trompa de Falopio, neoplasias peritoneales
MORab-003	GP-3	Cáncer de ovario, cáncer de trompa de Falopio, cáncer peritoneal

Nombre	Diana	Aplicación clínica
MORab-009	GP-9	Cáncer de páncreas, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de trompa de Falopio, cáncer de cavidad peritoneal
Ertumaxomab	HER2/neu	Cáncer de mama
Trastuzumab (Herceptin)	HER2/neu	Cáncer de mama, cáncer endometrial, tumores sólidos
AMG 102	HGF	Carcinoma de células renales avanzado
Apolizumab (Remitogen)	HLA-DR-Antígeno	Tumores sólidos, leucemia, linfoma no Hodgkin, linfoma
CNTO 95	Receptor de Integrina	Melanoma
ID09C3	MHCII	Linfoma no Hodgkin
Denosumab (AMG-102)	RANKL	Mieloma, tumor óseo de células gigantes, cáncer de mama, cáncer de próstata
GC1008	TGFbeta	Carcinoma de células renales avanzado; melanoma maligno
Mapatumumab	TRAIL-R1	Cáncer de colon, Mieloma
Bevacizumab (Avastin)	VEGF	Cáncer de colon, cáncer de mama, tumores cerebrales y del sistema nervioso central, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, sarcoma, melanoma, cáncer esofágico; cáncer de estómago, carcinoma de células renales metastásico; cáncer de riñón, glioblastoma, cáncer de hígado
MEDI 522	VLA3 (alfa5beta3-Integrina)	Tumores sólidos, leucemia, linfoma, cáncer de intestino delgado, melanoma
Volociximab	VLA5 (alfa5beta1-Integrina)	Carcinoma de células renales, cáncer de páncreas, melanoma

Hematología:

Nombre	Diana	Aplicación
Eculizumab (Alexion)	Factor complementario C5	Hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH)
Mepolizumab	Interleucina-5	Síndrome hipereosinofílico

Odontología:

Nombre	Diana	Aplicación
CaroRx (CaroRx)	Streptococcus mutans	Caries dental

5

Enfermedades autoinmunes y enfermedades alérgicas:

Nombre	Diana	Aplicación
Efalizumab (Raptiva)	CD11a	Psoriasis
Epratuzumab (LymphoCide)	CD22	Enfermedades autoinmunes, linfoma no Hodgkin
Lumiliximab	CD23	Alergias
Daclizumab	CD25	Esclerosis múltiple remitente-recurrente
Natalizumab (Tysabri)	CD49d	Esclerosis múltiple
Omalizumab (Xolair)	IgE (Fc- Teil)	Asma bronquial agudo
Mepolizumab	Interleucina-5	Asma, síndrome hipereosinofílico, gastroenteritis eosinofílica, síndrome de Churg-Strauss, esofagitis eosinofílica
Tocilizumab (Actemra)	Interleucina-6	Artritis reumatoide
Adalimumab (Humira)	TNF α	Artritis reumatoide, psoriasis-artritis, enfermedad de Bechterew
Infliximab (Remicade)	TNF α	Enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, enfermedad de Bechterew, psoriasis-artritis, colitis ulcerosa, psoriasis
Golimumab (CNTO 148)	TNF α	Artritis reumatoide
Mapatumumab	TRAIL-R1	Mieloma

Nombre	Diana	Aplicación
Rituximab (Rituxan, MabThera)	CD20	Urticaria, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, encefalitis focal crónica
Epratuzumab (LymphoCide)	CD22	Enfermedades autoinmunes, lupus eritematoso sistémico

Enfermedades neurodegenerativas:

Nombre	Diana	Aplicación
R1450	Amiloide-beta	Alzheimer

Oftalmología:

Nombre	Diana	Aplicación
Ranibizumab (Lucentis)	VEGF-A	Degeneración macular húmeda
Bevacizumab (Avastin)	VEGF	Degeneración macular

5

Enfermedades infecciosas:

Nombre	Diana	Aplicación
Palivizumab (Synagis)	Componente del RSV (virus respiratorio sincitial)	Prevención de neumonía por RSV en niños prematuros

Enfermedades cardiovasculares:

Nombre	Diana	Aplicación
Abciximab (ReoPro)	GP1Ib/IIa	Prevención de una oclusión vascular después de PTCA

Otras enfermedades:

Nombre	Diana	Aplicación
Denosumab (AMG-102)	RANKL	Osteoporosis
GC1008	TGFbeta	Fibrosis pulmonar
Bevacizumab (Avastin)	VEGF	Retinopatía diabética proliferativa

10

De acuerdo con una realización preferente, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención contiene o tiene una secuencia que codifica las cadenas pesadas de acuerdo con la SEQ ID N°: 2 y las cadenas ligeras de acuerdo con la SEQ ID N°: 4. De acuerdo con una realización todavía más preferente, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención contiene o tiene una secuencia codificadora de acuerdo con la SEQ ID N°: 5 o la SEQ ID N°: 51, respectivamente.

15

De acuerdo con otra realización preferente, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención contiene o tiene una secuencia que codifica las cadenas pesadas de acuerdo con la SEQ ID N°: 7 y las cadenas ligeras de acuerdo con la SEQ ID N°: 9. De acuerdo con una realización todavía más preferente, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención contiene o tiene una secuencia codificadora de acuerdo con la SEQ ID N°: 10 o la SEQ ID N°: 52, respectivamente.

20

De acuerdo con otra realización preferente, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención contiene o tiene una secuencia que codifica las cadenas pesadas de acuerdo con la SEQ ID N°: 12 y las cadenas ligeras de acuerdo con la SEQ ID N°: 14. De acuerdo con una realización todavía más preferente, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención contiene o tiene una secuencia codificadora de acuerdo con la SEQ ID N°: 15 o la SEQ ID N°: 53, respectivamente.

25

Además, los anticuerpos codificados por el ARNm para su uso de acuerdo con la invención también pueden codificar anticuerpos que tienen una identidad de secuencia con una de las secuencias codificadoras de los anticuerpos aquí descritos, por ejemplo tal como se describen en la tabla 3 o en las SEQ ID N°: 5(51), 10 (52) o 15 (53), de al menos un 70%, 80% u 85%, preferentemente al menos un 90%, de forma especialmente preferente al menos un 95% y de forma totalmente preferente al menos un 99% a lo largo de la longitud completa de la secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos de un anticuerpo tal como se describe aquí, por ejemplo tal como se describe en la tabla 3 o en las SEQ ID N°: 5(51), 10 (52) o 15 (53).

30

Estos anticuerpos codificados por el ARNm para su uso de acuerdo con la invención también incluyen anticuerpos de acuerdo con las SEQ ID N°: 5(51), 10 (52) o 15 (53) o de acuerdo con la tabla 3 que contienen o tienen, en una de las cadenas pesadas aquí descritas de acuerdo con las SEQ ID N°: 2, 7 o 12 y/o en una de las cadenas ligeras aquí descritas de acuerdo con las SEQ ID N°: 4, 9 o 14, una identidad de secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos de al menos un 70%, 80% u 85%, preferentemente al menos un 90%, de forma

35

especialmente preferente al menos un 95% y de forma totalmente preferente al menos un 99% a lo largo de la longitud completa de la secuencia codificadora para la cadena ligera y/o pesada particular, con una secuencia de anticuerpos codificadores, por lo demás inalterada, de las SEQ ID N°: 5(51), 10 (52) o 15 (53) o por ejemplo anticuerpos de la tabla 3.

- 5 En conjunto, con ayuda de la presente invención se proporciona una nueva vía para llevar a cabo terapias con anticuerpos basadas en ARNm. De este modo se pueden proporcionar anticuerpos clínicamente probados, por ejemplo inhibidores de la angiogénesis basados en anticuerpos, por ejemplo bevacizumab (anticuerpo de inmunoglobulina monoclonal G₁ que se une al factor de crecimiento vascular VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular); o trastuzumab (Herceptin), un inhibidor indirecto que inhibe la acción de proteínas tumorales en receptores, o por ejemplo rituximab o cetuximab (dirigidos contra el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR)), basado en ARN, de modo que el ARNm de la invención contiene al menos una región codificadora que codifica al menos uno de estos anticuerpos.

- 10 En una realización preferente, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención normalmente tiene además al menos una de las siguientes modificaciones, que preferiblemente son adecuadas para aumentar la estabilidad del ARNm codificador, mejorar la expresión del anticuerpo codificado por éste, aumentar la permeabilidad celular, posibilitar la localización del anticuerpo sobre o en determinados compartimentos celulares, etc. Cada una de estas modificaciones del ARNm para su uso de acuerdo con la invención aquí descrito (ARNm modificado), que se mencionan más abajo, se pueden combinar entre sí de forma adecuada, combinándose preferentemente entre sí las modificaciones que no interfieren entre sí ni influyen negativamente en la estabilidad o la permeabilidad celular del ARNm modificado codificador de anticuerpos de acuerdo con la invención ni en la expresión del anticuerpo codificado por el mismo. En la totalidad de la presente invención, la denominación "modificado" se equipara con el contenido de "opcionalmente modificado".

- 15 Las modificaciones del ARNm para su uso de acuerdo con la invención aquí descrito (ARNm modificado) pueden incluir, por ejemplo, modificaciones de los nucleótidos del ARN. Por tanto, un ARNm (ARNm modificado) para su uso de acuerdo con la invención puede incluir, por ejemplo, modificaciones de la estructura principal, modificaciones de azúcar o modificaciones de bases. En este contexto, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención normalmente contiene en primer lugar nucleótidos que se pueden seleccionar entre todos los nucleótidos naturales y análogos de los mismos (nucleótidos modificados), por ejemplo ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos. Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, los nucleótidos incluyen, de forma no limitativa, por ejemplo purinas (adenina (A), guanina (G)) o pirimidinas (timina (T), citosina (C), uracilo (U)), y como análogos de nucleótidos modificados o derivados de purinas y pirimidinas, por ejemplo 1-metiladenina, 2-metiladenina, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, N⁶-metiladenina, N⁶-isopenteniladenina, 2-tiocitosina, 3-metilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-metilcitosina, 2,6-diaminopurina, 1-metilguanina, 2-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 7-metilguanina, inosina, 1-metilinosina, pseudouracilo (5-uracilo), dihidrouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-uracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metiluracilo, N-uracil-5-oxiacetato de metilo, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5'-metoxicarbonilmetil-uracilo, 5-metoxiuracilo, uracil-5-oxiacetato de metilo, ácido uracil-5-oxiacético (v), 1-metilpseudouracilo, queosina, β-D-manosilqueosina, wybutoxosina, y fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos peptídicos, metilfosfonatos, 7-desazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina. Los expertos en la técnica conocen la preparación de estos análogos, por ejemplo por las patentes US 4.373.071, US 4.401.796, US 4.415.732, US 4.458.066, US 4.500.707, US 4.668.777, US 4.973.679, US 5.047.524, US 5.132.418, US 5.153.319, US 5.262.530 y 5.700.642.

- 20 En particular, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede contener modificaciones de la estructura principal del ARN. En relación con la presente invención, una modificación de la estructura principal es una modificación en la que los fosfatos de la estructura principal de los nucleótidos contenidos en el ARN se modifican químicamente. En este contexto, estas modificaciones de la estructura principal incluyen normalmente, de forma no limitativa, modificaciones del grupo consistente en metilfosfonatos, metilfosforamidatos, fosforamidatos, fosforotioatos (por ejemplo citidina 5'-O-(1-tiofosfato)), boranofosfatos, grupos guanidinio cargados positivamente, etc., lo que significa la sustitución del enlace fosfodiéster por otros grupos aniónicos, catiónicos o neutros.

- 25 Del mismo modo, un ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención también puede contener modificaciones de azúcar. En relación con la presente invención, una modificación de azúcar consiste en una modificación química del azúcar de los nucleótidos que contiene y normalmente incluye, de forma no limitativa, modificaciones de azúcar seleccionadas entre el grupo consistente en 2'-desoxi-2'-fluoro-oligorribonucleótido (2'-fluor-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato, 2'-fluor-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato), 2'-desoxi-2'-desamina-oligorribonucleótido (2'-amino-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato), 2'-O-alkiloligorribonucleótido, 2'-desoxi-2'-C-alkiloligorribonucleótido (2'-O-metilcitidina 5'-trifosfato, 2'-

metiluridina 5'-trifosfato), 2'-C-alquiloligorribonucleótido, e isómeros de los mismos (2'-aracitidina 5'-trifosfato, 2'-arauridina 5'-trifosfato), o azidotrifosfatos (2'-azido-2'-desoxicidina 5'-trifosfato, 2'-azido-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato).

5 No obstante, preferentemente, la secuencia de ARNm modificada para su uso de acuerdo con la invención no contiene modificaciones de azúcar ni modificaciones en la estructura principal, por ejemplo si es necesario realizar una transcripción *in vitro*. La razón de esta exclusión preferente radica en el problema de que determinadas modificaciones de la estructura principal y modificaciones de azúcar de secuencias de ARN por un lado pueden impedir o al menos reducir en gran medida la transcripción *in vitro* de las mismas. De este modo, una transcripción *in vitro* de eGFP llevada a cabo a modo de ejemplo solo funciona, por ejemplo, con las modificaciones de azúcar 2'-amino-2'-desoxiuridina 5'-fosfato, 2'-fluor-2'-desoxiuridina 5'-fosfato y 2'-azido-2'-desoxiuridina 5'-fosfato. Además, la traducción de la proteína, es decir, la expresión de la proteína, *in vitro* o *in vivo* normalmente se puede reducir de forma considerable a causa de las modificaciones de la estructura principal e, independientemente de ello, a causa de modificaciones de azúcar de secuencias de ARN. Esto se ha podido demostrar, por ejemplo, para la eGFP en relación con las modificaciones de la estructura principal y modificaciones de azúcar arriba seleccionadas.

20 Del mismo modo, un ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención también puede contener modificaciones de las bases de los nucleótidos que contiene (modificaciones de bases). Por tanto, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede estar modificado, por ejemplo, de modo que solo uno o varios de los nucleótidos del ARNm modificado se sustituyan por nucleótidos que tienen modificaciones de bases, que son preferiblemente adecuados para aumentar la expresión del anticuerpo codificado por el ARNm significativamente en comparación con la secuencia de ARNm no modificada, es decir, nativa. En este caso, "significativo" quiere decir un aumento en la expresión del anticuerpo en base a la secuencia de ARNm modificada en comparación con la secuencia de ARNm nativa de al menos un 20%, preferentemente al menos un 30%, 40%, 50% o 60%, de forma especialmente preferente de al menos un 70%, 80%, 90% o incluso 100%, y de forma totalmente preferente de al menos un 150%, 200% o incluso 300%. En relación con la presente invención, un nucleótido modificado que contiene una modificación de bases se denomina un nucleótido con bases modificadas y, de forma no limitativa, se selecciona preferentemente entre el grupo consistente en: 2-amino-6-cloropurina ribósido 5'-trifosfato, 2-aminoadenosina 5'-trifosfato, 2-tiocitidina 5'-trifosfato, 2-tiouridina 5'-trifosfato, 4-tiouridina 5'-trifosfato, 5-aminoalilcitidina 5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina 5'-trifosfato, 5-bromocitidina 5'-trifosfato, 5-bromouridina 5'-trifosfato, 5-yodocitidina 5'-trifosfato, 5-yodouridina 5'-trifosfato, 5-metilcitidina 5'-trifosfato, 5-metiluridina 5'-trifosfato, 6-azacitidina 5'-trifosfato, 6-azauridina 5'-trifosfato, 6-cloropurina ribósido 5'-trifosfato, 7-desazaadenosina 5'-trifosfato, 7-desazaguanosina 5'-trifosfato, 8-azaadenosina 5'-trifosfato, 8-azidoadenosina 5'-trifosfato, benzimidazol ribósido 5'-trifosfato, N1-metiladenosina 5'-trifosfato, N1-metilguanosa 5'-trifosfato, N6-metiladenosina 5'-trifosfato, O6-metilguanosa 5'-trifosfato, pseudouridina 5'-trifosfato, puromicina 5'-trifosfato o xantosina 5'-trifosfato. De forma particularmente preferente, los nucleótidos para modificaciones de bases se seleccionan entre el grupo de nucleótidos con bases modificadas consistente en 5-metilcitidina 5'-trifosfato y pseudouridina 5'-trifosfato.

40 De forma no limitativa, en este contexto los inventores atribuyen un aumento de la expresión del anticuerpo codificado por el ARN modificado (en las bases) para su uso de acuerdo con la invención, entre otras cosas, al aumento de la estabilización de estructuras secundarias y, en caso apropiado, a la estructura "más rígida" formada en el ARN y el mayor apilamiento de bases. Por ejemplo, se sabe que el pseudouridina 5'-trifosfato está presente naturalmente en ARN estructurales (ARNt, ARNr y ARNsn) en eucariontes y en procariontes. En este contexto, se supone que la pseudouridina es necesaria en el ARNr para estabilizar estructuras secundarias. En el curso de la evolución, el contenido de pseudouridina en ARN ha aumentado, y se ha podido demostrar, sorprendentemente, que la traducción depende de la presencia de pseudouridina en el ARNt y el ARNr, siendo intensificada presumiblemente la interacción entre el ARNt y el ARNm en este contexto. La conversión de uridina en pseudouridina tiene lugar mediante pseudouridina sintasa. En el caso del 5-metilcitidina 5'-trifosfato tiene lugar del mismo modo una modificación de ARN después de la transcripción, catalizada por metiltransferasas. Se supone que un aumento adicional del contenido de pseudouridina y la modificación de bases de otros nucleótidos conduce a efectos similares, lo que, a diferencia del aumento natural del contenido de pseudouridina en la secuencia, se puede llevar a cabo de forma dirigida y con una variabilidad considerablemente más amplia. Por tanto, para el 5-metilcitidina 5'-trifosfato y las otras modificaciones de bases aquí mencionadas se supone un mecanismo similar al del pseudouridina 5'-trifosfato, es decir, una mejor estabilización de estructuras secundarias y, en base a esto, una mayor eficiencia de traducción. Sin embargo, además de este aumento de expresión con base estructural, también se supone un efecto positivo en la traducción, independientemente de la estabilización de estructuras secundarias y una estructura "más rígida" del ARN. Otras causas del aumento de la expresión se pueden encontrar, posiblemente, en la menor tasa de degradación de las secuencias de ARN por ARNasas *in vitro* o *in vivo*.

60 Las modificaciones de los ARNm codificadores de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención, que se describen más arriba, se pueden introducir en el ARNm con ayuda de métodos conocidos por los expertos

- en la técnica. Métodos posibles para ello son, por ejemplo, métodos de síntesis utilizando aparatos de síntesis de oligonucleótidos (automáticos o semiautomáticos), métodos bioquímicos, por ejemplo métodos de transcripción *in vitro*, etc. Preferentemente, en este contexto, para las secuencias (más cortas) que generalmente no sobrepasan una longitud de 5'-100 nucleótidos, se pueden emplear métodos de síntesis donde se utilizan aparatos de síntesis de oligonucleótidos (automáticos o semiautomáticos) y también métodos de transcripción *in vitro*. Para las secuencias (más largas), que tienen por ejemplo una longitud de más de 50 a 100 nucleótidos, son preferibles métodos bioquímicos, por ejemplo métodos de transcripción *in vitro*, preferentemente un método de transcripción *in vitro* tal como se describe aquí, opcionalmente utilizando el ARN modificado de acuerdo con la invención.
- 5
- 10 Las modificaciones con nucleótidos tal como se describen aquí en un ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención pueden tener lugar en al menos un nucleótido (modificable) de la secuencia de ARN para su uso de acuerdo con la invención, preferentemente en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos (modificables), de forma especialmente preferente en al menos 10-20 nucleótidos (modificables), de forma todavía más preferente en al menos 10-100 nucleótidos (modificables) y de forma totalmente preferente en al menos 10-200, 10 a 1.000 o 10 a 10.000 o más nucleótidos (modificables), por ejemplo en todos ellos. Expresado de otro modo, las modificaciones en un ARN codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención pueden tener lugar en al menos un nucleótido (modificable) de la secuencia de ARN para su uso de acuerdo con la invención, preferentemente en al menos un 10% de todos los nucleótidos (modificables), de forma especialmente preferente en al menos un 25% de todos los nucleótidos (modificables), de forma todavía más preferente en al menos un 50% de todos los nucleótidos (modificables), de forma incluso más preferente en al menos un 75% de todos los nucleótidos (modificables) y de forma totalmente preferente en el 100% de los nucleótidos (modificables) contenidos en la secuencia de ARN de acuerdo con la invención. En este contexto, un "nucleótido modificable" es cualquier nucleótido (preferentemente natural (nativo) y por tanto no modificado) que debe cambiarse por un nucleótido modificado tal como se describe aquí. En este contexto se pueden modificar todos los nucleótidos de la secuencia de ARN, o solo determinados nucleótidos seleccionados de la secuencia de ARN. Si deben modificar todos los nucleótidos de la secuencia de ARN, el 100% de los "nucleótidos modificables" de la secuencia de ARN son todos los nucleótidos de la secuencia de ARN utilizada. Por otro lado, si solo se deben modificar determinados nucleótidos seleccionados de la secuencia de ARN, los nucleótidos seleccionados son, por ejemplo, adenosina, citidina, guanosina o uridina.
- 15
- 20
- 25
- 30 De este modo, por ejemplo, una adenosina de la secuencia nativa se puede cambiar por una adenosina modificada, una citidina por una citidina modificada, una uridina por una uridina modificada y una guanosina por una guanosina modificada. En este caso, el 100% de los "nucleótidos modificables" de la secuencia de ARN son el 100% de las adenosinas, citidinas, guanosinas y/o uridinas de la secuencia de ARN utilizada.
- 35 De acuerdo con otra realización especialmente preferente de la presente invención, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede incluir, por ejemplo, un contenido de GC modificado en comparación con la secuencia nativa de ARN (precursor) no modificada. De acuerdo con una primera alternativa del ARN codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención, el contenido de G/C de la región codificadora del ARNm de acuerdo con la invención es mayor que el contenido de G/C de la región codificadora de la secuencia de ARN nativa, permaneciendo la secuencia de aminoácidos codificada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo inalterada en comparación con el tipo silvestre, es decir, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo codificada por la secuencia de ARN nativa. En este contexto, la composición y la secuencia de los diversos nucleótidos desempeñan un papel principal. En particular, las secuencias que tienen un mayor contenido de G (guanina)/C (citocina) son más estables que las secuencias que tienen un mayor contenido de A (adenina)/U (uracilo). Por lo tanto, de acuerdo con la invención, los codones varían en comparación con el ARN de tipo silvestre, mientras que conservan la secuencia de aminoácidos traducida, de modo que incluyen una mayor cantidad de nucleótidos de G/C. Dado que varios codones codifican un mismo aminoácido (degeneración del código genético), se pueden determinar los codones más favorables para la estabilidad (uso de codones alternativos).
- 40
- 45
- 50 Dependiendo del aminoácido que deba codificar el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención, existen diversas posibilidades para modificar la secuencia nativa del ARN de acuerdo con la invención. En el caso de los aminoácidos codificados por codones que contienen exclusivamente nucleótidos G o C no se requiere ninguna modificación del codón. Por tanto, los codones para Pro (CCC o CCG), Arg (CGC o CGG), Ala (GCC o GCG) y Gly (GGC o GGG) no requieren ninguna modificación, ya que no presentan ninguna A ni U.
- 55 En los siguientes casos, los codones que contienen nucleótidos A y/o U se modifican por sustitución de otros codones que codifican los mismos aminoácidos pero que no contienen ninguna A y/o U. Como ejemplos se mencionan:
- los codones para Pro se pueden modificar de CCU o CCA a CCC o CCG;
 - los codones para Arg se pueden modificar de CGU o CGA o AGA o AGG a CGC o CGG;

ES 2 614 901 T3

- los codones para Ala se pueden modificar de GCU o GCA a GCC o GCG;
- los codones para Gly se pueden modificar de GGU o GGA a GGC o GGG.

En otros casos, aunque no sea posible eliminar los nucleótidos A o U de los codones, sí es posible disminuir el contenido de A y U utilizando codones que contienen menos nucleótidos A y/o U. Por ejemplo:

- 5
- los codones para Phe se pueden modificar de UUU a UUC;
 - los codones para Leu se pueden modificar de UUA, CUU o CUA a CUC o CUG;
 - los codones para Ser se pueden modificar de UCU o UCA o AGU a UCC, UCG o AGC;
 - el codón para Tyr se puede modificar de UAU a UAC;
 - el codón de terminación UAA se puede modificar a UAG o UGA;
- 10
- el codón para Cys se puede modificar de UGU a UGC;
 - el codón para His se puede modificar de CAU a CAC;
 - el codón para Gln se puede modificar de CAA a CAG;
 - los codones para Ile se pueden modificar de AUU o AUA a AUC;
 - los codones para Thr se pueden modificar de ACU o ACA a ACC o ACG;
- 15
- el codón para Asn se puede modificar de AAU a AAC;
 - el codón para Lys se puede modificar de AAA a AAG;
 - los codones para Val se pueden modificar de GUU o GUA a GUC o GUG;
 - el codón para Asp se puede modificar de GAU a GAC;
 - el codón para Glu se puede modificar de GAA a GAG.
- 20
- Por otro lado, en el caso de los codones para Met (AUG) y Trp (UGG) no existe ninguna posibilidad de modificación de secuencia.

Evidentemente, las sustituciones arriba citadas se pueden utilizar individualmente o también en todas las combinaciones posibles para aumentar el contenido de G/C del ARN codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención en comparación con la secuencia de ARN nativa (y la secuencia de ácidos nucleicos, respectivamente). Por ejemplo, todos los codones para Thr presentes en la secuencia de ARN nativa se pueden modificar a ACC (o ACG). Sin embargo, preferentemente se utilizan combinaciones de las posibilidades de sustitución arriba indicadas, por ejemplo:

- 30
- sustitución de todos los codones codificadores de Thr en la secuencia de ARN nativa por ACC (o ACG) y sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Ser por UCC (o UCG o AGC);
 - sustitución de todos los codones codificadores de Ile en la secuencia de ARN nativa por AUC, sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Lys por AAG y sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Tyr por UAC;
 - sustitución de todos los codones codificadores de Val en la secuencia de ARN nativa por GUC (o GUG), sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Glu por GAG, sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Ala por GCC (o GCG) y sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Arg por CGC (o CCG);
- 35
- sustitución de todos los codones codificadores de Val en la secuencia de ARN nativa por GUC (o GUG), sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Glu por GAG, sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Ala por GCC (o GCG), sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Gly por GGC (o GGG) y sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Asn por AAC;
- 40
- sustitución de todos los codones codificadores de Val en la secuencia de ARN nativa por GUC (o GUG), sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Phe por UUC, sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Cys por UGC, sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Leu por CUG (o CUC), sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Gln por CAG y sustitución de todos los codones originalmente codificadores de Pro por CCC (o CCG); etc.
- 45

- Preferentemente, el contenido de G/C de la región codificadora del ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención se aumenta en comparación con el contenido de G/C de la región codificadora del ARN nativo de tal modo que se modifica al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25% o de forma especialmente preferente al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50% o al menos un 55%, de forma todavía más preferente al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70% o al menos un 75%, y de forma totalmente preferente al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 100% de los codones modificables posibles de la región codificadora del ARN nativo (y el ácido nucleico, respectivamente).
- 50

En este contexto, de forma particularmente preferente el contenido de G/C del ARNm codificador de anticuerpos de acuerdo con la invención se aumenta al máximo, en particular en la región codificadora, en comparación con la secuencia de ARN nativa.

- 5 Una segunda alternativa del ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención con modificaciones se basa en el conocimiento de que la eficiencia de traducción del ARN también está determinada por una frecuencia diferente en la presencia de ARNt en las células. Si una secuencia de ARN presenta un gran número de los denominados codones "raros", el ARN correspondiente se traduce en un grado significativamente peor que en el caso de la presencia de codones que codifican ARNt relativamente "frecuentes".
- 10 Por consiguiente, de acuerdo con esta segunda alternativa del ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención, la región codificadora del ARNm de acuerdo con la invención está modificada en comparación con la región codificadora del ARN nativo de modo que al menos un codón del ARN nativo, que codifica un ARNt que es relativamente raro en la célula, está sustituido por un codón que codifica un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y que porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.
- 15 Mediante esta modificación, la secuencia del ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención está modificada de modo que tiene insertados codones para los que están disponibles ARNt frecuentemente presentes. Los expertos en la técnica saben qué ARNt están presentes de forma relativamente frecuente en la célula y, en cambio, cuales son relativamente raros; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666.
- 20 De acuerdo con la invención, mediante esta modificación, todos los codones de la secuencia del ARNm codificador de anticuerpos de acuerdo con la invención que codifican un ARNt relativamente raro en la célula pueden sustituirse por un codón que codifica un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y que porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.
- 25 De forma particularmente preferente, el contenido elevado, en particular máximo, de G/C secuencial en el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención se vincula con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos codificada por el ARNm de acuerdo con la invención. Esta realización preferente proporciona una secuencia de ARNm de acuerdo con la invención traducida y estabilizada de forma particularmente eficiente, que codifica un anticuerpo (por ejemplo para una composición farmacéutica de acuerdo con la invención).
- 30 Las secuencias de ARN eucariontes presentan normalmente elementos de secuencia desestabilizadores (DSE) a los que se unen proteínas señal, que regulan la degradación enzimática del ARN *in vivo*. Opcionalmente, para una mayor estabilización del ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención, en la región codificadora de la proteína se llevan a cabo una o más modificaciones en comparación con la región correspondiente del ARN nativo. Evidentemente, de acuerdo con la invención
- 35 también es preferible, en caso apropiado, eliminar en el ARN los DSE presentes en las regiones no traducidas (3' y/o 5' UTR).
- Estas secuencias desestabilizadoras son, por ejemplo, secuencias ricas en AU ("AURES"), que están presentes en secciones 3' UTR de numerosos ARN inestables (Caput *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83: 1670 a 1674). Por consiguiente, el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la
- 40 invención preferentemente está modificado en comparación con el ARN nativo de modo que ya no contiene ninguna de dichas secuencias desestabilizadoras. Esto también es aplicable a los motivos de secuencia reconocidos por posibles endonucleasas, por ejemplo la secuencia GAACAAG, que está contenida en el segmento 3' UTR del gen que codifica el receptor de transferrina (Binder *et al.*, EMBO J. 1994, 13: 1969 a 1980). Preferentemente, estos motivos de secuencia también están eliminados en el ARNm codificador de
- 45 anticuerpos de acuerdo con la invención.
- Los expertos en la técnica están familiarizados con diversos métodos que son adecuados en el presente caso para la sustitución de codones en ARN, es decir, la sustitución de codones en el ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención. En caso de regiones codificadoras relativamente cortas (que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpo tal como se describen aquí), por ejemplo, el ARNm
- 50 codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención completo se puede sintetizar químicamente utilizando técnicas estándar conocidas por los expertos.
- No obstante, las sustituciones de bases se introducen preferentemente utilizando un molde de ADN para la preparación del ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención con ayuda de técnicas de mutagénesis dirigida usual (véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory
- 55 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed., Cold Spring Harbor, NY, 2001). En este método, para la

preparación del ARN codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención, una molécula de ADN correspondiente se transcribe *in vitro* (véase más abajo). Este molde de ADN tiene opcionalmente un promotor adecuado, por ejemplo un promotor T3, T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, que está seguido por la secuencia de nucleótidos deseada para el ARN codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención que se ha de preparar y una señal de terminación para la transcripción *in vitro*. La molécula de ADN que forma el molde del constructo de ARNm codificador de anticuerpos a preparar se puede preparar por proliferación fermentativa y posterior aislamiento como parte de un plásmido que puede ser replicado en bacterias. Plásmidos que se pueden mencionar como adecuados para ello son, por ejemplo, los plásmidos pT7Ts (número de acceso GenBank U26404; Lai *et al.*, Development 1995, 121: 2349 a 2360), la serie pGEM®, por ejemplo pGEM®-1 (número de acceso GenBank X65300; de Promega) y pSP64 (número de acceso GenBank X65327); véase también Mezei y Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin and Griffin (ed.), PCR Technology: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

Por tanto, utilizando oligonucleótidos de ARN o ADN sintéticos cortos, que contienen transiciones monocatenarias cortas en los sitios de segmentación formados, o genes preparados mediante síntesis química, es posible clonar la secuencia de nucleótidos deseada en un plásmido adecuado mediante métodos de biología molecular conocidos por los expertos en la técnica (véase Maniatis *et al.*, (2001) supra). Después, la molécula de ARN o ADN se separa del plásmido, en el que puede estar presente en una o varias copias, mediante digestión con endonucleasas de restricción.

De acuerdo con una realización particular de la presente invención, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención arriba descrito puede tener además una estructura de caperuza 5' (un nucleótido de guanosina modificado). Ejemplos de estructuras de caperuza que se pueden mencionar de forma no limitativa son m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G.

De acuerdo con otra realización preferente de la presente invención, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención contiene una cola poli-A en el extremo 3', normalmente de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de adenosina, preferentemente de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de adenosina, de forma especialmente preferente de aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de adenosina o de forma todavía más preferente de aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de adenosina.

De acuerdo con otra realización preferente de la presente invención, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención contiene una cola poli-C en el extremo 3', normalmente de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de citosina, preferentemente de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citosina, de forma especialmente preferente de aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de citosina o de forma todavía más preferente de aproximadamente 20 a 60 o incluso 10 a 40 nucleótidos de citosina. La cola poli-C se puede añadir a la cola poli-A o puede sustituir a la cola poli-A.

De acuerdo con otra realización preferente, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede contener adicionalmente una sección de ácido nucleico que codifica una etiqueta de purificación. Estas etiquetas incluyen por ejemplo, de forma no limitativa, una etiqueta hexahistidina (etiqueta His, etiqueta de polihistidina), una etiqueta de estreptavidina (etiqueta Strep), una etiqueta SBP (etiqueta de unión de estreptavidina), una etiqueta de GST (glutatión S transferasa), etc. El ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede codificar además una etiqueta para purificación a través de un epítipo de anticuerpo (etiqueta de unión de anticuerpo), por ejemplo una etiqueta Myc, un epítipo Swa11, una etiqueta FLAG, una etiqueta HA, etc., es decir, a través del reconocimiento del epítipo por medio del anticuerpo (inmovilizado).

Para una traducción eficiente de ARN, en particular ARNm, es necesaria una unión eficaz de los ribosomas en el sitio de unión de ribosomas (secuencia Kozak: GCCGCCACCAUGG (SEQ ID N°: 16), el AUG forma el codón de iniciación). A este respecto se ha comprobado que un aumento del contenido de A/U alrededor de este sitio posibilita una unión más eficiente de los ribosomas al ARN. Por consiguiente, de acuerdo con otra realización preferente de la presente invención, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede tener un contenido aumentado de A/U alrededor del sitio de unión de ribosomas, preferentemente un contenido de A/U aumentado en un 5 a un 50%, de forma especialmente preferente aumentado en un 25 a un 50% o más, en comparación con el ARN nativo.

Además, de acuerdo con una realización del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención es posible insertar uno o más IRES (*internal ribosomal entry site* - sitio de entrada interna del ribosoma) en el ARN. Un IRES puede funcionar como el único sitio de unión de ribosomas, pero también puede servir para proporcionar un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención que codifica varios anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, o al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que han de ser traducidos por los ribosomas independientemente entre sí ("ARN multicistrónico"). Un ARNm de este tipo puede codificar, por ejemplo, una secuencia completa de un anticuerpo,

estando las regiones codificadoras correspondientes de la cadena pesada y la cadena ligera unidas (funcionalmente) entre sí por una secuencia IRES. No obstante, la cadena pesada y la cadena ligera que han de ser codificadas por el ARNm también pueden estar localizadas en un único "cistrón". De acuerdo con la invención, las secuencias IRES descritas se emplean en particular para la expresión (prácticamente) simultánea y uniforme de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo codificado por el ARNm de acuerdo con la invención. Como ejemplos de secuencias IRES que pueden emplearse de acuerdo con la invención se mencionan las de picornavirus (por ejemplo FMDV), pestivirus (CFFV), poliovirus (PV), virus de la encefalitis y miocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus de la leucemia murcha (MLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), virus de parálisis "cricket" (CrPV) o una secuencia SIRES.

De acuerdo con otra realización preferente de la presente invención, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención tiene, en las regiones no traducidas 5' y/o 3', secuencias estabilizadoras capaces de aumentar la vida media del ARN en el citosol. Estas secuencias estabilizadoras pueden tener un 100% de homología de secuencia con respecto a secuencias naturales presentes en virus, bacterias y eucariontes, pero también pueden ser de naturaleza parcial o completamente sintética. Como ejemplos de secuencias estabilizadoras que pueden emplearse en la presente invención se pueden mencionar las secuencias no traducidas (UTR) del gen de β -globina, por ejemplo de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis*. Otro ejemplo de secuencia estabilizadora tiene la fórmula general (C/U)CCANxCCC(U/A)PyxUC(C/U)CC (SEQ ID N°: 17), que está contenida en el 3' UTR del ARN muy estable que codifica α -globina, α -(I)-colágeno, 15-lipoxigenasa o tirosina hidroxilasa (véase Holcik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 a 2414). Evidentemente, estas secuencias estabilizadoras pueden ser utilizadas individualmente o en combinación entre sí, y también en combinación con otras secuencias estabilizadoras conocidas por los expertos en la técnica.

En otra realización preferente, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede codificar un péptido señal secretor, además de los anticuerpos tal como se describen aquí. Estos péptidos señal son secuencias (señal) que presentan convencionalmente una longitud de 15 a 30 aminoácidos y que preferentemente están localizados en el extremo N del anticuerpo codificado. Los péptidos señal normalmente posibilitan el transporte de una proteína o un péptido fusionados con los mismos (en este caso por ejemplo un anticuerpo) hasta un compartimento definido o hasta dentro de éste, preferentemente la superficie celular, el retículo endoplasmático o el compartimento endosomal-lisosomal. Las secuencias señal que pueden emplearse de acuerdo con la invención son, por ejemplo, secuencias señal de moléculas MHC convencionales y no convencionales, citoquinas, inmunoglobulinas, la cadena invariable, Lamp1, tapasina, Erp57, calreticulina y calnexina, y todas las demás proteínas localizadas en la membrana asociadas con el endosoma-lisosoma o el retículo endoplasmático. Preferiblemente se utiliza el péptido señal de la molécula de MHC clase I humana HLA-A*0201.

Las secuencias que posibilitan el transporte de una proteína o un péptido fusionados con las mismas (en este caso por ejemplo un anticuerpo) hasta un compartimento definido o hasta dentro de éste, preferentemente la superficie celular, el núcleo, la región del núcleo, la membrana plasmática, el citosol, el retículo endoplasmático, los orgánulos, la mitocondria, el aparato de Golgi o el compartimento endosomal-lisosomal, también incluyen, de forma no limitativa, las llamadas señales de encaminamiento, señales de clasificación, señales de retención o señales de salvamento y señales de transferencia de detención de topología de membrana (véase Pugsley, A. P., Protein Targeting, Academic Press, Inc. (1989)) en el nivel del ARN de acuerdo con la invención. En este contexto, las secuencias de localización incluyen secuencias de ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, señales, es decir, secuencias de aminoácidos, por ejemplo KDEL (SEQ ID N°: 18) (Munro, *et al.*, Cell 48:899-907 (1987)) DDEL (SEQ ID N°: 19), DEEL (SEQ ID N°: 20), QEDL (SEQ ID N°: 21) y RDEL (SEQ ID N°: 22) (Hangejorden, *et al.*, J. Biol. Chem. 266:6015 (1991)) para el retículo endoplasmático; PKKKRKV (SEQ ID N°: 23) (Lanford, *et al.* Cell 46:575 (1986)) PQQKIKS (SEQ ID N°: 24) (Stanton, L. W., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1772 (1986)); QPKKP (SEQ ID N°: 25) (Harlow, *et al.*, Mol. Cell Biol. 5:1605 1985), y RKKR (SEQ ID N°: 26) para el núcleo; y RKKRRQRRRAHQ (SEQ ID N°: 27) (Seomi, *et al.*, J. Virology 64: 1803 (1990)), RQARRNRRRRWRERQR (SEQ ID N°: 28) (Kubota, *et al.*, Biochem. and Biophys. Res. Comm. 162:963 (1989)), y MPLTRRRPAASQALAPPTP (SEQ ID N°: 29) (Siomi, *et al.*, Cell 55:197 (1988)) para la región del núcleo; MDDQRDLISNNEQLP (SEQ ID N°: 30) (Bakke, *et al.*, Cell 63:707-716 (1990)) para el compartimento endosomal (véase, por ejemplo, Letourneur, *et al.*, Cell 69:1183 (1992) para la fijación de liposomas como dianas). Además, se pueden utilizar secuencias de miristoilación para conducir la proteína o el péptido expresados (en este caso por ejemplo un anticuerpo) hasta la membrana plasmática, o hasta determinados compartimentos subcelulares, como la región del núcleo, los orgánulos, la mitocondria y el aparato de Golgi. Más abajo se indican secuencias de aminoácidos correspondientes codificadas por una secuencia de codones correspondiente del ARNm para su uso de acuerdo con la invención. La secuencia MLFNLRXLNNAAFRHGHNFMRNFRCGQLPX (SEQ ID N°: 31) puede ser utilizada para conducir el anticuerpo hasta la matriz mitocondrial (Pugsley, supra). Véase Tang, *et al.*, J. Bio. Chem. 207:10122, en relación con la localización de proteínas (anticuerpos) en el aparato de Golgi; para la localización de proteínas en la membrana plasmática: GVCSSNP (SEQ ID N°: 32), GQVTTPL (SEQ ID N°: 33), GQELSQHE (SEQ ID

Nº: 34), GNSPSYNP (SEQ ID Nº: 35), GVSGSKGQ (SEQ ID Nº: 36), GQTITTP (SEQ ID Nº: 37), GQTLTTP (SEQ ID Nº: 38), GQIFSRSA (SEQ ID Nº: 39), GQIHGLSP (SEQ ID Nº: 40), GARASVLS (SEQ ID Nº: 41) y GCTLSAEE (SEQ ID Nº: 42); para el retículo endoplasmático GQNLSTSN (SEQ ID Nº: 43); para el núcleo GAALTILV (SEQ ID Nº: 44) y GAALLLG (SEQ ID Nº: 45); para el retículo endoplasmático y el citoplasma GAQVSSQK (SEQ ID Nº: 46) y GAQLSRNT (SEQ ID Nº: 47); para el aparato de Golgi, el núcleo, el citoplasma y el citoesqueleto: GNAAAkk (SEQ ID Nº: 48); para el citoplasma y el citoesqueleto GNEASYPL (SEQ ID Nº: 49); y para la membrana plasmática y el citoesqueleto GSSKSKPK (SEQ ID Nº: 50). Estas secuencias arriba descritas se utilizan preferentemente para ARNm que codifican intracuerpos, es decir, anticuerpos que están retenidos en la célula y no son segregados.

10 Los expertos en la técnica pueden incorporar de forma adecuada las modificaciones aquí descritas en la secuencia de ARNm codificadora de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el ARNm modificado óptimo de acuerdo con la invención se puede determinar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo el contenido de G/C se puede adaptar manualmente y/o con un método automático tal como se da a conocer en el documento WO 02/098443. En este contexto, las secuencias de ARNm se pueden adaptar con los siguientes diversos objetivos de optimización adicionales: La adaptación se puede llevar a cabo, por un lado, con el mayor contenido posible de G/C y, por otro lado, teniendo en cuenta del mejor modo posible la frecuencia de los ARNt de acuerdo con el uso de codones. En este contexto, en el primer paso del método se lleva a cabo una traducción virtual de cualquier secuencia de ARN (o ADN) deseada para generar la secuencia de aminoácidos correspondiente. A partir de la secuencia de aminoácidos se lleva a cabo una traducción inversa virtual que proporciona posibilidades de selección para los codones correspondientes en base al código genético degenerado. Para la selección de los codones adecuados se utilizan listas de selección y algoritmos de optimización correspondientes, en función de la optimización o modificación requerida. El algoritmo se ejecuta normalmente en un ordenador con ayuda de un *software* adecuado. De este modo se establece la secuencia de ARNm optimizada, que se puede mostrar, por ejemplo, con ayuda de un dispositivo de visualización apropiado y comparar con la secuencia original (de tipo silvestre). Lo mismo también es aplicable a la frecuencia de los nucleótidos individuales. En este contexto, preferentemente se destacan los cambios en comparación con la secuencia de nucleótidos original. De acuerdo con una realización preferente también está prevista una lectura de secuencias estables que son conocidas en la naturaleza y que pueden proporcionar la base para un ARNm estabilizado de acuerdo con motivos de secuencia naturales. Del mismo modo se puede prever un análisis de estructura secundaria que pueda analizar propiedades de estabilización y desestabilización o, respectivamente, regiones del ARNm con ayuda de cálculos estructurales.

Además, de acuerdo con una realización preferente, la transferencia efectiva del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención al interior de las células que se han de tratar o el organismo que se ha de tratar se puede mejorar mediante la formación de complejos del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos con un péptido o una proteína catiónica o uniéndolo a éstos. Esta formación de complejos/condensación del ARNm, en particular ARNm, incluye por ejemplo la formación de complejos (o unión) del ARNm para su uso de acuerdo con la invención con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s), en particular proteína(s) policatiónica(s), o péptido(s). Preferentemente, un ARNm para su uso de acuerdo con la invención se convierte en complejos o se condensa con al menos un agente catiónico o policatiónico. Preferiblemente, dicho agente catiónico o policatiónico es un agente que se selecciona entre el grupo consistente en protamina, poli-L-lisina, poli-L-arginina, nucleolina, espermina e histonas, nucleolina o derivados de la misma. El uso de protamina como proteína policatiónica de unión de ácidos nucleicos es particularmente preferente. Este procedimiento para estabilizar ARNm se describe, por ejemplo, en el documento EP-A-1083232.

De acuerdo con una realización particular, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede contener una modificación de lípido. Este ARNm modificado con un lípido comprende normalmente un ARNm codificador de anticuerpos tal como se define aquí, al menos un conector enlazado de forma covalente con dicho ARNm y al menos un lípido enlazado covalentemente al conector particular. Alternativamente, el ARNm (modificado) para su uso de acuerdo con la invención modificado con un lípido comprende (al menos) un ARNm (modificado) tal como se define aquí y al menos un lípido (bifuncional) enlazado de forma covalente con dicho ARNm. De acuerdo con una tercera alternativa, el ARNm (modificado) para su uso de acuerdo con la invención modificado con un lípido comprende un ARNm (modificado) tal como se define aquí, al menos un conector enlazado de forma covalente con dicho ARNm y al menos un lípido enlazado de forma covalente al conector particular y al menos un lípido (bifuncional) enlazado de forma covalente (sin conector) con dicho ARNm (modificado).

El lípido empleado para la modificación de lípido del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención normalmente es un lípido o un residuo lipófilo que preferiblemente es biológicamente activo *per se*. Estos lípidos incluyen preferentemente sustancias o compuestos naturales, por ejemplo vitaminas, por ejemplo α -tocoferol (vitamina E), incluyendo RRR- α -tocoferol (antiguamente D- α -

tocoferol), L- α -tocoferol, el racemato D,L- α -tocoferol, vitamina E succinato (VES) o vitamina A y derivados de la misma, por ejemplo ácido retinoico, retinol, vitamina D y derivados de la misma, por ejemplo vitamina D y precursores de ergosterol de la misma, vitamina E y derivados de la misma, vitamina K y derivados de la misma, por ejemplo vitamina K y compuestos de quinona o fitol relacionados, o esteroides, como ácidos biliares, por ejemplo ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido deshidrocólico, cortisona, digoxigenina, testosterona colesterol o tiocolesterol. Otros lípidos o residuos lipófilos en el contexto de la presente invención incluyen, de forma no limitativa, polialquilenglicoles (Oberhauser *et al.*, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533), grupos alifáticos, por ejemplo alcanos(C₁-C₂₀), alquenos(C₁-C₂₀), o compuestos alcanol(C₁-C₂₀), etc., por ejemplo residuos de dodecanodiol, hexadecanol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J, 1991, 10, 111; Kabanov *et al.*, FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk *et al.*, Biochimie, 1993, 75, 49), fosfolípidos, como por ejemplo fosfatidilglicerol, diacilfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, dihexadecil-rac-glicerol, esfingolípidos, cerebrósidos, gangliósidos, o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea *et al.*, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777), poliaminas o polialquilenglicoles, por ejemplo polietilenglicol (PEG) (Manoharan *et al.*, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969), hexaetilenglicol (HEG), palmitina, o residuos de palmitilo (Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229), octadecilaminas, o residuos de hexilaminocarboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923), y ceras, terpenos, hidrocarburos alicíclicos, residuos de ácidos grasos saturados, mono- o poliinsaturados, etc.

El enlace entre el lípido y el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede tener lugar en principio en cualquier nucleótido, en la base o el residuo de azúcar de cualquier nucleótido, en el extremo 3' y/o 5', y/o en la estructura principal de fosfato del ARN (modificado) codificador de anticuerpos. De acuerdo con la invención es particularmente preferente una modificación de lípido terminal del ARNm (modificado) para su uso de acuerdo con la invención en el extremo 3' y/o 5' de éste. Una modificación terminal tiene varias ventajas en comparación con modificaciones dentro de la secuencia. Por un lado, las modificaciones dentro de la secuencia pueden influir en las propiedades de hibridación, lo que puede influir negativamente en el caso de residuos con requisitos estéricos. Las modificaciones (de demanda estérica) dentro de la secuencia también pueden interferir muy frecuentemente en la traducción, lo que con frecuencia puede conducir a una interrupción de la síntesis de proteínas. Por otro lado, en el caso de la preparación por síntesis de un ARNm (modificado) modificado con lípido para su uso de acuerdo con la invención que solo está modificado de forma terminal, la síntesis de dicho ARNm (modificado) codificador de anticuerpos se lleva a cabo con monómeros que están comercialmente disponibles en grandes cantidades y se utilizan protocolos de síntesis conocidos en el estado anterior de la técnica.

De acuerdo con una primera realización preferente, el enlace tiene lugar entre el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención y al menos un lípido a través de un conector (enlazado de forma covalente con el ARN (modificado)). En el contexto de la presente invención, los conectores contienen normalmente al menos dos y opcionalmente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30 o más grupos reactivos seleccionados, por ejemplo, entre un grupo hidroxilo, amino, alcoxi, etc. Un grupo reactivo sirve preferentemente para unir el ARN (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención aquí descrito. Este grupo reactivo puede estar en una forma protegida, por ejemplo como un grupo DMT (cloruro de dimetoxitritilo), como un grupo Fmoc, como un grupo MMT (monometoxitritilo), como un grupo TFA (ácido trifluoroacético), etc. Los grupos de azufre también pueden estar protegidos por disulfuros, por ejemplo alquiltioles, por ejemplo 3-tiopropanol, o con componentes activados, como 2-tiopiridina. De acuerdo con la invención, uno o más grupos reactivos adicionales sirven para el enlace covalente de uno o más lípidos. Por tanto, de acuerdo con la primera realización, un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención se puede unir con al menos un lípido a través del conector enlazado de forma covalente, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-20, 20-30 o más lípidos, de forma particularmente preferente al menos 3-8 o más lípidos por ARNm (modificado). En este contexto, los lípidos unidos pueden estar unidos independientemente entre sí en diversas posiciones del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención, pero también pueden estar en forma de un complejo en una o más posiciones del ARNm (modificado). Un grupo reactivo adicional del conector puede ser utilizado para la unión directa o indirecta (segmentable) con un material de soporte, por ejemplo una fase sólida. Conectores preferentes de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, glicol, glicerol y derivados de glicerol, 2-aminobutil-1,3-propanodiol y derivados/matriz de 2-aminobutil-1,3-propanodiol, conectores de pirrolidina o moléculas orgánicas que contienen pirrolidina (en particular para una modificación en el extremo 3'), etc. De acuerdo con la invención, de forma particularmente preferente, como conectores se utilizan glicerol o derivados de glicerol (ancla C₃) o un derivado/matriz de 2-aminobutil-1,3-propanodiol (ancla C₇). Un derivado de glicerol (ancla C₃) como conector es particularmente preferente si la modificación de lípido se puede introducir a través de un enlace de éter. Si la modificación de lípido se ha de introducir por ejemplo a través de una amida o un enlace de uretano, es preferible por ejemplo una matriz de 2-aminobutil-1,3-propanodiol (ancla C₇). En este contexto, la unión formada entre el conector y el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención preferiblemente es compatible con las condiciones y las sustancias químicas de la química de la amida, es decir, preferiblemente no es sensible a los ácidos ni bases. En particular, son preferentes los

enlaces a los que se puede acceder fácilmente de forma sintética y que no son hidrolizados por el procedimiento de segmentación amoniaca de un proceso de síntesis de ácidos nucleicos. En principio, los enlaces posibles son todos los enlaces apropiadamente adecuados, preferentemente enlaces éster, enlaces amida, enlaces uretano y enlaces éter. Además de la buena accesibilidad de los eductos (pocas etapas de síntesis), el enlace éter es particularmente preferente en este contexto por su estabilidad biológica relativamente alta frente a la hidrólisis enzimática.

De acuerdo con una segunda realización preferente, la unión de (al menos un) ARNm (modificado) para la modificación de lípido del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención tiene lugar directamente con al menos un lípido (bifuncional) tal como se describe aquí, es decir, sin utilizar un conector tal como se describe aquí. En este caso, el lípido (bifuncional) de acuerdo con la invención contiene preferentemente al menos dos grupos reactivos, u opcionalmente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más grupos reactivos, sirviendo un primer grupo reactivo para unir directa o indirectamente el lípido a un material de soporte aquí descrito y sirviendo al menos otro grupo reactivo para la unión del ARNm (modificado). Por tanto, de acuerdo con una segunda realización, un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención se puede unir preferentemente con al menos un lípido (directamente sin ningún conector), por ejemplo con 1, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-20, 20-30 o más lípidos, de forma particularmente preferente al menos 3-8 o más lípidos por ARNm (modificado). En este contexto, los lípidos unidos pueden estar unidos de forma independiente entre sí en diversas posiciones del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención, pero también pueden estar en forma de un complejo en una o más posiciones del ARNm (modificado). Alternativamente, de acuerdo con una segunda realización, al menos un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos, por ejemplo opcionalmente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30 o más ARNm (modificados) para su uso de acuerdo con la invención puede estar unido con un lípido tal como se describe más arriba a través de grupos reactivos del mismo. De forma particularmente preferente, los lípidos que pueden ser utilizados para esta segunda realización incluyen lípidos (bifuncionales) que posibilitan un acoplamiento (preferentemente en sus extremos u opcionalmente de forma intramolecular), por ejemplo polietilenglicol (PEG) y derivados del mismo, hexaetilenglicol (HEG) y derivados del mismo, alcanodiolos, aminoalcanos, tioalcanos, etc. La unión entre un lípido (bifuncional) y un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención tal como se describe más arriba es preferiblemente tal como se ha descrito en relación con la primera realización. De acuerdo con una tercera realización, la unión entre el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos y al menos un lípido tal como se describe aquí para la modificación de lípido del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención tiene lugar simultáneamente a través de las dos realizaciones arriba mencionadas. Por tanto, por ejemplo, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención se puede unir en una posición del ARN con al menos un lípido a través de un conector (de forma análoga a la 1ª realización) y en otra posición del ARNm (modificado) directamente con al menos un lípido sin utilizar ningún conector (de forma análoga a la 2ª realización). Por ejemplo, al menos un lípido tal como se describe aquí se puede enlazar de forma covalente con el ARN en el extremo 3' del ARNm (modificado) a través de un conector, y un lípido tal como se describe aquí se puede enlazar de forma covalente con el ARN en el extremo 5' del ARNm (modificado) sin ningún conector. Alternativamente, al menos un lípido tal como se describe aquí se puede enlazar de forma covalente con el ARNm (modificado) en el extremo 5' de un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención a través de un conector, y un lípido tal como se describe aquí se puede enlazar de forma covalente con el ARNm (modificado) en el extremo 3' del ARNm (modificado) sin ningún conector. Los enlaces covalentes pueden tener lugar igualmente no solo en los extremos del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención, sino también de forma intramolecular, tal como se describe más arriba, por ejemplo sobre el extremo 3' y de forma intramolecular, sobre el extremo 5' y de forma intramolecular, sobre los extremos 3' y 5' y de forma intramolecular, exclusivamente de forma intramolecular, etc.

El ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención aquí descrito se puede preparar por procesos de preparación conocidos en el estado anterior de la técnica, por ejemplo automática o manualmente mediante síntesis de ácidos nucleicos conocidas (véase, por ejemplo, Maniatis *et al.* (2001) *supra*) o también con métodos de biología molecular, por ejemplo con purificación subsiguiente, por ejemplo métodos cromatográficos.

De acuerdo con la presente invención, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede emplearse para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores y enfermedades cancerosas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunes, por ejemplo en la terapia génica. Una composición farmacéutica en el contexto de la presente invención comprende un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos tal como se describe aquí y opcionalmente un soporte farmacéuticamente adecuado y/o otros adyuvantes y aditivos. Normalmente, la composición farmacéutica empleada de acuerdo con la presente invención comprende una cantidad segura y efectiva de un ARNm (modificado) tal como se describe aquí. Tal como se utiliza aquí, "cantidad segura y efectiva" significa una cantidad del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con

la invención que es suficiente para inducir de forma significativa, mediante expresión del anticuerpo codificado, un cambio positivo de una afección que a tratar, por ejemplo una enfermedad tumoral o enfermedad cancerosa, una enfermedad cardiovascular o una enfermedad infecciosa, tal como se describe más abajo. Sin embargo, al mismo tiempo, una "cantidad segura y efectiva" es suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves en la terapia de dichas enfermedades, es decir, para posibilitar una relación razonable ventaja/riesgo. La determinación de estos límites está normalmente dentro del ámbito del criterio médico razonable. Por tanto, la concentración del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención en estas composiciones farmacéuticas puede variar, por ejemplo, de forma no limitativa, dentro de un amplio margen, por ejemplo entre 0,1 ng y 1.000 mg/ml. Dicha "cantidad segura y efectiva" de un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención puede variar en relación con la afección particular a tratar y la edad y el estado físico del paciente, la gravedad de la enfermedad, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concomitante, el soporte farmacéuticamente adecuado particular utilizado y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del médico que aplica el tratamiento. La composición farmacéutica aquí descrita se puede emplear para la medicina humana y también veterinaria.

La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención aquí descrita puede comprender opcionalmente un soporte (y/o vehículo) farmacéuticamente adecuado. La expresión "soporte (y/o vehículo) farmacéuticamente adecuado" utilizada aquí incluye preferentemente uno o más soportes o vehículos sólidos o líquidos compatibles (por ejemplo materiales de carga o diluyentes o compuestos de encapsulación) que son adecuados para ser administrados a una persona. El término "compatible", tal como se utiliza aquí significa que los constituyentes de la composición se pueden mezclar junto con el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención y el adyuvante opcionalmente contenido en la composición, como tales y entre sí, de modo que no se produce ninguna interacción que reduzca sustancialmente la eficacia farmacéutica de la composición bajo las condiciones de uso habituales, por ejemplo que reduzca la actividad farmacéutica del anticuerpo codificado o incluso que suprima o influya negativamente en la expresión del anticuerpo codificado. Evidentemente, un soporte farmacéuticamente adecuado debe tener una pureza suficientemente alta y una toxicidad suficientemente baja para que sea adecuado para ser administrado a una persona a tratar.

Los soportes o vehículos farmacéuticamente adecuados que se pueden emplear en los usos de la composición farmacéutica se pueden diferenciar normalmente entre soportes o vehículos sólidos o líquidos, pudiendo depender una determinación específica de la viscosidad del respectivo soporte o vehículo que se vaya a utilizar.

En este contexto, los soportes y vehículos sólidos normalmente incluyen, por ejemplo, de forma no limitativa, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina y sales, si se suministran en forma sólida, como sulfato de protamina, bifosfato disódico, bifosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, o polivinilpirrolidona, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, lanolina, azúcares, por ejemplo lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, por ejemplo almidón de maíz o almidón de patata; o sustancias basadas en celulosa, por ejemplo celulosa y sus derivados, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, acetato de celulosa; tragacanto pulverizado; malta; gelatina; sebo; lubricantes sólidos, por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio; sulfato de calcio; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes aromatizantes; soportes de fármaco (agente activo); agentes formadores de pastillas; estabilizadores, antioxidantes; conservantes; etc.

Los soportes o vehículos líquidos, por ejemplo para suspensiones acuosas u oleosas, normalmente incluyen, de forma no limitativa, por ejemplo agua; agua libre de pirógenos; soluciones de intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina o proteínas de suero, como seroalbúmina humana; ácido algínico; soluciones salinas isotónicas o soluciones tamponadas con fosfato, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónica, etc. o sales de electrolitos, si se suministran en forma solubilizada, como sulfato de protamina, fosfatos, por ejemplo bifosfato disódico, bifosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, u (otras) sustancias tampón, incluyendo, por ejemplo, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio; soluciones líquidas de polioles, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol, 1,3-butanodiol, sorbitol, manitol; aceites estériles fijos, cualquier aceite fijo blando, por ejemplo, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, ácidos grasos, como ácido oleico y sus derivados de glicérido, aceites naturales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo aceites vegetales, por ejemplo aceite de cacahuete, de semilla de algodón, de sésamo, de maíz y de teobroma; aceite de oliva o de ricino, en especial en sus versiones polioxietiladas. Estos soportes o vehículos líquidos también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares, o agentes tensioactivos o emulsionantes de uso común, como Tween®, Spans u otros agentes emulsionantes o intensificadores de biodisponibilidad, etc. si se suministran en un líquido. La elección de un soporte farmacéuticamente adecuado tal como se describe más arriba está determinada en particular por el modo de administración de la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención se puede administrar, por ejemplo, de forma sistémica. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, las vías transdérmica, oral, parenteral, incluyendo inyecciones

subcutáneas o intravenosas, tópica y/o intranasal. La cantidad adecuada a utilizar de la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención se puede determinar mediante experimentos rutinarios empleando modelos animales. Estos modelos incluyen, de forma no limitativa, modelos de conejo, oveja, ratón, rata, perro y primates no humanos. Las formas de dosis unitaria preferentes para inyección incluyen soluciones estériles de agua, solución salina fisiológica o mezclas de las mismas. El pH de estas soluciones debe estar ajustado a aproximadamente 7,4. Los soportes adecuados para inyección incluyen hidrogeles, dispositivos de liberación controlada o retardada, ácido poliláctico y matrices de colágeno. Los soportes farmacéuticamente adecuados que pueden ser utilizados aquí incluyen aquellos adecuados para ser utilizados en lociones, cremas, geles y similares. Si el compuesto se debe administrar vía peroral, la forma de dosis unitaria preferente son las pastillas, cápsulas y similares. Los soportes farmacéuticamente adecuados para la preparación de formas de dosis unitaria que pueden ser utilizadas para la administración oral son bien conocidos en el estado anterior de la técnica. Su elección dependerá de consideraciones secundarias, como el sabor, el coste y la estabilidad de almacenamiento, que no son críticas para los objetivos de la presente invención, y puede ser realizada sin dificultades por los expertos en la técnica.

La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención puede comprender además un tampón de inyección, que preferentemente mejora la transfección y también la traducción de la codificación de anticuerpos en células o en un organismo. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención puede comprender, por ejemplo, un tampón de inyección acuoso que contiene, en relación con la composición farmacéutica total si ésta está en forma líquida, una sal de sodio, preferentemente una sal de sodio al menos 50 mM, una sal de calcio, preferentemente una sal de calcio al menos 0,01 mM, y opcionalmente una sal de potasio, preferentemente una sal de potasio al menos 3 mM. De acuerdo con una realización preferente, las sales de sodio, sales de calcio y opcionalmente sales de potasio contenidas en dicho tampón de inyección están en forma de haluros, por ejemplo cloruros, yoduros o bromuros, o en forma de sus hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos o sulfatos. Aquí se pueden mencionar como ejemplos, para la sal de sodio, NaCl, NaI, NaBr, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, para la sal de potasio opcionalmente presente KCl, KI, KBr, K₂CO₃, KHCO₃, K₂SO₄, y para la sal de calcio CaCl₂, CaI₂, CaBr₂, CaCO₃, CaSO₄, Ca(OH)₂. El tampón de inyección también puede contener aniones orgánicos de los cationes arriba mencionados. En una realización particularmente preferente, dicho tampón de inyección contiene como sales cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂) y opcionalmente cloruro de potasio (KCl), siendo también posible la presencia de otros aniones además de los cloruros.

Normalmente, estas sales están presentes en el tampón de inyección utilizado opcionalmente en la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, en relación con la composición farmacéutica total (si ésta está en forma líquida), en una concentración de cloruro de sodio (NaCl) al menos 50 mM, cloruro de potasio (KCl) al menos 3 mM y cloruro de calcio (CaCl₂) al menos 0,01 mM. El tampón de inyección puede estar en forma de tampones de inyección tanto hipertónicos como isotónicos o hipotónicos. En este contexto, en relación con la presente invención, el tampón de inyección es hipertónico, isotónico o hipotónico con respecto al medio de referencia particular, es decir, el tampón de inyección tiene un contenido de sal más alto, igual o más bajo en comparación con el medio de referencia particular, empleándose concentraciones de las sales arriba mencionadas que no conducen a daños en las células provocados por ósmosis u otros efectos de concentración. Los medios de referencia son aquí, por ejemplo, líquidos presentes en métodos "in vivo", por ejemplo sangre, fluido linfático, fluido de citosol u otros fluidos presentes en el cuerpo, o líquidos o tampones empleados convencionalmente en métodos "in vitro". Los expertos en la técnica conocen estos líquidos y tampones.

El tampón de inyección opcionalmente contenido en la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención también puede contener otros componentes, por ejemplo azúcares (mono-, di-, tri- o polisacáridos), en particular glucosa o manitol. Sin embargo, en una realización preferente, el tampón de inyección utilizado no tiene ningún azúcar. También es preferible que el tampón de inyección precisamente no contenga ningún componente no cargado, por ejemplo azúcares. Normalmente, el tampón de inyección contiene exclusivamente cationes metálicos, en particular del grupo consistente en metales alcalinos o alcalinotérreos, y aniones, en particular los aniones arriba descritos. El pH del tampón de inyección utilizado, en relación con la composición farmacéutica total si ésta está en forma líquida, oscila preferentemente entre 1 y 8,5, preferiblemente entre 3 y 5, de forma especialmente preferente entre 5,5 y 7,5, y en particular entre 5,5 y 6,5. En caso apropiado, el tampón de inyección también puede contener un sistema tampón, que fija el tampón de inyección en un pH tamponado. Éste puede ser, por ejemplo, un sistema tampón fosfato, HEPES o Na₂HPO₄/NaH₂PO₄. No obstante, el tampón de inyección utilizado de forma muy particularmente preferente no contiene ninguno de los sistemas tampón arriba mencionados o no contiene ningún sistema tampón en absoluto.

El tampón de inyección opcionalmente contenido en la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención puede contener, adicional o alternativamente a los cationes monovalentes y divalentes descritos, cationes divalentes, en particular del grupo consistente en metales alcalinotérreos, por ejemplo magnesio (Mg²⁺), o también hierro (Fe²⁺), y cationes monovalentes, en particular de los grupos de metales alcalinos, por

ejemplo litio (Li^+). Estos cationes monovalentes están preferentemente en forma de sus sales, por ejemplo en forma de haluros, por ejemplo cloruros, yoduros o bromuros, o en forma de sus hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos o sulfatos. Aquí se pueden mencionar como ejemplos, para la sal de litio LiCl , LiI , LiBr , Li_2CO_3 , LiHCO_3 , Li_2SO_4 , para la sal de magnesio MgCl_2 , MgI_2 , MgBr_2 , MgCO_3 , MgSO_4 y Mg(OH)_2 , y para la sal de hierro FeCl_2 , FeBr_2 , FeI_2 , FeF_2 , Fe_2O_3 , FeCO_3 , FeSO_4 , Fe(OH)_2 . También están incluidas todas las combinaciones de cationes divalentes y/o monovalentes, tal como se describen más arriba. Por tanto, en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se pueden utilizar tampones de inyección que contienen solo cationes divalentes, solo cationes monovalentes, o cationes divalentes y monovalentes. Del mismo modo se pueden utilizar tampones de inyección que solo contienen un tipo de cationes divalentes o monovalentes, de forma particularmente preferente por ejemplo solo cationes de Ca^{2+} , o una sal de los mismos, por ejemplo CaCl_2 . También se pueden tener en cuenta las concentraciones molares arriba indicadas para Ca^{2+} (como catión divalente) y Na^+ (como catión monovalente) (es decir, normalmente concentraciones de Na^+ al menos 50 mM, Ca^{2+} al menos 0,01 mM y opcionalmente K^+ al menos 3 mM) en el tampón de inyección, si en el tampón de inyección utilizado para preparar la solución de inyección se emplea otro catión divalente o monovalente, en particular otros cationes del grupo de los metales alcalinotérreos y metales alcalinos, en lugar de parte o todo el Ca^{2+} o, respectivamente Na^+ . De hecho, todos los Ca^{2+} o Na^+ arriba mencionados se pueden sustituir por otros cationes divalentes o, respectivamente, monovalentes en el tampón de inyección utilizado, por ejemplo también por una combinación de otros cationes divalentes (en lugar de Ca^{2+}) y/o una combinación de otros cationes monovalentes (en lugar de Na^+) (en particular una combinación de otros cationes divalentes del grupo consistente en los metales alcalinotérreos o, respectivamente, de otros cationes monovalentes del grupo consistente en los metales alcalinos), pero es preferible sustituir a lo sumo parte de los Ca^{2+} o Na^+ , es decir, que al menos un 20%, preferentemente al menos un 40%, de forma especialmente preferente al menos un 60% y de forma todavía más preferente al menos un 80% de las concentraciones molares totales particulares de los cationes monovalentes y divalentes en el tampón de inyección son de Ca^{2+} o respectivamente de Na^+ . No obstante, de forma muy particularmente preferente, si el tampón de inyección opcionalmente contenido en la composición farmacéutica de acuerdo con la invención contiene exclusivamente Ca^{2+} como catión divalente y Na^+ como catión monovalente, es decir, con respecto a la composición farmacéutica total, el Ca^{2+} representa el 100% de la concentración molar total de cationes divalentes, al igual que el Na^+ representa el 100% de la concentración molar de cationes monovalentes. La solución acuosa del tampón de inyección puede contener, con respecto a la composición farmacéutica total, hasta un 30 mol% de las sales contenidas en la solución, preferentemente hasta un 25 mol%, preferiblemente hasta un 20 mol, de forma más preferente hasta un 15mol%, de forma especialmente preferente hasta un 10 mol%, de forma incluso más preferente hasta un 5 mol% y de forma igualmente más preferente hasta un 2 mol%, de sales insolubles o moderadamente solubles. En el contexto de la presente invención, sales moderadamente solubles son aquellas cuyo producto de solubilidad es $< 10^{-4}$. Las sales que son fácilmente solubles son aquellas cuyo producto de solubilidad es $> 10^{-4}$. Preferentemente, el tampón de inyección opcionalmente contenido en la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención es de 50 mM a 800 mM, preferentemente de 60 mM a 500 mM, de forma especialmente preferente de 70 mM a 250 mM, de forma particularmente preferente de 60 mM a 110 mM en cloruro de sodio (NaCl), de 0,01 mM a 100 mM, preferentemente de 0,5 mM a 80 mM, de forma especialmente preferente de 1,5 mM a 40 mM en cloruro de calcio (CaCl_2), y opcionalmente de 3 mM a 500 mM, preferentemente de 4 mM a 300 mM, de forma especialmente preferente de 5 mM a 200 mM en cloruro de potasio (KCl). Los aniones orgánicos también pueden estar presentes como aniones adicionales además de los aniones inorgánicos arriba mencionados, por ejemplo haluros, sulfatos o carbonatos. Entre éstos se pueden mencionar: succinato, lactobionato, lactato, malato, maleato, etc. que también pueden estar presentes en combinación.

Un tampón de inyección opcionalmente contenido en la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención preferentemente contiene lactato. Si contiene un anión orgánico, de forma particularmente preferente dicho tampón de inyección contiene exclusivamente lactato como anión orgánico. En el contexto de la invención, el lactato puede ser cualquier lactato deseado, por ejemplo L-lactato y D-lactato. Las sales de lactato presentes en relación con la presente invención son normalmente lactato de sodio y/o lactato de calcio, en especial si el tampón de inyección solo contiene Na^+ como catión monovalente y Ca^{2+} como catión divalente. Un tampón de inyección opcionalmente utilizado en la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención y tal como se describe más arriba contiene preferentemente, en relación con la composición farmacéutica total, lactato entre 15 mM y 500 mM, de forma especialmente preferente entre 15 mM y 200 mM, y de forma todavía más preferente entre 15 mM y 100 mM. En este contexto se ha comprobado que el uso de un tampón de inyección con los componentes arriba descritos, opcionalmente con o sin lactato (en adelante: "tampón de inyección RL", si no contiene el componente de lactato, o "tampón de inyección RL con lactato", si contiene el componente de lactato) para soluciones de inyección de ARN (es decir, soluciones de inyección que contienen ARN y son adecuadas para la inyección de este ARN) aumenta significativamente tanto la transferencia como la traducción del ARN dentro de/en las células/tejido de un organismo huésped (mamífero) en comparación con otros tampones de inyección utilizados convencionalmente en la técnica anterior.

De acuerdo con una realización particular, la composición farmacéutica aquí utilizada también se puede proporcionar como una vacuna pasiva (para inmunización pasiva). En la presente invención, sin limitarse a una teoría, la inmunización pasiva se basa en la introducción de un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos, tal como se describe aquí, en un organismo, en particular en una célula, expresándose después, es decir traduciéndose, el anticuerpo codificado. Como resultado, puede tener lugar una unión de las moléculas, por ejemplo ácidos nucleicos o antígenos, para las cuales es específico el anticuerpo codificado. En relación con la presente invención, las vacunas pasivas comprenden normalmente una composición tal como se describe más arriba para una composición farmacéutica, estando determinada la composición de dichas vacunas pasivas en particular por el modo en el que éstas son administradas. Preferentemente, las vacunas pasivas para su uso de acuerdo con la invención se administran de forma sistémica o en algunos casos de forma no sistémica. Las vías de administración de estas vacunas pasivas para su uso de acuerdo con la invención incluyen las vías transdérmica, oral, parenteral, incluyendo inyecciones subcutáneas, intravenosas o intraarteriales, tópica y/o intranasal. Por tanto, las vacunas pasivas para su uso de acuerdo con la invención están formuladas preferentemente en forma líquida o sólida.

De acuerdo con la presente invención, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se utilizan para el tratamiento de enfermedades cancerosas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunes. A este respecto, a continuación se mencionan diversas indicaciones a modo de ejemplo.

De forma no limitativa, con la composición farmacéutica descrita se pueden tratar por ejemplo enfermedades o afecciones, por ejemplo enfermedades cancerosas o tumorales seleccionadas entre melanomas, melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas de riñón, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores de próstata, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, carcinomas de mama (= cáncer de mama), cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, diversos tumores inducidos por virus, por ejemplo carcinomas inducidos por el virus del papiloma (por ejemplo carcinoma de cuello uterino = cáncer de cuello uterino), adenocarcinomas, tumores inducidos por virus herpes (por ejemplo linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por EBV), tumores inducidos por la hepatitis B (carcinomas hepatocelulares), linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neurinoma del acústico, carcinomas de pulmón (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas de pulmón de células pequeñas, cáncer de garganta, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma del recto, astrocitoma, tumores cerebrales, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebrales, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer de testículo, carcinoma de tiroides, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, tumor de la pituitaria, micosis fungoides, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer de riñón, timoma, carcinoma del cuerpo uterino, cáncer de hueso, linfomas no Hodgkin, cáncer de uretra, síndrome de CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendroglioma, cáncer vulvar, cáncer intestinal, carcinoma de colon, carcinoma esofágico (= cáncer esofágico), condiciones verrugosas, tumores del intestino delgado, craneofaringiomas, carcinoma de ovario, tumores de tejidos blandos (sarcomas), cáncer de ovario (= carcinoma de ovario), carcinoma de páncreas (= cáncer de páncreas), carcinoma endometrial, metástasis de hígado, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumor palpebral, cáncer de próstata (= tumores de próstata) etc., o enfermedades infecciosas, como por ejemplo gripe, malaria, SARS, fiebre amarilla, SIDA, borreliosis de Lyme, leishmaniasis, ántrax, meningitis.

Del mismo modo, el ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se pueden utilizar para el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades infecciosas virales seleccionadas, de forma no limitativa, entre SIDA, condiloma acuminado, molusco contagioso, dengue, fiebre de los tres días, virus del Ébola, resfriados, meningoencefalitis temprana de verano (ESME), gripe, herpes, hepatitis, herpes simplex tipo I, herpes simplex tipo II, herpes zóster, gripe, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, virus de Marburg, sarampión, fiebre aftosa, mononucleosis, paperas, infección por virus Norwalk, fiebre glandular de Pfeiffer, viruela, polio (poliomielitis), pseudocrup, eritema infeccioso, rabia, verrugas, fiebre del Nilo occidental, varicela, citomegalovirus (CMV), causadas por virus seleccionados, de forma no limitativa, entre por ejemplo VIH, virus orthopox variola, virus orthopox alastrim, virus parapox ovis, virus del molusco contagioso, virus herpes simplex 1, virus herpes simplex 2, virus herpes B, virus zóster de la varicela, virus de la pseudorrabia, citomegalovirus humano, virus herpes 6 humano, virus herpes 7 humano, virus de Epstein-Barr, virus herpes 8 humano, virus de la hepatitis B, virus chikungunya, virus O'nyong'nyong, rubivirus, virus de la hepatitis C, virus C de GB, virus del Nilo occidental, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus del mal de Louping, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis japonesa B, virus Powassan, virus FSME, virus corona asociado con SARS, virus corona humano 229E, virus corona humano Oc43, Torovirus, virus linfotrópico humano de células T de tipo I, virus linfotrópico humano de células T de tipo II, virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1, virus de inmunodeficiencia humana de tipo 2, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus Tacaribe, virus Junin, virus Machupo, virus de la enfermedad de Borna, virus Bunyamwera, virus de la encefalitis de California, virus de la fiebre del valle del

- Rift, virus de la fiebre del mosquito simúlido, virus Toscana, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus Hazara, virus Khasan, virus Hantaan, virus Seoul, virus Prospect Hill, virus Puumala, virus Dobrava Belgrade, virus Tula, virus sin nombre, virus Marburg del lago Victoria, virus Ébola del Zaire, virus Ébola del Sudan, virus Ébola de Costa de Marfil, virus de la gripe A, virus de la gripe B, virus de la gripe C, virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus respiratorio sincitial, metapneumovirus humano, virus de la estomatitis vesicular de Indiana, virus de la rabia, virus Mokola, virus Duvenhage, lyssavirus del murciélago europeo 1 + 2, lyssavirus del murciélago australiano, adenovirus A-F, virus de los papilomas humanos, virus del condiloma 6, virus del condiloma 11, virus de polioma, virus adenoasociados 2, rotavirus, u orbivirus etc., o enfermedades infecciosas bacterianas tales como aborto (infeccioso, séptico), prostatitis (inflamación de la próstata), ántrax, apendicitis (inflamación del intestino ciego), borreliosis, botulismo, Campylobacter, Chlamydia trachomatis (inflamación de la uretra, conjuntiva), cólera, difteria, donovanosis, epiglotitis, tífus transmitido por piojos, fiebre tifoidea, gangrena gaseosa, gonorrea, peste de la liebre, Helicobacter pylori, tos ferina, bubón climático, osteomielitis, enfermedad del legionario, lepra, listeriosis, neumonía, meningitis, meningitis bacteriana, ántrax, inflamación del oído medio, Mycoplasma hominis, sepsis neonatal (corioamnionitis), noma, fiebre paratifoidea, peste, síndrome de Reiter, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, fiebre paratifoidea por Salmonella, fiebre tifoidea por Salmonella, escarlatina, sífilis, tétanos, gonorrea, fiebre tsutsugamushi, tuberculosis, tífus, vaginitis (colpitis), chancro blando y enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoos u hongos, como disentería amebiana, bilharziosis, enfermedad de Chagas, Echinococcus, tenia de los peces, ictiotoxismo (ciguatera), tenia del zorro, micosis del pie, tenia del perro, candidiasis, pitiriasis, prurito (escabiosis), leishmaniasis cutánea, disentería por lamblia (giardiasis), piojos, malaria, oncocercosis (ceguera de los ríos), enfermedades fúngicas, tenia de la vaca, esquistosomiasis, enfermedad del sueño, tenia del cerdo, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad del sueño), leishmaniasis visceral, dermatitis del pañal o tenia enana.
- El ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención también se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares seleccionadas, de forma no exclusiva, entre cardiopatía isquémica, arteriosclerosis, apoplejía e hipertensión, y enfermedades neuronales seleccionadas entre la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, distonía, epilepsia, esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson, etc.
- El ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se pueden utilizar además para el tratamiento de enfermedades autoinmunes seleccionadas, de forma no limitativa, entre enfermedades autoinmunes de tipo I, enfermedades autoinmunes de tipo II, enfermedades autoinmunes de tipo III o enfermedades autoinmunes de tipo IV, por ejemplo esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide, diabetes, diabetes de tipo I (diabetes mellitus), lupus eritematoso sistémico (LES), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, formas autoinmunes de hepatitis crónica, colitis ulcerosa, enfermedades alérgicas de tipo I, enfermedades alérgicas de tipo II, enfermedades alérgicas de tipo III, enfermedades alérgicas de tipo IV, fibromialgia, alopecia, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, miastenia gravis, neurodermatitis, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (ESP), psoriasis, síndrome de Reiter, artritis reumática, psoriasis, vasculitis, etc., o diabetes de tipo II.
- Un ARNm (modificado) para su uso de acuerdo con la invención, que codifica un anticuerpo, puede ser empleado de diversos modos para el tratamiento de las indicaciones arriba mencionadas. Por ejemplo, ciertas enfermedades cancerosas se pueden tratar por inmunoterapia adicional o alternativa a terapias conocidas. Para ello se puede emplear por ejemplo un ARNm de acuerdo con la invención que codifica un anticuerpo biespecífico, reconociendo el anticuerpo por un lado un antígeno de superficie, por ejemplo CD3, en células T y, por otro lado, un antígeno tumoral, por ejemplo Her2/neu, C20, EGFR o CA-125. De este modo se acercan espacialmente células T, que son positivas con respecto a determinados antígenos de superficie, y células tumorales, que expresan el antígeno tumoral, lo que mejora el reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmunológico y por tanto aumenta la destrucción de las células tumorales.
- Además, por ejemplo en caso de infarto de miocardio, se puede emplear un ARNm para su uso de acuerdo con la invención que codifica un anticuerpo biespecífico que reconoce, por un lado, un antígeno de células madre, por ejemplo CD45, y, por otro lado, un antígeno del tejido diana, por ejemplo cadena ligera de miosina, con el fin de aumentar la concentración de células madre en el músculo cardíaco (véase también Reusch *et al.* Anti-CD3 x anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) bispecific antibody redirects T-cell cytolytic activity to EGFR-positive cancers *in vitro* and in an animal model. Clin Cancer Res. 2006).
- Además, mediante el uso de un ARNm de acuerdo con la invención que codifica anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos codificados pueden poner en contacto o acercar especialmente por ejemplo dos tipos de células diferentes. Esto resulta ventajoso, por ejemplo, para concentrar una célula en un tejido o para poner dos proteínas, por ejemplo antígenos, en contacto o especialmente cerca entre sí, por ejemplo ligando y receptor o proteínas que se deben dimerizar/oligomerizar para activarse.

Los ARNm para su usos de acuerdo con la invención tal como se describen aquí que codifican intracuerpos se pueden emplear también para utilizarlos en el caso de las enfermedades arriba mencionadas, en particular para el tratamiento de enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunes. Por tanto, los intracuerpos se pueden utilizar para inhibir, por ejemplo como anticuerpos biespecíficos expresados intracelularmente, proteínas citoplásmicas (bien proteínas procedentes del organismo patógeno, bien proteínas del organismo huésped), tal como se describen más arriba. Por ejemplo, los ARNm de acuerdo con la invención que codifican intracuerpos se pueden emplear para inhibir IL-2R (receptor de IL-2) o ErbB2 (Her21/neu) mediante los anticuerpos codificados. Los ARNm para su uso de acuerdo con la invención que codifican intracuerpos también son adecuados para utilizarlos en caso de enfermedades virales, por ejemplo VIH-1. Los ARNm de acuerdo con la invención que codifican anticuerpos se pueden emplear además para unir y preferentemente neutralizar, mediante los anticuerpos codificados, factores expresados intracelularmente tal como se describen aquí, por ejemplo antígenos, ácidos nucleicos, etc. (véase más arriba).

Por lo tanto, en este contexto, la descripción también prevé el uso de un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos de acuerdo con la invención o de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, por ejemplo una vacuna pasiva de acuerdo con la invención, para el tratamiento de las indicaciones y enfermedades aquí descritas. Esto también incluye en particular el uso del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para la inmunización pasiva y, respectivamente, el uso de la composición farmacéutica descrita de acuerdo con la invención como una vacuna pasiva. Del mismo modo está previsto el uso del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos de acuerdo con la descripción para la preparación de una composición farmacéutica o una vacuna pasiva, tal como se describe aquí, para el tratamiento de las indicaciones aquí descritas. También está previsto el uso del ARNm (modificado) codificador de anticuerpos de acuerdo con la descripción para la preparación de una vacuna pasiva, tal como se describe aquí, para la inmunización pasiva contra las indicaciones arriba mencionadas.

Así, en este contexto, la descripción también prevé el uso de un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos de acuerdo con la descripción, del anticuerpo codificado por éste, de la composición farmacéutica aquí descrita o de la vacuna pasiva de acuerdo con la invención, para uso terapéutico o para la inhibición/neutralización de una función de proteína en una de las indicaciones aquí descritas. En este contexto, preferentemente se suprime una función de proteína (anticuerpos neutralizadores). En principio, cualquiera de los anticuerpos codificados por el ARNm para su uso de acuerdo con la invención y descrito aquí tiene también al mismo tiempo una acción neutralizadora mediante la unión de su sustrato específico. Los ejemplos incluyen anticuerpos anti-CD4 para prevenir el rechazo de trasplantes, Avastin (véase más arriba), Herceptin (véase más arriba), etc.

Por tanto, en este contexto, la descripción prevé además el uso de un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos de acuerdo con la descripción, del anticuerpo codificado por éste o de la composición farmacéutica aquí descrita, para uso terapéutico para la inmunización pasiva mediante la activación de una función de efector inmunológico en el sentido de un anticuerpo monoclonal. En este contexto, por ejemplo la terapia de células tumorales o patógenos, como virus o bacterias, en las indicaciones aquí descritas se posibilita mediante la expresión y secreción del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Así, el ARNm apoya la defensa inmunitaria del huésped activando el sistema inmunológico innato, celular o humoral. Los anticuerpos pueden estar dirigidos contra factores inmunosupresores o pueden simular la función de determinadas citoquinas inmunológicamente activas, por ejemplo mediante la activación de receptores de citoquinas.

Además, en este contexto, un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos de acuerdo con la descripción o la composición farmacéutica de acuerdo con la descripción aquí descrita o la vacuna pasiva de acuerdo con la invención también pueden emplearse como inmunosupresor en las indicaciones arriba descritas. Por ejemplo, se ha podido demostrar que anticuerpos contra el ligando CD40 (CD154) o contra CD3 podían prevenir o reducir el rechazo de trasplantes. Por tanto, estos ARNm (modificados) de acuerdo con la descripción que codifican un anticuerpo, cuyos anticuerpos codificados se pueden unir a antígenos de superficie o en general a factores de superficie de células, por ejemplo moléculas MHC de clase I, MHC de clase II, receptores de células T, moléculas LMP2, moléculas LMP7, CD1, CD2, CD3, CD4, CD8, CD11, CD28, CD30, CD31, CD40, CD50, CD54, CD56, CD58, CD80, CD86, CD95, CD153, CD154, CD178, CD3 = TCR (receptor de células T), etc. se emplean preferentemente para su uso como inmunosupresores.

En este contexto, la descripción también prevé adicionalmente el uso de un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos de acuerdo con la descripción o de la composición farmacéutica aquí descrita para uso terapéutico para la expansión de (determinadas) células *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las células positivas con respecto a CD4 y CD25 y células T reguladoras pueden ser estimuladas para expansión mediante la expresión del anticuerpo CD28 superantagonista. Las células T reguladoras que pueden ser multiplicadas mediante la expresión del anticuerpo CD28 superantagonista desempeñan una función sobre todo en enfermedades autoinmunes (Beyersdorf N, Hanke T, Kerkau T, Hunig T. Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases. Ann Rheum Dis. 2005 Nov; 64).

5 Un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención o la composición farmacéutica aquí descrita se pueden utilizar igualmente en caso de artritis reumatoide para prevenir reacciones inflamatorias mediante anticuerpos contra, por ejemplo, TNF α , u otros factores que exacerban la respuesta inmunológica no deseada, por ejemplo contra las proteínas del paciente, y para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Un ARNm (modificado) para su uso de acuerdo con la invención que codifica anticuerpos anti-CD18, o la composición farmacéutica aquí descrita o la vacuna pasiva de acuerdo con la invención también se pueden utilizar para reducir inflamaciones mediante la inhibición de leucocitos, por ejemplo en las indicaciones arriba mencionadas.

10 La presente descripción proporciona además el uso en un método para el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades arriba mencionadas y, respectivamente, para la inmunización pasiva (preventiva) contra las enfermedades arriba mencionadas, que comprende la administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención descrita, la vacuna pasiva para su uso de acuerdo con la invención o respectivamente el ARNm para su uso de acuerdo con la invención, a un paciente, en particular un humano. Estos métodos
15 también se refieren al tratamiento de indicaciones relacionadas con los procesos intracelulares y extracelulares arriba descritos, con funciones de neutralización de anticuerpos, la inhibición arriba mencionada de determinadas funciones (celulares) por anticuerpos, etc.

La presente descripción también prevé un método de transcripción *in vitro* para la preparación de un ARN (modificado) codificador de anticuerpos, que comprende los siguientes pasos:

- 20 a) proporcionar un ácido nucleico, en particular un ADNc, que codifica un anticuerpo tal como se describe más arriba;
- b) adicionar el ácido nucleico, en particular un ADNc que codifica un anticuerpo, a un medio de transcripción *in vitro* que comprende una ARN polimerasa, un tampón adecuado, una mezcla de ácidos nucleicos que comprende uno o más nucleótidos opcionalmente modificados tal como se describe más arriba en
25 sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales A, G, C o U, y opcionalmente uno o más nucleótidos naturales A, G, C o U si no se han de sustituir todos los nucleótidos naturales A, G, C o U, y opcionalmente un inhibidor de RNasa;
- c) incubar el ácido nucleico, en particular un ADNc que codifica un anticuerpo, en el medio de transcripción *in vitro* y transcripción *in vitro* del ácido nucleico para obtener un ARN opcionalmente modificado codificador de anticuerpos de acuerdo con la invención;
30 d) opcionalmente, purificar el ARN (modificado) codificador de anticuerpos y eliminar los nucleótidos no incorporados del medio de transcripción *in vitro*.

Un ácido nucleico tal como se describe en el paso a) del método de transcripción *in vitro* puede ser cualquier ácido nucleico tal como se describe aquí (por ejemplo ADN monocatenario o bicatenario, ADNc, etc.), que
35 codifica un anticuerpo tal como se describe aquí. Para ello normalmente se emplean secuencias de ADN, por ejemplo ADN genómico o fragmentos del mismo, o plásmidos, que codifican un anticuerpo tal como se describe aquí, preferentemente en forma linealizada. La transcripción *in vitro* se puede llevar a cabo convencionalmente utilizando un vector que tiene un sitio de unión de ARN polimerasa. Para ello se puede utilizar cualquier vector (de expresión) conocido en el estado anterior de la técnica, por ejemplo vectores (de expresión) comerciales.
40 Los vectores (de expresión) preferentes son, por ejemplo, aquellos que tienen un sitio de unión SP6 o un sitio de unión T7 o T3 en dirección 5' y/o en dirección 3' con respecto al sitio de clonación. Por tanto, las secuencias de ácido nucleico utilizadas se pueden transcribir posteriormente, dependiendo de la ARN polimerasa elegida. Normalmente, una secuencia de ácidos nucleicos que se utiliza para la transcripción *in vitro* y que codifica un anticuerpo tal como se describe aquí se clona en el vector (de expresión), por ejemplo a
45 través de un sitio de clonación múltiple del vector utilizado. Antes de la transcripción, el vector (de expresión) normalmente se segmenta con enzimas de restricción en el sitio en el que se debe encontrar el futuro extremo 3' del ARN, utilizando una enzima de restricción adecuada, y el fragmento se purifica. Esto excluye la posibilidad de que el ARN transcrito contenga secuencias del vector, y se obtiene una transcripción de ARN con una longitud definida. En este contexto, preferentemente no se utiliza ninguna enzima de restricción que genere
50 extremos sobresalientes (como por ejemplo Aat II, Apa I, Ban II, Bgl I, Bsp 1286, BstX I, Cfo I, Hae II, HgiA I, Hha I, Kpn I, Pst I, Pvu I, Sac I, Sac II, Sfi I, Sph I, etc.). Si no obstante se utilizan estas enzimas de restricción, el extremo 3' sobresaliente preferentemente se rellena, por ejemplo con Klenow o T4 ADN polimerasa.

Como alternativa al paso a), el ácido nucleico también se puede preparar como un molde de transcripción mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, uno de los cebadores utilizados
55 normalmente contiene la secuencia de un sitio de unión de ARN polimerasa. Además, el extremo 5' del cebador utilizado contiene preferentemente una extensión de aproximadamente 10 - 50 nucleótidos adicionales, de forma especialmente preferente de 15 a 30 nucleótidos adicionales, y de forma totalmente preferente aproximadamente 20 nucleótidos.

Normalmente, antes de la transcripción *in vitro*, el molde de ácido nucleico, por ejemplo el ADN o ADNc, se purifica y se libera de RNasa para asegurar un alto rendimiento. La purificación se puede llevar a cabo con ayuda de cualquier método conocido en el estado anterior de la técnica, por ejemplo utilizando un gradiente de cloruro de cesio, métodos de intercambio iónico o mediante purificación por electroforesis en gel de agarosa.

- 5 De acuerdo con el paso b) del método, el ácido nucleico (utilizado como molde de transcripción) se añade a un medio de transcripción *in vitro*. Un medio de transcripción *in vitro* adecuado comprende inicialmente un ácido nucleico tal como está previsto en el paso a), por ejemplo aproximadamente 0,1 - 10 µg, de forma preferente aproximadamente 1 - 5 µg, de forma especialmente preferente 2,5 µg y de forma totalmente preferente aproximadamente 1 µg de dicho ácido nucleico. Además, un medio de transcripción *in vitro* adecuado comprende adicionalmente un agente reductor, por ejemplo DTT, de forma especialmente preferente aproximadamente 1 - 20 µl de DTT 50 mM, de forma todavía más preferente aproximadamente 5 µl de DTT 50 mM. El medio de transcripción *in vitro* también comprende nucleótidos, por ejemplo una mezcla de nucleótidos, en el caso de la presente invención que incluye una mezcla de nucleótidos (modificados) tal como se define aquí (en general aproximadamente 0,1 - 10 mM por nucleótido, preferentemente de 0,1 a 1 mM por nucleótido (preferentemente aproximadamente 4 mM en total)) y opcionalmente nucleótidos no modificados. Si se emplean nucleótidos modificados (aproximadamente 1 mM por nucleótido, de forma preferente aproximadamente 4 mM en total), por ejemplo pseudouridina 5'-trifosfato, 5-metiliditidina 5'-trifosfato, etc., normalmente se añaden en una cantidad tal que los nucleótidos modificados o con bases modificadas son sustituidos por completo por el nucleótido natural. No obstante, también es posible emplear mezclas de uno o más nucleótidos modificados o con bases modificadas y uno o más nucleótidos naturales en lugar de un nucleótido particular, es decir, es posible emplear uno o más nucleótidos modificados tal como se describen más arriba en sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales A, G, C o U, y de forma adicional opcionalmente uno o más nucleótidos naturales A, G, C o U si no se han de sustituir todos los nucleótidos naturales A, G, C o U. A la inversa, también es posible utilizar únicamente nucleótidos naturales. Por tanto, mediante la adición selectiva del nucleótido deseado al medio de transcripción *in vitro* se puede controlar el contenido, es decir, la presencia y la cantidad, de la modificación de nucleótidos deseada en la secuencia de ARN (modificado) codificador de anticuerpos transcrita. Del mismo modo, un medio de transcripción *in vitro* adecuado comprende una ARN polimerasa, por ejemplo T7 ARN polimerasa (por ejemplo T7-Opti mRNA Kit, CureVac, Tübingen, Alemania), T3 ARN polimerasa o SP6, en general entre aproximadamente 10 y 500 U, de forma preferente entre aproximadamente 25 y 250 U, de forma especialmente preferente entre aproximadamente 50 y 150 U y de forma totalmente preferente aproximadamente 100 U de ARN polimerasa. Además, el medio de transcripción *in vitro* se mantiene preferentemente libre de RNasa con el fin de evitar la degradación del ARN transcrito. Por consiguiente, un medio de transcripción *in vitro* adecuado comprende adicionalmente un inhibidor de RNasa.
- 35 El ácido nucleico se incuba en el medio de transcripción *in vitro* en un paso c) y se transcribe a un ARN (modificado) codificador de anticuerpos. Los tiempos de incubación oscilan normalmente entre aproximadamente 30 y 240 minutos, preferentemente entre aproximadamente 40 y 120 minutos y de forma totalmente preferente son de aproximadamente 90 minutos. Las temperaturas de incubación son normalmente de 30 - 45°C, preferentemente de 37 - 42°C. La temperatura de incubación depende de la ARN polimerasa utilizada, por ejemplo para la T7 ARN polimerasa es de aproximadamente 37°C. El ARN obtenido mediante la transcripción es un ARNm. Normalmente, los rendimientos obtenidos en la transcripción *in vitro* son, para las cantidades iniciales indicadas empleadas en el paso b), de alrededor de aproximadamente 30 µg de ARN por µg de ADN molde. En el contexto de la presente invención, los rendimientos obtenidos en la transcripción *in vitro* se pueden aumentar mediante aumento lineal. Para ello, las cantidades iniciales indicadas empleadas en el paso b) se aumentan preferentemente de acuerdo con los rendimientos requeridos, por ejemplo en un factor de multiplicación de 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, etc.

- Después de la incubación, en el paso d) del método de transcripción *in vitro* de acuerdo con la invención puede tener lugar opcionalmente una purificación del ARN (modificado) codificador de anticuerpos transcrito. Para ello se puede emplear cualquier método adecuado conocido en el estado anterior de la técnica, por ejemplo métodos de purificación cromatográfica, por ejemplo cromatografía de afinidad, filtración en gel, etc. Mediante la purificación se pueden eliminar nucleótidos no incorporados, es decir en exceso, y ADN molde del medio de transcripción *in vitro* y se puede obtener un ARN (modificado) limpio. Por ejemplo, después de la transcripción, el medio de reacción que contiene el ARN transcrito normalmente se puede digerir con DNasa para eliminar el molde de ADN todavía contenido en la mezcla de reacción. A continuación o alternativamente, el ARN transcrito se puede precipitar con LiCl. La purificación del ARN transcrito puede tener lugar después a través de IP RP-HPLC. Esto permite en particular separar entre sí eficientemente los fragmentos más largos y los fragmentos más cortos.

- Preferentemente, en este contexto, la purificación se produce mediante un método de purificación de ARN a escala preparativa, que se caracteriza por que el ARN se purifica por HPLC utilizando una fase inversa porosa como fase estacionaria (mensajero PURE). Por ejemplo, para la purificación en el paso d) del método *in vitro*

de acuerdo con la invención se puede emplear una fase inversa como la fase estacionaria para la purificación por HPLC. Para la cromatografía con fases inversas, un compuesto no polar sirve normalmente como fase estacionaria, y un disolvente polar, como mezclas de agua, que normalmente se emplea en forma de tampones, con acetonitrilo y/o metanol, sirve como fase móvil para la elución. Preferentemente, la fase inversa porosa

5 tiene un tamaño de partícula de $8,0 \pm 2 \mu\text{m}$, preferentemente $\pm 1 \mu\text{m}$, de forma especialmente preferente $\pm 0,5 \mu\text{m}$. El material de fase inversa puede estar en forma de perlas. La purificación se puede llevar a cabo de un modo particularmente favorable con una fase inversa porosa que tiene este tamaño de partícula, opcionalmente en forma de perlas, obteniéndose resultados de separación particularmente buenos. Preferentemente, la fase inversa empleada es porosa, ya que con las fases inversas estacionarias que no son porosas, como las

10 descritas por Azarani A. y Hecker K. H., se acumulan presiones demasiado altas, de modo que la purificación preparativa del ARNm solo es posible con gran dificultad, si es que es posible. La fase inversa tiene preferentemente un tamaño de poro de 200 \AA a 5.000 \AA , en particular un tamaño de poro de 300 \AA a 4.000 \AA . Los tamaños de poro particularmente preferentes para fases inversas son $200 - 400 \text{ \AA}$, $800 - 1.200 \text{ \AA}$ y $3.500 - 4.500 \text{ \AA}$. Con una fase inversa con estos tamaños de poro se obtienen resultados particularmente buenos con respecto a la purificación del ARN en el paso de proceso d). El material para la fase inversa preferentemente es un poliestireno-divinilbenceno, pudiendo emplearse en particular poliestireno-divinilbencenos no alquilados. Ya se conocen en sí fases estacionarias con poliestireno-divinilbenceno. Para la purificación en el paso de método d) se pueden emplear los poliestireno-divinilbencenos que son conocidos en sí y que ya se utilizan en métodos de HPLC y son comerciales. Un poliestireno-divinilbenceno poroso no alquilado que tiene en particular

20 un tamaño de partícula de $8,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ y un tamaño de poro de $250 - 300 \text{ \AA}$, $900 - 1.100 \text{ \AA}$ o $3.500 - 4.500 \text{ \AA}$ se utiliza de forma muy particularmente preferente para la purificación en el paso de método d). Con este material para las fases inversas se pueden lograr de forma particularmente favorable las ventajas arriba descritas. La purificación por HPLC se puede llevar a cabo mediante el método de par iónico, añadiendo un ión que tiene una carga positiva a la fase móvil como un contraión para el ARN con carga negativa. De este modo se forma un par iónico que tiene un carácter lipófilo, que es ralentizado por la fase estacionaria no polar del sistema de fase inversa. En la práctica, las condiciones exactas para el método de par iónico se han de determinar empíricamente para cada problema de separación concreto. El tamaño del contraión, su concentración y el pH de la solución contribuyen en gran medida al resultado de la separación. Favorablemente se añaden a la fase móvil sales de alquilamonio, como acetato de trietilamonio y/o compuestos de tetraalquilamonio, como tetrabutylamonio. Preferentemente se añade acetato de trietilamonio $0,1\text{M}$ y el pH se ajusta a aproximadamente 7. La elección de la fase móvil depende de la naturaleza de la separación deseada. Esto significa que la fase móvil hallada para una separación específica, tal como se puede saber, por ejemplo, por el estado anterior de la técnica, no se puede transferir fácilmente a otro problema de separación con perspectivas de éxito adecuadas. Las condiciones de elución ideales, en particular la fase móvil utilizada, se deben determinar para cada problema de separación mediante experimentos empíricos. Como fase móvil para la elución del ARN mediante el método de HPLC se puede utilizar una mezcla de un disolvente acuoso y un disolvente orgánico. En este contexto resulta favorable utilizar como disolvente acuoso un tampón que tiene en particular un pH de aproximadamente 7, por ejemplo de 6,5 - 7,5, por ejemplo 7,0; preferiblemente se utiliza el tampón acetato de trietilamonio, de forma particularmente preferente un tampón de acetato de trietilamonio

40 $0,1\text{M}$ que, tal como se describe más arriba, también actúa como contraión para el ARN en el método de par iónico. El disolvente orgánico empleado en la fase móvil puede ser acetonitrilo, metanol o una mezcla de los dos, de forma muy particularmente preferente acetonitrilo. La purificación del ARN en el paso de método d) utilizando un método de HPLC tal como se describe se lleva a cabo de un modo particularmente favorable con estos disolventes orgánicos. La fase móvil preferentemente es una mezcla de acetato de trietilamonio $0,1\text{M}$, pH 7, y acetonitrilo. Resulta que también es particularmente favorable que la fase móvil contenga entre un 5,0% en volumen y un 20,0% en volumen de disolvente orgánico, basado en la fase móvil, y el resto hasta llegar al 100% en volumen sea el disolvente acuoso. Para el método de acuerdo con la invención resulta muy particularmente favorable que la fase móvil contenga de un 9,5% en volumen a un 14,5% en volumen de disolvente orgánico, basado en la fase móvil, y el resto hasta llegar al 100% en volumen sea el disolvente acuoso. A continuación se puede llevar a cabo la elución del ARN de forma isocrática o por medio de una separación por gradiente. En el caso de una separación isocrática, la elución del ARN se lleva a cabo con un solo agente de elución o una mezcla de varios agentes de elución que permanece constante, siendo posible emplear como agente de elución los disolventes descritos detalladamente más arriba.

La presente descripción también proporciona un método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo, que incluye los siguientes pasos:

- a) proporcionar de un ácido nucleico, en particular un ADNc que codifica un anticuerpo tal como se describe más arriba;
 - b) adicionar el ácido nucleico a un medio de transcripción *in vitro* que comprende una ARN polimerasa, un tampón adecuado, una mezcla de ácidos nucleicos que comprende uno o más nucleótidos (modificados)
- 60 tal como se describen más arriba en sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales A, G, C o U, y opcionalmente uno o más nucleótidos naturales A, G, C o U si no se han de sustituir todos los nucleótidos naturales A, G, C o U, y opcionalmente un inhibidor de RNasa;

- c) incubar el ácido nucleico, en particular un ADNc, en el medio de transcripción *in vitro* y transcripción *in vitro* del ácido nucleico para obtener un ARN (modificado) codificador de anticuerpos;
- d) opcionalmente, purificar el ARN (modificado) codificador de anticuerpos y eliminar los nucleótidos no incorporados del medio de transcripción *in vitro*;
- 5 e) adicionar el ARN (modificado) obtenido en el paso c) (y opcionalmente en el paso d)) a un medio de traducción *in vitro*;
- f) incubar el ARN (modificado) en el medio de traducción *in vitro* y traducción *in vitro* del anticuerpo codificado por el ARN (modificado);
- g) opcionalmente, purificar el anticuerpo traducido en el paso f).
- 10 Los pasos a), b), c) y d) del método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo son idénticos a los pasos a), b), c) y d) del método de transcripción *in vitro* aquí descrito.

En el paso e) del método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo, el ARN (modificado) transcrito en el paso c) (y opcionalmente purificado en el paso d)) se añade a un medio de traducción *in vitro* adecuado. Un medio de traducción *in vitro* adecuado comprende, por ejemplo, material lisado de reticulocitos, extracto de germen de trigo, etc. Un medio de este tipo comprende además convencionalmente una mezcla de aminoácidos. La mezcla de aminoácidos normalmente comprende (todos) los aminoácidos naturales y opcionalmente aminoácidos modificados, por ejemplo 35S-metionina (por ejemplo para controlar la eficiencia de traducción por medio de autorradiografía). Un medio de traducción *in vitro* adecuado también comprende un tampón de reacción. Por ejemplo, en Krieg y Melton (1987) (P. A. Krieg y D. A. Melton (1987) *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase; *Methods Enzymol* 155:397-415) se describen medios de traducción *in vitro*.

15

20

En un paso f) del método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo, el ácido nucleico (modificado) se incuba en el medio de traducción *in vitro* y el anticuerpo codificado por el ácido nucleico (modificado) se traduce *in vitro*. La incubación dura normalmente entre aproximadamente 30 y 240 minutos, preferentemente entre aproximadamente 40 y 120 minutos, y de forma totalmente preferente aproximadamente 90 minutos. La temperatura de incubación oscila normalmente en un intervalo de aproximadamente 25 a 35°C y de forma totalmente preferente aproximadamente 30°C.

25

Los pasos b) a f) del método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo, o algunos pasos individuales de los pasos b) a f), se pueden combinar entre sí, es decir, se pueden llevar a cabo juntos. En este contexto, todos los componentes necesarios se añaden preferentemente juntos al medio de reacción al comienzo o sucesivamente durante la reacción de acuerdo con la secuencia de los pasos b) a f) descritos.

30

El anticuerpo traducido obtenido en el paso f) se puede purificar en un paso g) opcional. La purificación se puede llevar a cabo con métodos conocidos por los expertos en la técnica anterior, por ejemplo cromatografía, tal como cromatografía de afinidad (HPLC, FPLC, etc.), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en gel, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de gases, o detección de anticuerpos, o métodos biofísicos, tales como análisis RMN (véase, por ejemplo, Maniatis et al. (2001) *supra*). En los métodos cromatográficos, incluyendo los métodos de cromatografía de afinidad, se pueden emplear etiquetas adecuadas para la purificación, tal como se describe más arriba, por ejemplo una etiqueta de hexahistidina (etiqueta His, etiqueta de polihistidina), una etiqueta de estreptavidina (etiqueta Strep), una etiqueta SBP (etiqueta de unión de estreptavidina), una etiqueta de GST (glutión S transferasa), etc. La purificación se puede llevar a cabo además a través de un epítipo de anticuerpo (etiqueta de unión de anticuerpo), por ejemplo una marca Myc, un epítipo Swa11, una etiqueta FLAG, una etiqueta HA, etc., es decir, a través del reconocimiento del epítipo por medio de un anticuerpo (inmovilizado) correspondiente. La purificación se puede llevar a cabo igualmente a través del sustrato inmovilizado del anticuerpo específico, es decir, mediante la unión del anticuerpo a un antígeno inmovilizado que es reconocido y, respectivamente, unido de forma específica por el anticuerpo traducido.

35

40

45

La presente descripción también proporciona un método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo en una célula huésped, que incluye los siguientes pasos:

- a) proporcionar un ácido nucleico, en particular un ADNc, que codifica un anticuerpo tal como se describe más arriba;
- 50 b) adicionar el ácido nucleico a un medio de transcripción *in vitro* que comprende una ARN polimerasa, un tampón adecuado, uno o más nucleótidos (modificados) tal como se describen más arriba en sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales A, G, C o U, y opcionalmente uno o más nucleótidos naturales A, G, C o U si no se han de sustituir todos los nucleótidos naturales A, G, C o U;
- 55 c) incubar el ácido nucleico, en particular un ADNc, en el medio de transcripción *in vitro* y transcribir *in vitro* del ácido nucleico para obtener un ARN (modificado) codificador de anticuerpos;

- d) opcionalmente, purificar el ARN (modificado) codificador de anticuerpos y eliminar los nucleótidos no incorporados del medio de transcripción *in vitro*;
- e') transfectar el ARN (modificado) obtenido en el paso c) (y opcionalmente d)) en una célula huésped;
- f') incubar el ácido nucleico (modificado) en la célula huésped y traducir el anticuerpo codificado por el ARN (modificado) en la célula huésped;
- 5 g') opcionalmente, aislar y/o purificar el anticuerpo traducido en el paso f').

Los pasos a), b), c) y d) del método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo en una célula huésped son idénticos a los pasos a), b), c) y d) del método de transcripción *in vitro* aquí descrito y del método de transcripción y traducción *in vitro* aquí descrito para la expresión de un anticuerpo.

- 10 De acuerdo con el paso e') del método de transcripción y traducción *in vitro*, en él se lleva a cabo la transfección del ARN (modificado) obtenido en el paso c) (y opcionalmente en el paso d)) en una célula huésped. En general, la transfección se lleva a cabo por métodos de transfección conocidos en el estado anterior de la técnica (véase, por ejemplo, Maniatis et al. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Métodos de transfección adecuados en el contexto de la presente invención
- 15 incluyen, de forma no exclusiva, por ejemplo métodos de electroporación, incluyendo métodos de electroporación modificados (por ejemplo nucleofección), métodos de fosfato de calcio, por ejemplo el método de coprecipitación de calcio, el método de DEAE-dextrano, el método de lipofección, el método de lipofección mediado por transferrina, transfección de polipreno, bombardeo de partículas, nanoplexes, por ejemplo PLGA, poliplexes, por ejemplo PEI, fusión de protoplastos y el método de microinyección, destacando el método de lipofección en particular como método adecuado. En este contexto, el ARNm (modificado) de acuerdo con la
- 20 invención puede estar en forma desnuda o compleja, tal como se describe más arriba en relación con el ARNm (modificado) de acuerdo con la invención.

- En relación con el paso e') del método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo en una célula huésped, una célula huésped (adecuada) incluye cualquier célula que permita la expresión del anticuerpo codificado por el ARNm (modificado) de acuerdo con la invención, preferentemente cualquier célula eucarionte (por ejemplo células de levadura, células vegetales, células animales y células humanas) o célula procarionte (por ejemplo células bacterianas, etc.). Preferentemente se eligen células de organismos pluricelulares la expresión del anticuerpo codificado por el ARN (modificado) de acuerdo con la invención si se requieren modificaciones postraduccionales, por ejemplo glicosilación de la proteína codificada (acoplado con
- 30 N y/u O). A diferencia de las células procariontes, estas células eucariontes (superiores) posibilitan la modificación postraduccional de la proteína sintetizada. Los expertos en la técnica conocen una gran cantidad de células o líneas celulares eucariontes superiores, por ejemplo células 293T (línea celular renal embrional), HeLa (células de carcinoma de cuello uterino humano), CHO (células de ovario de hámster chino) y otras líneas celulares, incluyendo células y líneas celulares desarrolladas para fines de laboratorio, como por ejemplo
- 35 hTERT-MSK, HEK293, Sf9 o COS. Las células eucariontes adecuadas incluyen además células o líneas celulares afectadas por enfermedades o infecciones, por ejemplo células cancerosas, en particular células cancerosas de cualquiera de los tipos de cáncer mencionados aquí en la descripción, células afectadas por VIH, y/o células del sistema inmunológico o del sistema nervioso central (SNC). Las células humanas o células animales, por ejemplo de los animales mencionados aquí, son particularmente preferentes como células eucariontes. Las células huésped adecuadas se pueden derivar igualmente de microorganismos eucariontes, como levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* (Stinchcomb et al., Nature, 282:39, (1997)), *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, *Pichia*, y hongos filamentosos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, etc. Las células huésped adecuadas incluyen igualmente células procariontes, como por ejemplo células bacterianas, por ejemplo de *Escherichia coli* o de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*,
- 40 *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, preferentemente *E. coli*, etc.

- En el paso f') del método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo en una célula huésped se lleva a cabo la incubación del ARN (modificado) en la célula huésped y la traducción del anticuerpo codificado por el ARN (modificado) en la célula huésped. Para ello se utilizan preferentemente mecanismos de expresión intrínsecos de la célula huésped, por ejemplo mediante traducción de ARN en la célula huésped
- 50 mediante ribosomas y ARNt. La temperatura de incubación utilizada en este contexto depende de los sistemas de célula huésped particulares utilizados.

- En un paso opcional g') se puede aislar y/o purificar el anticuerpo traducido obtenido en el paso f'). En este contexto, un aislamiento del anticuerpo traducido (expresado) comprende normalmente la separación del anticuerpo de constituyentes de reacción y se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos por expertos en la técnica, por ejemplo por lisis celular, descomposición o ultrasonidos, o métodos similares, incluyendo los métodos arriba mencionados. Por tanto, la purificación se puede llevar a cabo por los métodos descritos para el paso e) del método de transcripción y traducción *in vitro* para la expresión de un anticuerpo.
- 55

Para la purificación de anticuerpos (recombinantes) a partir de una célula huésped en el paso g') del método arriba descrito se requiere una elección diferente de las células huésped arriba descritas, dependiendo del uso. Por tanto, la producción de anticuerpos recombinantes en *E. coli* normalmente solo es posible en medida limitada, ya que los anticuerpos codificados por un ARNm (modificado) para su uso de acuerdo con la invención son muy complejos, requieren mecanismos de plegamiento complicados y convencionalmente se someten a modificación postraduccional para utilizarlos en organismos o seres multicelulares. Estos mecanismos convencionalmente no pueden ser aplicados en el citoplasma de *E. coli*. Por ello, se puede utilizar la producción periplásmica en *E. coli*, en la que es posible un plegamiento y una modificación correctos de los fragmentos de anticuerpo. En este contexto, la purificación requiere normalmente la implicación de una descomposición de las bacterias y una separación difícil de todos los constituyentes bacterianos, que pueden actuar como endotoxinas durante un uso terapéutico. Para evitar estos problemas de purificación, en estos casos se pueden utilizar sistemas de expresión para levaduras, células de insectos, células de mamíferos y vegetales de acuerdo con la invención, llevándose a cabo la producción preferentemente en células de mamífero adecuadas, por ejemplo células de hámster (CHO), tal como se describe aquí.

Independientemente de los pasos (a) a (d), el anticuerpo codificado por el ARNm (modificado) para su uso de acuerdo con la invención también se puede expresar mediante el método de traducción *in vitro* de los pasos (e') a (g').

La presente descripción también proporciona un método de transcripción *in vitro* y traducción *in vivo* para la expresión de un anticuerpo en un organismo, que incluye los siguientes pasos:

- a) proporcionar un ácido nucleico, en particular un ADNc, que codifica un anticuerpo tal como se describe más arriba;
- b) adicionar el ácido nucleico a un medio de transcripción *in vitro* que comprende una ARN polimerasa, un tampón adecuado, una mezcla de ácidos nucleicos que comprende uno o más nucleótidos (modificados) tal como se describen más arriba en sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales A, G, C o U, y opcionalmente uno o más nucleótidos naturales A, G, C o U si no se han de sustituir todos los nucleótidos naturales A, G, C o U, y opcionalmente un inhibidor de RNasa;
- c) incubar el ácido nucleico, en particular un ADNc, en el medio de transcripción *in vitro* y transcripción *in vitro* del ácido nucleico para obtener un ARN (modificado) tal como se describe aquí;
- d) opcionalmente, purificar y eliminar los nucleótidos no incorporados del medio de transcripción *in vitro*;
- e'') transfectar el ARN (modificado) obtenido en el paso c) (y opcionalmente en el paso d)) en una célula huésped y trasplantar la célula huésped transfectada en el interior de un organismo;
- f'') traducir el anticuerpo codificado por el ARN (modificado) en el organismo.

Los pasos a), b), c) y d) del método de transcripción *in vitro* y traducción *in vivo* para la expresión de un anticuerpo en un organismo son idénticos a los pasos a), b), c) y d) del método de transcripción *in vitro* aquí descrito, del método de transcripción y traducción *in vitro* aquí descrito para la expresión de un anticuerpo, y del método de transcripción y traducción *in vitro* aquí descrito para la expresión de un anticuerpo en una célula huésped.

Las células huésped, en particular en el paso e''), también pueden incluir células autólogas, es decir, células tomadas de un paciente y devueltas al mismo (células endógenas). Estas células autólogas reducen el riesgo de rechazo por el sistema inmunológico en caso de uso *in vivo*. En el caso de las células autólogas, preferentemente se emplean células (sanas o enfermas) de las regiones/órganos afectados del cuerpo del paciente. Los métodos de transfección son preferiblemente los descritos más arriba en relación con el paso e). En el paso e'') se lleva a cabo un trasplante de la célula huésped al interior de un organismo, adicionalmente al paso e). Un organismo o ser en relación con la presente invención significa normalmente mamíferos, es decir, animales, incluyendo bóvidos, cerdos, perros, gatos, burros, monos, incluyendo roedores, por ejemplo ratones, hámsteres, conejos, etc., y humanos. Alternativamente a los pasos e'') y f''), el aislamiento y/o la purificación se pueden llevar a cabo de acuerdo con los pasos f)/f') y/o g)/g') y a continuación se puede administrar al ser la proteína (terapéuticamente activa) traducida. La administración se puede llevar a cabo tal como se describe en relación con las composiciones farmacéuticas.

En el paso f'') se lleva a cabo la traducción del anticuerpo codificado por el ARN (modificado) en el organismo. En este contexto, la traducción se lleva a cabo preferentemente mediante sistemas específicos para la célula huésped, dependiendo de la célula huésped utilizada.

Independientemente de los pasos (a) a (d), el ARNm (modificado) transcrito de acuerdo con la invención también se puede expresar por un método de traducción *in vitro* de los pasos (e'') a (g'').

Alternativamente a los métodos arriba descritos, en un paso adicional e''') un ARNm (modificado) para su uso de acuerdo con la invención transcrito de acuerdo con los pasos a) a d) puede ser administrado directamente

al organismo, por ejemplo a un humano, por ejemplo mediante la administración del ARN, desnudo o en forma de complejos, por ejemplo utilizando los métodos de transfección arriba descritos, opcionalmente utilizando determinados factores de estabilización aquí descritos. En este contexto, después de la absorción, el ARNm se transporta preferentemente al interior de las células, por ejemplo con secuencias de localización o señal tal como se describen aquí, y preferiblemente se traduce en el anticuerpo codificado en las células.

Ventajas de la invención

La presente invención describe en particular un ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención. Éste puede estar modificado o no modificado, debiendo entenderse la definición de "modificación" en el sentido más amplio. En el contexto de esta invención Un ARNm nativo enlazado de forma covalente con otro grupo, por ejemplo un lípido o un residuo de azúcar, está modificado. Un ARNm que contiene constituyentes no naturales, por ejemplo nucleótidos no nativos, o un ARNm que está modificado con respecto a su precursor por intercambio de nucleótidos, independientemente de si éstos son nativos o no nativos, también está modificado en el contexto de la invención. La gran ventaja de estos ARNm es que no tienen las acciones negativas de las transfecciones de ADN (con incorporación estable en el genoma). Además, en el caso de los ARNm codificadores de anticuerpos modificados se mejora la estabilidad limitada del ARNm codificador de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo. Por tanto, de acuerdo con la invención, después de su administración a pacientes, en particular mamíferos, sobre todo humanos, los anticuerpos son expresados *in vivo* únicamente durante un tiempo estimable más allá del tratamiento y, por consiguiente, no producen efectos nocivos. En cambio, los ADN intracuerpo convencionales se pueden integrar en el genoma de forma estable, o al menos persistente, lo que puede conducir a acontecimientos incontrolables. La gran ventaja en comparación con la administración de anticuerpos monoclonales *in vivo* es además que, con el uso de un ARNm (modificado) codificador de anticuerpos tal como se describe aquí, no es necesario preparar y purificar ningún anticuerpo de un modo implicado y, por tanto, su preparación es considerablemente menos costosa. No obstante, la ventaja más esencial de la presente invención es que con los anticuerpos codificados por ARNm (modificados) de acuerdo con la invención también se pueden alcanzar proteínas expresadas intracelularmente, lo que no es posible con los anticuerpos monoclonales del estado anterior de la técnica conocidos hasta la fecha.

Las siguientes figuras y ejemplos están concebidos para explicar más detalladamente e ilustrar la anterior descripción, de forma no limitativa.

30 Figuras:

- Figura 1** ilustra la estructura de un anticuerpo IgG. Los anticuerpos IgG están formados en cada caso por dos cadenas proteínicas ligeras idénticas y dos cadenas proteínicas pesadas que están unidas entre sí por puentes disulfuro. La cadena ligera comprende el dominio variable N-terminal VL y el dominio constante C-terminal CL. La cadena pesada de un anticuerpo IgG se puede dividir en un dominio variable N-terminal VH y tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3.
- Figura 2** muestra el grupo de genes para las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo:
 (A): Grupo de genes para la cadena ligera κ .
 (B): Grupo de genes para la cadena ligera λ .
 (C) y (D): Grupo de genes para la cadena pesada.
 En este contexto, la región variable de una cadena pesada está compuesta por tres segmentos de gen diferentes. Además de los segmentos V y J, aquí también se encuentran segmentos D adicionales. Los segmentos VH, DH y JH también se pueden combinar entre sí prácticamente de cualquier modo deseado para formar la región variable de la cadena pesada.
- Figura 3** ilustra en forma de un diagrama las diferencias en las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos (es decir, obtenidos en el organismo huésped de ratón), quiméricos, humanizados y humanos.
- Figura 4** muestra una sinopsis de la estructura de diversos fragmentos de anticuerpo. Los constituyentes de los fragmentos de anticuerpo se muestran sobre un fondo gris oscuro.
- Figura 5** muestra diversas variantes de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en las Figuras 5A, 5B y 5C:
 (A) Muestra un diagrama de un anticuerpo IgG de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.
 (B) Muestra un fragmento Fab del dominio variable y un dominio constante en cada caso de una cadena ligera y una cadena pesada. Las dos cadenas están unidas entre sí por un puente disulfuro.
 (C) Muestra un fragmento scFv (no reivindicado) del dominio variable de la cadena ligera y la cadena pesada, que están unidas entre sí por un conector de polipéptido artificial.

- 5 **Figura 6** muestra una presentación de un ARN (modificado) codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención como un constructo de expresión. En ella: VH = dominio variable de la cadena pesada; CH = dominio constante de la cadena pesada; VL = dominio variable de la cadena ligera; CL = dominio constante de la cadena ligera; SIRES = sitio de entrada interna del ribosoma (IRES, superIRES); muag = forma mutada del 3' UTR el gen de alfa-globina; y A70C30 = cola de poli-A-poli-C.
- 10 **Figura 7** muestra un diagrama de la detección de un anticuerpo codificado por un ARN para su uso de acuerdo con la invención mediante ELISA en el ejemplo del antígeno Her2.
- 10 **Figura 8** muestra la secuencia de ADN de tipo silvestre de la cadena pesada del anticuerpo rituximab (= Rituxan, MabThera) (tipo silvestre: contenido de GC: 56,5%, longitud: 1,344) (SEQ ID N°: 1).
- 10 **Figura 9** muestra la secuencia de ADN con optimización de GC de la cadena pesada del anticuerpo rituximab (= Rituxan, MabThera) (contenido de GC: 65,9%, longitud: 1,344) (SEQ ID N°: 2).
- 15 **Figura 10** muestra la secuencia de ADN de tipo silvestre de la cadena ligera del anticuerpo rituximab (= Rituxan, MabThera) (tipo silvestre: contenido de GC: 58,5%, longitud: 633) (SEQ ID N°: 3).
- 15 **Figura 11** muestra la secuencia de ADN con optimización de GC de la cadena ligera del anticuerpo rituximab (= Rituxan, MabThera) (contenido de GC: 67,2%, longitud: 633) (SEQ ID N°: 4).
- 20 **Figura 12** muestra el constructo total de la secuencia de ADN con optimización de GC del anticuerpo rituximab (= Rituxan, MabThera) con las cadenas ligeras y pesadas (SEQ ID N°: 5). El constructo total contiene las siguientes secuencias y sitios de segmentación (véanse también los sitios de segmentación alternativos de la Figura 25, SEQ ID N°: 51):
 conector ACC para una secuencia Kozak óptima
AAGCTT HindIII
 codón de terminación TGA
ACTAGT Spel
 25 AGATCT BgIII
ATGCAT NsiI
 CATCATCATCATCATCAT marca His
 Péptido señal, HLA-A*0201: rico en GC
ATGGCCGTGATGGCGCCGACCCCTGGTCCTCCTGCTGAGCGGCGCCCTCGCCCT
GACGCAGACCTGGGCCGGG.
- 30 La región codificadora de la secuencia de cadena pesada comienza con el péptido señal tal como se indica arriba (*cursiva*). Esta región también está enriquecida con G/C. La secuencia subsiguiente que comienza con CAG representa la secuencia codificadora de anticuerpos real (véase la Figura 9) para la cadena pesada, que termina con AAG y va seguida por la secuencia de marca His arriba descrita. Finalmente, el marco de lectura abierto para la cadena pesada finaliza con el codón de terminación TGA (.....). La región codificadora para la secuencia de cadena ligera comienza en 3' en dirección 5' con el ATG de péptido señal tal como se indica más arriba seguido por la región codificadora de cadena ligera para la cadena ligera que comienza con CAG hacia el codón de terminación TGA (.....) (véase la Figura 11). Las dos regiones codificadoras para la cadena ligera y la cadena pesada están separadas por un elemento IRES (.....). El ARN codificado por el constructo indicada en la Figura 12 puede contener o no una secuencia de marca (His) y puede contener una secuencia de péptido señal diferente de la secuencia de péptido arriba indicada, o incluso puede no tener ninguna secuencia de péptido señal. Por consiguiente, la molécula de ARN contiene preferentemente la región codificadora (con o sin secuencia de péptido señal en su comienzo) de la cadena pesada y/o la cadena ligera (por ejemplo tal como muestra la Figura 12), preferentemente en combinación con al menos un sitio de entrada del ribosoma.
- 45 **Figura 13** muestra la secuencia de ADN de tipo silvestre de la cadena pesada del anticuerpo cetuximab (= Erbitux) (tipo silvestre: contenido de GC: 56,8%, longitud: 1,359) (SEQ ID N°: 6).
- 50 **Figura 14** muestra la secuencia de ADN con optimización de GC de la cadena pesada del anticuerpo cetuximab (= Erbitux) (contenido de GC: 65,9%, longitud: 1,359) (SEQ ID N°: 7).
- 50 **Figura 15** muestra la secuencia de ADN de tipo silvestre de la cadena ligera del anticuerpo cetuximab (= Erbitux) (tipo silvestre: contenido de GC: 58,2%, longitud: 642) (SEQ ID N°: 8).
- 50 **Figura 16** muestra la secuencia de ADN con optimización de GC de la cadena ligera del anticuerpo cetuximab (= Erbitux) (contenido de GC: 65,7%, longitud: 642) (SEQ ID N°: 9).
- 55 **Figura 17** muestra el constructo total de la secuencia de ADN con optimización de GC del anticuerpo cetuximab (= Erbitux) con las cadenas ligeras y pesadas (SEQ ID N°: 10). El constructo total contiene las siguientes secuencias y sitios de segmentación (véanse también los sitios de segmentación alternativos de la Figura 26, SEQ ID N°: 52):
 conector ACC para una secuencia Kozak óptima
 60 AAGCTT HindIII
 codón de terminación TGA
ACTAGT Spel

AGATCT BgIII

ATGCAT NsiI

CATCATCATCATCATCAT marca His

Péptido señal, HLA-A*0201: rico en GC

*ATGGCCGTGATGGCGCCGCGACCCCTGGTCTCTCTGCTGAGCGGGCGCCCTCGCCCT
GACGCAGACTGGGCCGGG.*

5

10

15

20

Figura 18

25

Figura 19

Figura 20

30

Figura 21

Figura 22

35

La región codificadora de la secuencia de cadena pesada comienza con el péptido señal tal como se indica arriba (*cursiva*). Esta región también está enriquecida con G/C. La secuencia subsiguiente que comienza con CAG representa la secuencia codificadora de anticuerpos real (véase la Figura 14) para la cadena pesada, que termina con AAG y va seguida por la secuencia de marca His arriba descrita. Finalmente, el marco de lectura abierto para la cadena pesada finaliza con el codón de terminación TGA (.....). La región codificadora para la secuencia de cadena ligera comienza en 3' en dirección 5' con el ATG de péptido señal tal como se indica más arriba seguido por la región codificadora de cadena ligera para la cadena ligera que comienza con CAG hacia el codón de terminación TGA (.....) (véase la Figura 16). Las dos regiones codificadoras para la cadena ligera y la cadena pesada están separadas por un elemento IRES (.....). El ARN codificado por el constructo indicada en la Figura 17 puede contener o no una secuencia de marca (His) y puede contener una secuencia de péptido señal diferente de la secuencia de péptido arriba indicada, o incluso puede no tener ninguna secuencia de péptido señal. Por consiguiente, la molécula de ARN contiene preferentemente la región codificadora (con o sin secuencia de péptido señal en su comienzo) de la cadena pesada y/o la cadena ligera (por ejemplo tal como muestra la Figura 17), preferentemente en combinación con al menos un sitio de entrada del ribosoma.

muestra la secuencia de ADN de tipo silvestre de la cadena pesada del anticuerpo trastuzumab (= Herceptin) (tipo silvestre: contenido de GC: 57,8%, longitud: 1,356) (SEQ ID N°: 11).

muestra la secuencia de ADN con optimización de GC de la cadena pesada del anticuerpo trastuzumab (= Herceptin) (contenido de GC: 67,0%, longitud: 1,356) (SEQ ID N°: 12).

muestra la secuencia de ADN de tipo silvestre de la cadena ligera del anticuerpo trastuzumab (= Herceptin) (tipo silvestre: contenido de GC: 56,9%, longitud: 645) (SEQ ID N°: 13).

muestra la secuencia de ADN con optimización de GC de la cadena ligera del anticuerpo trastuzumab (= Herceptin) (contenido de GC: 66,4%, longitud: 645) (SEQ ID N°: 14).

muestra el constructo total de la secuencia de ADN con optimización de GC del anticuerpo trastuzumab (= Herceptin) con las cadenas ligeras y pesadas (SEQ ID N°: 15). El constructo total contiene las siguientes secuencias y sitios de segmentación (véanse también los sitios de segmentación alternativos de la Figura 27, SEQ ID N°: 53):

conector ACC para una secuencia Kozak óptima

AAGCTT HindIII

codón de terminación TGA

ACTAGT Spel

40

AGATCT BgIII

ATGCAT NsiI

CATCATCATCATCATCAT marca His

Péptido señal, HLA-A*0201: rico en GC

*ATGGCCGTGATGGCGCCGCGACCCCTGGTCTCTCTGCTGAGCGGGCGCCCTCGCCCT
GACGCAGACCTGGGCCGGG.*

45

50

55

La región codificadora de la secuencia de cadena pesada comienza con el péptido señal tal como se indica arriba (*cursiva*). Esta región también está enriquecida con G/C. La secuencia subsiguiente que comienza con CAG representa la secuencia codificadora de anticuerpos real (véase la Figura 19) para la cadena pesada, que termina con AAG y va seguida por la secuencia de marca His arriba descrita. Finalmente, el marco de lectura abierto para la cadena pesada finaliza con el codón de terminación TGA (.....). La región codificadora para la secuencia de cadena ligera comienza en 3' en dirección 5' con el ATG de péptido señal tal como se indica más arriba seguido por la región codificadora de cadena ligera para la cadena ligera que comienza con CAG hacia el codón de terminación TGA () (véase la Figura 21). Las dos regiones codificadoras para la cadena ligera y la cadena pesada están separadas por un elemento IRES (.....). El ARN codificado por el constructo indicada en la Figura 22 puede contener o no una secuencia de marca (His) y puede contener una secuencia de péptido señal diferente de la secuencia de péptido arriba indicada, o incluso puede no tener ninguna secuencia de péptido señal. Por consiguiente, la molécula de ARN contiene preferentemente la región codificadora (con o sin secuencia

de péptido señal en su comienzo) de la cadena pesada y/o la cadena ligera (por ejemplo tal como muestra la Figura 22), preferentemente en combinación con al menos un sitio de entrada del ribosoma.

5 **Figura 23** muestra la expresión de anticuerpos mediada por ARN en cultivo celular. Unas células CHO o BHK se sometieron a transfección con 20 µg de ARNm codificador de anticuerpos para su uso de acuerdo con la invención que había sido producido (ARN, enriquecido con G/C, véase más arriba) o sometido a transfección simulada. 24 horas después de la transfección se analizó la síntesis de proteínas mediante transferencia Western de lisados celulares. Las células hospedaron aproximadamente 0,5 µg de proteína según se evaluó mediante análisis por transferencia Western. Cada pista representa un 10% del material lisado total. Unos anticuerpos humanizados sirvieron como control y para una estimación aproximada de los niveles de proteínas. El anticuerpo de detección reconoce tanto las cadenas pesadas como las cadenas ligeras; además muestra cierta tinción no específica con materiales lisados celulares (tres bandas distintas que migran mucho más lentamente que las de los anticuerpos). Una comparación con anticuerpos de control demuestra claramente que las cadenas pesadas y ligeras se producían en cantidades iguales.

10 **Figura 24** muestra que una expresión de anticuerpos mediada por ARN da lugar a una proteína funcional (anticuerpo). La formación de anticuerpos funcionales se abordó mediante tinción con FACS de células diana que expresan antígenos. Con el fin de examinar la producción de anticuerpos funcionales, después de 48 a 96 horas se recogieron sobrenadantes de cultivo celular de células sometidas a transfección con ARN (20 µg de Ab-ARN tal como se define más arriba en el Ejemplo 1). Aproximadamente un 8% del sobrenadante total se utilizó para teñir células diana que expresan en antígeno respectivo. Unos anticuerpos humanizados sirvieron como control y para una estimación aproximada de los niveles de proteínas. Anticuerpos primarios utilizados para la tinción celular: a) anticuerpo humanizado; b) ninguno; c, d) sobrenadante de células sometidas a transfección con ARN que expresan el anticuerpo respectivo; e) sobrenadante de células CHO sometidas a transfección simulada. Los cálculos basados en el análisis mostrados en la Figura 24 revelan que las células segregaron más de 12-15 µg de anticuerpo funcional en un plazo de 48-96 horas. Por consiguiente, la presente invención demuestra que los anticuerpos codificadores de ARN pueden entrar en la célula, pueden ser expresados dentro de la célula y después la célula segrega cantidades considerables de anticuerpos codificados por ARN en el medio/espacio extracelular circundante. Por consiguiente, la transfección celular *in vivo* o *in vitro* mediante el ARN puede ser utilizada para proporcionar anticuerpos que actúan por ejemplo terapéuticamente en el espacio extracelular.

35 **Figura 25** muestra una secuencia alternativa del constructo de la Figura 12 (anticuerpo rituximab), en la que los sitios de restricción han sido modificados en comparación con la SEQ ID N°: 5 de la Figura 12 (SEQ ID N°: 51). Véase la Figura 12 para una información más precisa en relación con la descripción de diversos elementos de secuencia.

40 **Figura 26** muestra una secuencia alternativa del constructo de la Figura 17 (anticuerpo cetuximab), en la que los sitios de restricción han sido modificados en comparación con la SEQ ID N°: 10 de la Figura 17 (SEQ ID N°: 52). Véase la Figura 17 para una información más precisa en relación con la descripción de diversos elementos de secuencia.

45 **Figura 27** muestra una secuencia alternativa del constructo de la Figura 22 (anticuerpo trastuzumab), en la que los sitios de restricción han sido modificados en comparación con la SEQ ID N°: 15 de la Figura 22 (SEQ ID N°: 53). Véase la Figura 22 para una información más precisa en relación con la descripción de diversos elementos de secuencia.

Los siguientes ejemplos explican la presente invención más detalladamente, de forma no limitativa.

Ejemplos

50 1. Ejemplo

1.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo celular utilizadas:

Las líneas celulares HeLa (línea celular de carcinoma de cuello uterino humano; Her2-positiva), HEK293 (riñón embrionario humano; Her2-negativo) y BHK21 (riñón de hámster sirio; Her2-negativo) se obtuvieron de la DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) en Braunschweig y se cultivaron en medio RPMI enriquecido con L-glutamina 2 mM (Bio Whittaker) y 10 µg/ml de estreptomycin y 10 U/ml de penicilina a 37°C bajo un 5% de CO₂.

1.2 Preparación de vectores de expresión para secuencias de ARN modificadas de acuerdo con la invención:

Para la producción de secuencias de ARN modificadas de acuerdo con la invención, las secuencias de ADN enriquecidas con GC y optimizadas en cuanto a la traducción que codifican una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo (por ejemplo cetuximab (Erbix), trastuzumab (Herceptin), rituximab (Rituxan), véanse las SEQ ID N°: 1-15, en las que las SEQ ID N°: 1, 3, 6, 8, 11 y 13 representan las secuencias codificadoras particulares que no están optimizadas en cuanto a GC de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de estos anticuerpos, y las SEQ ID N°: 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 y 15 representan las secuencias codificadoras enriquecidas con GC (véase más arriba)) se clonaron en el vector pCV19 (CureVac GmbH) mediante métodos de biología molecular estándar. Para asegurar la expresión equimolar de las dos cadenas se introdujo un IRES (sitio de entrada interna del ribosoma). La 3' UTR (región no traducida) mutada del gen de alfa-globina y una cola de poli-A-poli-C en el extremo 3' sirven para la estabilización adicional del ARNm. El péptido señal del gen HLA-A*0201 está codificado para la secreción del anticuerpo expresado. Adicionalmente se introdujo una marca His para la detección del anticuerpo. La Figura 6 muestra los constructos de expresión utilizados.

1.3 Preparación del ARNm codificador de anticuerpos enriquecido con G/C y optimizado en cuanto a la traducción:

Se llevó a cabo una transcripción *in vitro* por medio de T7 polimerasa (T7-Opti mRNA Kit, CureVac, Tübingen, Alemania), seguida por una purificación con Pure Messenger™ (CureVac, Tübingen, Alemania). Para ello, en primer lugar se llevó a cabo una digestión con DNasa, seguida de una precipitación con LiCl y después una HPLC utilizando una fase inversa porosa como fase estacionaria (mensajero PURE).

1.4 Detección de anticuerpo ARN por medio de citometría de flujo:

Un millón de células se sometieron a transfección con el ARNm de acuerdo con una de las SEQ ID N°: 5, 10 o 15 (véase más arriba), que codifican un anticuerpo tal como se describe más arriba, por medio de electroporación, y después se cultivaron en el medio durante 16 horas. El anticuerpo expresado se detectó por medio de un anticuerpo de marca His acoplado con FITC. Alternativamente, el anticuerpo segregado del sobrenadante de células transfectadas se añadió a células no transfectadas que expresan antígeno y, después de la incubación, se detectó mediante el mismo método.

1.5 Detección *in vitro* de un anticuerpo codificado por un ARN de acuerdo con la invención mediante ELISA:

Una placa de microtitulación se cargó con un anticuerpo múrido (1) contra un primer antígeno (HER-2). Después se añadió a la placa lisado celular de células que expresan antígeno. El antígeno se unió aquí mediante el anticuerpo específico de antígeno múrido (1). Después se añadió a la placa de microtitulación el sobrenadante de células transfectadas con un ARNm modificado de acuerdo con la invención que codifica un anticuerpo específico de HER-2. El anticuerpo específico de HER-2 (2) contenido en el sobrenadante se une similarmente al antígeno unido a anticuerpo, reconociendo los dos anticuerpos diferentes dominios del antígeno. Para la detección del anticuerpo unido (2) se añadió IgG antihumana acoplada con peroxidasa de rábano picante (3-HRP), el substrato TMB se convirtió y el resultado se determinó fotométricamente.

1.6 Detección *in vivo* de un anticuerpo codificado por un ARN de acuerdo con la invención:

Un ARN(m) codificador de anticuerpos de acuerdo con la invención tal como se describe más arriba se inyectó vía intradérmica o intramuscular en ratones BALB/c. Veinticuatro horas después, los tejidos correspondientes se extirparon y se prepararon extractos proteínicos. La expresión del anticuerpo se detectó con ELISA, tal como se describe aquí.

1.7 Detección de un anticuerpo codificado por un ARN de acuerdo con la invención mediante transferencia Western:

Los anticuerpos expresados del sobrenadante de células sometidas a transfección con un ARNm modificado que codifica un anticuerpo tal como se describe más arriba se separaron por medio de una electroforesis en gel acrilamida y después se transfirieron a una membrana. Después de una incubación con anticuerpo de marca anti-His y un segundo anticuerpo acoplado con peroxidasa de rábano picante, el anticuerpo expresado se detectó por quimioluminiscencia.

1.8 Modelo de tumor:

Se inyectaron células SKOV-3 en ratones BALB/c vía subcutánea. Durante los 28 días siguientes se inyectaron en la vena caudal de los ratones ocho porciones de 10 µg de un ARNm modificado que codifica un anticuerpo tal como se describe más arriba. El crecimiento del tumor se controló durante un período de 5 semanas.

2. Ejemplo

2.1 Líneas celulares

5 La expresión de anticuerpos humanizados basada en ARN se llevó a cabo en células CHO-K1 o BHK-21. Para registrar niveles de anticuerpos se utilizaron las líneas celulares tumorales BT-474, A-431 y Raji, que expresan intensamente HER2, EGFR y CD20, respectivamente. Todas las líneas celulares, excepto CHO, se mantuvieron en RPMI complementado con FCS y glutamina de acuerdo con la información del proveedor. Las células CHO se cultivaron en Ham's F12 complementado con 10% FCS. Todas las líneas celulares se obtuvieron de la colección alemana de cultivos celulares (DSMZ).

2.2 Expresión de anticuerpos

10 Diversas cantidades de ARN de anticuerpo (enriquecido con G/C tal como se define mediante las Figuras 12, 17, 22, 25, 26, 27) codificador de los anticuerpos humanizados Herceptin, Erbitux y Rituxan, respectivamente, (véase la descripción dada más arriba para el Ejemplo 1) se sometieron a transfección en células CHO o BHK mediante electroporación. Las condiciones fueron las siguientes: 300 V, 450 μ F para CHO y 300 V, 150 μ F para BHK. Después de la transfección, las células se sembraron sobre placas de cultivo celular de 24 pocillos en una densidad de 2-400.000 células por pocillo. Para la recogida de proteína segregada, el medio se substituyó por 250 μ l de medio fresco después de la unión de las células a la superficie de plástico. La proteína segregada se recogió durante 24-96 horas y se guardó a 4°C. Además, las células se cosecharon en 50 μ l de solución salina tampón de fosfato que contenía un 0,5% de BSA y se rompieron mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Los lisados celulares se aclararon por centrifugación y se guardaron a -80°C.

2.3 Análisis por transferencia Western

20 Para detectar la traducción de ARN transfectado, las proteínas de sobrenadantes de cultivo celular o de lisados celulares se separaron mediante un SDS-PAGE 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Como controles se utilizaron los anticuerpos humanizados Herceptin (Roche), Erbitux (Merck KGAA) y Mabthera = Rituxan (Roche). Una vez completa la transferencia, las membranas se incubaron consecutivamente con IgG antihumana de cabra biotinilada (Dianova), estreptavidina acoplada con peroxidasa de rábano picante (BD), y un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Pico, Pierce). La tinción se detectó con una cámara de quimioluminiscencia Fuji LAS-1000.

2.4 Análisis FACS

30 200.000 células diana que expresaban el antígeno respectivo se incubaron con anticuerpos de control (Herceptin, Erbitux, Mabthera) o sobrenadantes de cultivo celular. Para la detección de anticuerpos unidos, las células se tiñeron con IgG antihumana de cabra biotinilada (Dianova) y estreptavidina marcada con PE (Invitrogen). Las células se analizaron en un FACSCalibur (BD).

ES 2 614 901 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	CureVac GmbH	
	<120>	Anticuerpo codificado por ARN	
5	<130>	CU01P048WO	
	<140>		
	<141>		
10	<150>	DE 102007001370.3-41	
	<151>	09-01-2007	
	<160>	53	
15	<170>	PatentIn version 3.3	
	<210>	1	
	<211>	1344	
	<212>	ADN	
20	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Anticuerpo Rituximab - tipo silvestre, cadena pesada	
25	<400>	1	
		caggcgtatc tgcagcagag cggcgcgga a ctggtgcgcc cggcgcgag cgtgaaaatg	60
		agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc agctataaca tgcattgggt gaaacagacc	120
		ccgcgccagg gcctggaatg gattggcgcg atttatccgg gcaacggcga taccagctat	180
		aaccagaaat ttaaaggcaa agcagacctg accgtggata aaagcagcag caccgcgtat	240
		atgcagctga gcagcctgac cagcgaagat agcgcggtgt atttttgcbc gcgcgtggtg	300
		tattatagca acagctattg gtattttgat gtgtggggca ccggcaccac cgtgaccgtg	360
		agcggccccg gcgtgtttcc gctggcgccc agcagcaaaa gcaccagcgg cggcaccgcg	420
		gcgcgtgggct gcctggtgaa agattatfff ccggaaccgg tgaccgtgag ctggaacagc	480
		ggcgcgctga ccagcggcgt gcataccttt ccggcgggtgc tgcagagcag cggcctgtat	540
		agcctgagca gcgtggtgac cgtgccgagc agcagcctgg gcaccagac ctatatttgc	600
		aacgtgaacc ataaaccgag caacaccaa gtggataaaa aagcggaaacc gaaaagctgc	660
		gataaaacc atacctgcc gccgtgccg gcgccggaac tgctgggcgg cccgagcgtg	720
		tttctgtttc cgccgaaacc gaaagatacc ctgatgatta gccgcacccc ggaagtgacc	780
		tgcgtggtgg tggatgtgag ccatgaagat ccggaagtga aatttaactg gtatgtggat	840
		ggcgtggaag tgcataacgc gaaaaccaa ccgcgcgaag aacagtataa cagcacctat	900
		cgcggtgta gcgtgctgac cgtgctgcat caggattggc tgaacggcaa agaataaaa	960
		tgcaaagtga gcaacaaagc gctgccggcg ccgattgaaa aaaccattag caaagcga	1020
		ggccagccgc gcgaaccgca ggtgtatacc ctgccgccga gccgcgatga actgaccaa	1080
		aaccaggtga gcctgacctg cctggtgaaa ggcttttacc cgagcgatat tgcggtggaa	1140
		tgggaaagca acggccagcc ggaaaacaac tataaaacca ccccgccggt gctggatagc	1200
		gatggcagct tttttctgta tagcaactg accgtggata aaagccgctg gcagcagggc	1260
		aacgtgttta gctgcagcgt gatgcatgaa gcgctgcata accattatac ccagaaaagc	1320
		ctgagcctga gcccgggcaa ataa	1344

ES 2 614 901 T3

<210> 2
 <211> 1344
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Anticuerpo Rituximab - cadena pesada optimizada en relación con GC

10 <400> 2
 caggcctacc tgcagcagag cggcgcgag ctcgtgcggc cgggggcctc ggtcaagatg 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccttcacg agctacaaca tgcactgggt gaagcagacc 120
 ccgcgccagg ggctggagtg gatcggcgcc atctaccccg ggaacggcga caccagctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggcgaccctg acggtggaca agtcgagcag caccgcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac ctcggaggac agcgcctct acttctgctc ccgggtggtg 300
 tactacagca acagctactg gtacttcgac gtctggggga ccggcacgac cgtgaccgtg 360
 agcgggcccga gcgtcttccc cctggcccc tcgagcaaga gcaccagcgg cggcacggcg 420
 gccctcgggt gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtcag ctggaactcg 480
 ggcgccctga ccagcggggt gcacaccttc ccggccgtgc tccagagcag cggcctgtac 540
 agcctgagct cggctcgtgac ggtgcccagc agcagcctcg ggaccagac ctacatctgc 600
 aacgtcaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggcggagcc caagtcgtgc 660
 gacaagacgc acacctgccc gccctgcccc gccccgagc tgctgggcgg cccgagcgtg 720
 ttctcttcc cgcccaagcc caaggacacc ctgatgatca gccgcacccc cgaggtcacg 780
 tgcgtggtgg tcgacgtgag ccacgaggac cccgaggtga agttcaactg gtacgtcgac 840
 ggggtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccccgaggag agcagtacaa cagcacctac 900
 cgcgtcgtga gcgtgctgac cgtcctccac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgcaagggtg cgaacaaggc cctgccggcc cccatcgaga agacgatcag caaggcgaag 1020
 gggcagcccc gggagcccc ggtgtacacc ctcccgccca gccgcgacga gctgaccaag 1080
 aaccaggctc gcctgacctg cctcgtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagtcga acgggcagcc cgagaacaac tacaagacga ccccgcccgt cctggacagc 1200
 gacggcagct tcttctgta cagcaagctc accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 1260
 aacgtgttca gctgctcggg catgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctca gccccgggaa gtga 1344

<210> 3
 <211> 633
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Anticuerpo Rituximab - tipo silvestre, cadena ligera

20 <400> 3

ES 2 614 901 T3

	cagattgtgc tgagccagag cccggcgatt ctgagcgcga gcccgggcca aaaagtgacc	60
	atgacctgcc gcgcgagcag cagcgtgagc tatatgcatt ggtatcagca gaaaccgggc	120
	agcagcccga aaccgtggat ttatgcgccg agcaacctgg cgagcggcgt gccggcgcgc	180
	tttagcggca gcggcagcgg caccagctat agcctgacca ttagccgcgt ggaagcggaa	240
	gatgcggcga cctattattg ccagcagtgg agctttaacc cgccgacctt tggcgcgggc	300
	accaaactgg aactgaaacg caccgtggcg gcgccgagcg tgtttatttt tccgccgagc	360
	gatgaacagc tgaagagcgg caccgcgagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttttatccg	420
	cgcaagcga aagtgcagtg gaaagtggat aacgcgctgc agagcggcaa cagccaggaa	480
	agcgtgaccg aacaggatag caaagatagc acctatagcc tgagcagcac cctgacctg	540
	agcaaagcgg attatgaaaa acataaagtg tatgcgtgcg aagtgacca tcagggcctg	600
	agcagcccgg tgaccaaag ctttaaccgc taa	633
	<210> 4	
	<211> 633	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Anticuerpo Rituximab - Cadena ligera optimizada en relación con GC	
	<400> 4	
	cagatcgtgc tgagccagtc gccggccatc ctcagcgcga gcccgggcca gaaggtcacc	60
	atgacgtgcc gggccagcag ctcggtgagc tacatgcact ggtaccagca gaagcccggg	120
	agcagcccca agccgtggat ctacgcccc agcaacctgg cctcgggcgt gccgcgcgc	180
	ttcagcggga gcggcagcgg gaccagctac agcctgacca tctcgcgggt cgaggccgag	240
	gacgcccca cctactactg ccagcagtgg agcttcaacc cgcccacgtt cggcgcgggc	300
	accaagctcg agctgaagcg caccgtggcg gccccagcg tgttcatctt cccgccagc	360
	gacgagcagc tgaagagcgg gaccgcctcg gtcgtgtgcc tctgaacaa cttctacccc	420
	cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtcgac aacgcgctgc agagcggcaa cagccaggag	480
	agcgtgacgg agcaggacag caaggacagc acctactcgc tcagcagcac cctgacctg	540
	agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtcacgca ccaggggctc	600
	agctcggccg tgaccaagag cttcaaccgc tga	633
	<210> 5	
15	<211> 2269	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Anticuerpo Rituximab ARN modificado para las cadenas ligera y pesada en el constructo total	
	<400> 5	

aagcttacca tggccgtgat ggcgccgagg accctggctcc tctctgtgag cggcgccctc 60
 gccctgacgc agacctgggc cgggcaggcc tacctgcagc agagcggcgc ggaactcgtg 120
 cggccggggg cctcgggtcaa gatgagctgc aaggccagcg gctacacctt cagcagctac 180
 aacatgcaact ggggtgaagca gacccccgcg caggggctgg agtggatcgg cgccatctac 240
 cccgggaaacg gcgacaccag ctacaaccag aagttcaagg gcaaggcgac cctgacgggtg 300
 gacaagtcca gcagcaccgc ctacatgcag ctacagagcc tgacctcggg ggaacagcgc 360
 gtctacttct gcgccgggt ggtgtactac agcaacagct actggtactt cgactctctgg 420
 gggaccggca cgacctgac cgtgagcggg cccagcgtct tccccctggc cccctcgagc 480
 aagagcacca gcggcggcac ggcggccctc ggggtcctgg tgaaggacta cttccccgag 540
 cccgtgaccg tcagctggaa ctcgggcgcc ctgaccagcg gggtgacac cttccccggc 600
 gtgtccaga gcagcggcct gtacagcctg agctcggctg tgacgggtgc cagcagcagc 660
 ctccgggacc agacctacat ctgcaacgtc aaccacaagc ccagcaaac caaggtggac 720
 aagaaggcgg agcccaagtc gtgcgacaag acgcacacct gcccgccctg ccccccccc 780
 gactcgtctg gcggcccgag cgtgttctc tcccccgcca agcccaagga caccctgatg 840
 atcagccgca cccccaggt cacgtcgtg gtggctcagc tgagccaca ggaacccgag 900
 gtgaagtcca actggtactg cagcgggggt gagggtcaca acgccaagc caagccccgg 960
 gaggagcagt acaacagcac ctaccgcgtc gtgagcgtgc tgaacctctt ccaacaggac 1020
 tggctgaacg gcaaggagta caagtcaag gtgtcgaaca aggccctgcc ggcctccatc 1080
 gagaagacga tcagcaaggc gaaggggag ccccgggagc cccaggtgta caccctccc 1140
 cccagccgag acgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctcgt gaagggttc 1200
 taccacagcg acatcggctt gtagtgggag tcgaacgggc agcccgagaa caactacaag 1260
 acgaccccg cctctctgga cagcagcggc agcttcttcc tgtacagcaa gctcaccgtg 1320
 gacaagagcc ggtggcagca gggcaacgtg ttcagctgct cggctatgca cgaagccctg 1380
 cacaacct acaccagaa gagcctgagc ctacgcccc ggaagcata tcatcatcat 1440
 cattgaccag atctttctga catttctgac atttctgaca tttctgacat ttctgacatt 1500
 tctgacattt ctgacatttc tgacatttct gacatttctg acatagcat acctaggccg 1560
 tgatggcgc cgggaccctg gtcctctgc tgagcggcgc cctgcctctg acgcagacct 1620
 gggccgggca gatcgtgctg agccagtcgc cggccatctt cagcgcgagc cccggcgaga 1680
 aggtaccat gactgcccgg gccagcagct cgggtgagta catgactgg taccagcaga 1740
 agccggggag cagcccaag ccgtggatct acgccccag caacctggcc tcgggctgct 1800
 ccgcccgtt cagcgggagc ggcagcggga ccagctacag cctgacctc tcgcccgtc 1860
 agggcgagga cgcgccacc tactactgcc agcagtgagg cttcaaccg ccaagttctg 1920
 gcgcccgcac caagctcag ctgaagcga ccgtggcggc ccccagcgtg ttcacttctc 1980
 cgcaccagca cgagcagctg aagagcggga ccgctcggg cgtgtgcctc ctgaacaact 2040
 tctaccctcg ggagccaag gtgcagtgga aggtcgacaa cgcctgagc agcggcaaca 2100
 gccaggagag cgtgacggag caggacagca aggacagac ctactcgtc agcagcacc 2160

tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaagggtgta cgcctgagag gtcacgcacc 2220
aggggctcag ctcgcccgtg accaagagct tcaaccgctg accactagt 2269

ES 2 614 901 T3

<210> 6
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Anticuerpo cetuximab (= Erbitux) - tipo silvestre, cadena pesada
 <400> 6
 caggTgcagc tGaaacagag cggcccgggc ctggtgcagc cgagccagag cctgagcatt 60
 acctgcaccg tgagcggctt tagcctgacc aactatggcg tgcattgggt gcgccagagc 120
 ccgggcaaag gcctggaatg gctgggcgtg atttggagcg gcggcaacac cgattataac 180
 accccgttta ccagccgcct gagcattaac aaagataaca gcaaaaagcca ggtgtttttt 240
 aaaaTgaaca gcctgcagag caacgatacc gcgatttatt attgcgcgcg cgcgctgacc 300
 tattatgatt atgaatttgc gtattggggc cagggcacc tggtgaccgt gagcgcggcg 360
 agcaccaaag gcccgcagcgt gtttccgctg gcgccgagca gcaaaagcac cagcggcggc 420
 accgcggcgc tgggctgcct ggtgaaagat tattttccgg aaccggtgac cgtgagctgg 480
 aacagcggcg cgctgaccag cggcgtgcat acctttccgg cgggtctgca gagcagcggc 540
 ctgtatagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg ccgagcagca gcctgggcac ccagacctat 600
 atttgcaacg tgaaccataa accgagcaac accaaagtgg ataaacgcgt ggaaccgaaa 660
 agcccgaaaa gctgcgataa aaccataacc tgcccgccgt gcccggcgcc ggaactgctg 720
 ggcggcccga gcgtgtttct gtttccgccg aaaccgaaag ataccctgat gattagccgc 780
 accccggaag tgacctgcgt ggtggtggat gtgagccatg aagatccgga agtgaatttt 840
 aactggtatg tggatggcgt ggaagtgcac aacgcgaaaa ccaaaccgcg cgaagaacag 900
 tataacagca cctatcgcgt ggtgagcgtg ctgaccgtgc tgcacagga ttggctgaac 960
 ggcaaagaat ataaatgcaa agtgagcaac aaagcgcgtc cggcgcgat tgaaaaaac 1020
 attagcaaag cgaaaggcca gccgcgcaa ccgcaggtgt ataccctgcc gccgagccgc 1080
 gatgaactga ccaaaaacca ggtgagcctg acctgcctgg tgaaaggctt ttatccgagc 1140
 gatattgcgg tggaatggga aagcaacggc cagccgaaa acaactataa aaccacccc 1200
 ccggtgctgg atagcgatgg cagctttttt ctgtatagca aactgaccgt ggataaaagc 1260
 cgctggcagc agggcaacgt gtttagctgc agcgtgatgc atgaagcgtc gcataacat 1320
 10 tataaccaga aaagcctgag cctgagcccc ggcaaataa 1359
 <210> 7
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Anticuerpo Cetuximab (= Erbitux) - Cadena pesada optimizada en relación con GC
 <400> 7

ES 2 614 901 T3

```

cagggtgcagc tgaagcagag cggccccggg ctcgtccagc cctcgcagag cctgagcatc 60
acctgcacgg tgagcggctt cagcctgacc aactacgggg tgactgggt ccggcagtcg 120
cccggcaagg ggctcgagtg gctgggcgtg atctggagcg gcgggaacac cgactacaac 180
acccccctca cgagccgctt gagcatcaac aaggacaaca gcaagtcgca ggtgttcttc 240
aagatgaaca gcctccagag caacgacacc gccatctact actgcgcgcg ggccctgacc 300
tactacgact acgagttcgc ctactggggc caggggaccc tggtcacggt gagcgcgcg 360
agcaccaagg gcccagcgt gttccccctc gccccctcga gcaagagcac cagcggcggg 420
accgccgcc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg agccggtgac ggtgagctgg 480
aactcggggg ccctcaccag cggcgtccac accttccccg cgggtctgca gagcagcggg 540
ctgtacagcc tcagctcggg ggtcaccgtg cccagcagca gcctgggcac gcagacctac 600
atctgcaacg tgaaccacaa gccagcaac accaaggtcg acaagcgcgt ggagccgaag 660
tcgccaaga gctgcgacaa gaccacacg tgcccgcctt gccccgccc cgagctgctc 720
ggcgggcca gcgtgttctt gttccccgcc aagcccaagg acacctgat gatcagccgg 780
acccccgagg tcacctgctt ggtggtcgac gtgagccacg aggaccgga ggtgaagttc 840
aactggtacg tcgacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga cgaagccccg cgaggagcag 900
tacaacagca cctaccgggt cgtgtcgggt ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaa 960
gggaaggagt acaagtgcaa ggtgagcaac aaggccctcc ccgcgccat cgagaagacc 1020
atcagcaagg ccaaggcca gccgcgcgag cccaggtgt acacgtgcc cccagccgg 1080
gacgagctga ccaagaacca ggtcagcctc acctgcctgg tgaaggggtt ctaccctcg 1140
gacatcgcg tgagtgagg gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacgccc 1200
ccggtcctgg acagcgacgg cagcttcttc ctctacagca agctgaccgt ggacaagagc 1260
cgctggcagc aggggaacgt gttctcgtgc agcgtcatgc acgaggcct gcacaaccac 1320
tacaccaga agagcctcag cctgagcccc ggcaagtga 1359

```

5 <210> 8
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Anticuerpo Cetuximab (= Erbitux) - tipo silvestre, cadena ligera

```

<400> 8
gatattctgc tgaccagag cccggtgatt ctgagcgtga gcccgggcca acgctgagc 60
tttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgacc 120
aacggcagcc cgcgcctgct gattaaatat gcgagcgaac gcattagcgg cattccgagc 180
cgcttttagc gcagcggcag cggcaccgat tttaccctga gcattaacag cgtggaaagc 240
gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg 300
ggcaccaaac tggaaactgaa acgcaccgtg gcggcggcca gcgtgtttat tttccgccc 360

```

ES 2 614 901 T3

	agcgatgaac agctgaaaag cggcaccgcg agcgtggtgt gcctgctgaa caacttttat	420
	ccgcgcgaag cgaaagtgca gtggaaagtg gataacgcgc tgcagagcgg caacagccag	480
	gaaagcgtga ccgaacagga tagcaaagat agcacctata gcctgagcag caccctgacc	540
	ctgagcaaag cggattatga aaaacataaa gtgtatgcgt gcgaagtgac ccatcagggc	600
	ctgagcagcc cggtgaccaa aagctttaac cgcggcgcgt aa	642
	<210> 9	
	<211> 642	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Anticuerpo cetuximab (= Erbitux) - Cadena ligera optimizada en relación con GC	
	<400> 9	
	gacatcctgc tcaccagag cccggtgatc ctgtcggcca gccccggcga gcgggtgagc	60
	ttcagctgcc gcgccagcca gtcgatcggg acgaacatcc actggtacca gcagcggacc	120
	aacggcagcc cccgcctgct catcaagtac gcgagcgaga gcatcagcgg gatcccctcg	180
	cggttcagcg gcagcgggag cggcaccgac ttcaccctga gcatcaacag cgtggagtcg	240
	gaggacatcg ccgactacta ctgccagcag aacaacaact ggccgacgac cttcggcgcc	300
	gggaccaagc tggagctcaa gcgcaccgtc gccgcgccca gcgtgttcat cttcccggcc	360
	agcgacgagc agctgaagag cggcacggcc agcgtggtct gcctgctcaa caacttctac	420
	ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcagtcggg gaacagccag	480
	gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgtcgag caccctcacg	540
	ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcgt gcgaggtgac ccaccagggc	600
	ctgagcagcc ccgtcaccaa gtcgttcaac cgcggcgcct ga	642
	<210> 10	
15	<211> 2293	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Anticuerpo Cetuximab (= Erbitux) - construcción total con cadenas pesadas y ligeras optimizadas en relación con GC	
	<400> 10	
	aagcttacca tggccgtgat ggcgccgagg accctggtcc tcctgctgag cggcgcctc	60
	gccctgacgc agacctgggc cgggcaggtg cagctgaagc agagcggccc ggggctcgtc	120
	cagccctcgc agagcctgag catcacctgc acggtgagcg gcttcagcct gaccaactac	180
	gggggtgact ggggtccggca gtcgcccggc aaggggctcg agtggctggg cgtgatctgg	240
	agcggcggga acaccgacta caacaccccc ttcacgagcc gcctgagcat caacaaggac	300
	aacagcaagt cgcaggtggt cttcaagatg aacagcctcc agagcaacga caccgccatc	360
	tactactgcg cgcgggccct gacctactac gactacgagt tcgcctactg gggccagggg	420
	accctggtca cggtagcgc cgcgagcacc aagggcccga gcgtgttccc cctcgcccc	480

ES 2 614 901 T3

```

tcgagcaaga gcaccagcgg cgggaccgcc gccctgggct gcctgttcaa ggactacttc 540
cccagaccgg tgacggtgag ctggaactcg gggccctca cagcggcgt ccacaccttc 600
cccgcggtgc tgcagagcag cgggctgtac agcctcagct cgggtgtcac cgtgccagc 660
agcagcctgg gcacgcagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagccag caacaccaag 720
gtcgacaagc gcgtggagcc gaagtcgccc aagagctgcg acaagaccca cactgcccc 780
ccctgcccc cccccgact gctcggcggg cccagcgtgt tcctgttccc gcccaagccc 840
aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc gaggtcacct gcgtggtggt cgacgtgagc 900
cacgagacc cggaggtgaa gttcaactgg tacgtcgagc gcgtggaggt gcaacaagcc 960
aagacgaagc cccgcgagga gcagtacaac agcacctacc gggctgtgtc ggtgtcaacc 1020
gtcctgcacc aggactggct gaacgggaag gagtacaagt gcaaggtgag caacaaggcc 1080
ctccccgcgc ccacagaaa gaccatcagc aaggccaagg gccagcccg cagccccag 1140
gtgtacacgc tgccccccag ccgggacgag ctgaccaaga accaggtcag cctcaactgc 1200
ctgggtaagg ggttctaccc gtcggacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc 1260
gagaacaact acaagaccac gcccccggtc ctggacagcg acggcagcct ctctctctac 1320
agcaagctga ccgtggacaa gagcccgctgg cagcagggga acgtgttctc gtgcagctc 1380
atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc cagaagagcc tcagcctgag ccccgcaag 1440
catcatcctc atcatcattg accagatctt tctgacattt ctgacatttc tgacatttct 1500
gacatttctg acatttctga catttctgac atttctgaca tttctgacat ttctgacata 1560
tgcataccat ggccgtgatg gcgcccggga cctgttctct cctgtgtagc ggcgccctcg 1620
ccctgacgca gacctgggcc ggggacatcc tgctcaccca gagcccggtg atcctgtcgg 1680
tcagccccgg cgagcgggtg agcttcagct gccgcgccag ccagtcgac gggacgaaca 1740
tccactggta ccagcagcgg accaacggca gcccccctct gctcatcaag tacgcgagcg 1800
agagcatcag cgggatcccc tgcggttca gcggcagcgg gagcggcacc gacttcaccc 1860
tgagcatcaa cagcgtggag tcggaggaca tcgcccacta ctactgccag cagaacaaca 1920
actggccgac gaccttcggc gccgggacca agctggagct caagcgcacc gtcgccgcgc 1980
ccagcgtgtt catcttcccg cccagcagcg agcagctgaa gagcggcagc gccagcgtgg 2040
tctgcctgct caacaacttc tacccccggg aggcgaaggt gcagtggaag gtggacaacg 2100
ccctgcagtc ggggaacagc caggagagcg tcaccgagca gacagcaag gacagacct 2160
acagcctgct gagcaccctc acgtgagca aggccgacta cgagaagcac aagggtgacg 2220
cgtgcgaggt gaccaccaag ggcctgagca gcccccgtac caagtcttc aaccgcggcg 2280
cctgaccact agt 2293

```

- 5 <210> 11
- <211> 1356
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Anticuerpo Trastuzumab (= Herceptin) - tipo silvestre, cadena pesada
- <400> 11

ES 2 614 901 T3

gaagtgcagc tgggtgaaaag cggcggcggc ctggtgcagc cgggcggcag cctgcgcctg 60
 agctgcgcgg cgagcgggctt taacattaaa gataacctata ttcattgggt gcgccaggcg 120
 ccgggcaaag gcctggaatg ggtggcgcgc atttatccga ccaacggcta taccgctat 180
 gcggatagcg tgaaggccg ctttaccatt agcgcggata ccagcaaaaa caccgctat 240
 ctgcagatga acagcctgcg cgcggaagat acccgggtgt attattgcag ccgctggggc 300
 ggcgatggct tttatgcgat ggattattgg ggccagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
 gcgagcacca aaggcccag cgtgtttccg ctggcggcga gcagcaaaag caccagcggc 420
 ggcaccgagg cgctgggctg cctggtgaaa gattattttc cggaaccggt gaccgtgagc 480
 tggaacagcg gcgcgctgac cagcggcgtg catacctttc cggcgggtgt gcagagcagc 540
 ggctgtata gcctgagcag cgtggtgacc gtgccgagca gcagcctggg caccagacc 600
 tatatttgca acgtgaacca taaaccgagc aacaccaaag tggataaaaa agtgaaccg 660
 ccgaaaagct gcgataaac ccatacctgc ccgccgtgcc cggcggcggga actgctgggc 720
 ggcccagcgc tgtttctgtt tccgccgaaa ccgaaagata ccctgatgat tagccgcacc 780
 ccggaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg agccatgaag atccggaagt gaaattaac 840
 tggtatgtgg atggcgtgga agtgcataac gcgaaaacca aaccgcgcga agaacagtat 900
 aacagcacct atcgcgtggt gagcgtgctg accgtgctgc atcaggattg gctgaaccggc 960
 aaagaatata aatgcaaagt gagcaacaaa gcgctgccgg cgccgattga aaaaaccatt 1020
 agcaaagcga aaggccagcc gcgcgaaccg cagggtgtata ccctgccgcc gagccgcgat 1080
 gaactgacca aaaaccaggt gagcctgacc tgcctggtga aaggctttta tccgagcgat 1140
 attgcggtgg aatgggaaaag caacggccag ccggaaaaaca actataaaac caccgcccg 1200
 gtgctggata gcgatggcag ctttttctg tatagcaaac tgaccgtgga taaaagccgc 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt tagctgcagc gtgatgatg aagcgtgca taaccattat 1320
 acccagaaaa gcctgagcct gagcccgggc aaataa 1356

- 5
- <210> 12
 - <211> 1356
 - <212> ADN
 - <213> Artificial

- 10
- <220>
 - <223> Anticuerpo Trastuzumab (= Herceptin) - Cadena pesada optimizada en relación con GC

<400> 12
 gaggtgcagc tggctgagag cggcgggggc ctgctgcagc cgggcgggtc gctgcggctg 60
 agctgcgcgg cgagcggggt caacatcaag gacacctaca tccactgggt gcgccaggcc 120
 cccggcaagg gcctcgagtg ggtcggccgg atctacccca cgaacgggta caccgctac 180
 gccgacagcg tgaaggccg gttcaccatc agcgcggaca cctcgaagaa cacggcctac 240

ES 2 614 901 T3

ctgcagatga acagcctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcag ccggtggggc 300
 ggcgacgggt tctacgcat ggactactgg gggcagggca ccctcgtcac cgtgagcagc 360
 gcgctgacga agggggcccag cgtgttcccg ctggcccccga gcagcaagag caccagcggc 420
 gggaccgccc ccctgggctg cctcgtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcg 480
 tggaacagcg gcgcgctgac gagcggggtc cacaccttcc cggccgtgct gcagagcagc 540
 ggctctact cgctgagcag cgtggtcacc gtgcccagca gcagcctggg gaccagacg 600
 tacatctgca acgtgaacca caagccctcg aacaccaagg tcgacaagaa ggtggagccc 660
 ccgaagagct gcgacaagac ccacacctgc ccgccctgcc ccgccccga gctcctgggc 720
 gggcccagcg tgttctgtt cccgcccag cccaaggaca cgctcatgat cagccgcacc 780
 cccgaggtca cctgctgggt ggtcgacgtg agccacgagg accccgaggt gaagttcaac 840
 tggtagctcg acggcgtgga ggtgcacaac gccaaagacca agccgcgga ggagcagtac 900
 aactcgacgt accgctcgt gagcgtgctg accgtcctgc accaggactg gctcaacggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt gagcaacaag gccctgcccg cggccatcga gaagaccatc 1020
 agcaaggcca aggggagcc ccgggagccg cagggtgaca ccctgcccc cagccgcgac 1080
 gagctcacga agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtga agggcttcta cccctcggac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caacgggag ccggagaaca actacaagac caccgccc 1200
 gtcctcgaca gcgacggcag cttcttctg tacagcaagc tgacggtgga caagtcgcg 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtcagcagc aggccctcca caaccactac 1320
 acccagaaga gcctgagcct gagccccggg aagtga 1356

5 <210> 13
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Anticuerpo Trastuzumab (= Herceptin) - tipo silvestre, cadena ligera

<400> 13
 gatattcaga tgaccagag cccgagcagc ctgagcgcga gcgtgggcga tcgctgacc 60
 attacctgcc gcgagagcca ggatgtgaac accgcggtgg cgtggtatca gcagaaaccg 120
 ggcaaagcgc cgaactgct gatttatagc gcgagcttcc tgtatagcgg cgtgccgagc 180
 cgcttttagc gcagccgag cggcaccgat ttaccctga ccattagcag cctgcagccg 240
 gaagattttg cgacctatta ttgccagcag cattatacca ccccgcgac ctttggccag 300
 ggacacaaag tggaaattaa acgcaccgtg gcggcgccga gcgtgtttat tttccgccc 360
 agcgatgaac agctgaaaag cggcaccgag agcgtggtgt gcctgctgaa caacttttat 420
 ccgcgcaag cgaaagtga gtggaaagtg gataacgcgc tcgagagcgg caacagccag 480
 gaaagcgtga ccgaacagga tagcaaagat agcacctata gcctgagcag caccctgacc 540
 ctgagcaaag cggattatga aaaacataaa gtgtatgctg gcgaagtgac ccatcagggc 600
 ctgagcagcc cggtagcaaa aagctttaac cgggcgcaat gctaa 645

15 <210> 14
 <211> 645
 <212> ADN

ES 2 614 901 T3

<213> Artificial

<220>

5 <223> Anticuerpo Trastuzumab (= Herceptin) - Cadena ligera optimizada en relación con GC

<400> 14

gacatccaga tgaccagag cccgtcgagc ctgagcgcca gcgtgggcca cggggtcacg 60

atcacctgcc gcgagagcca ggacgtgaac accgccgtgg cctggtacca gcagaagccc 120

gggaaggccc ccaagctcct gatctactcg gcgagcttcc tgtacagcgg cgtccccagc 180

cggttcagcg ggtcgcgcag cggcaccgac ttcacgctca ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag cactacacca cgccccccac cttcgggcag 300

ggcaccaagg tggagatcaa gcggaccgtg gccgccccca gcgtcttcat cttcccggcc 360

agcgacgagc agctgaagtc gggcacggcc agcgtggtgt gcctcctgaa caacttctac 420

ccccgcgagg cgaaggtcca gtggaagggt gacaacgccc tgagagcgg gaacagccag 480

gagagcgtga ccgagcagga ctcgaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtctacgctt gcgaggtgac ccaccagggg 600

ctctcgagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gctga 645

<210> 15

10 <211> 2295

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Anticuerpo Trastuzumab (= Herceptin) - construcción total con cadenas pesadas y ligeras optimizadas en relación con GC

<400> 15

aagcttacca tggccgtgat ggcgccgcgg accctggtcc tcctgctgag cggcgccctc 60

gccctgacgc agacctgggc cggggagggtg cagctggctg agagcggcgg gggcctcgtg 120

cagccgggcg ggtcgcctgc gctgagctgc gccgcgagcg ggttcaacat caaggacacc 180

tacatccact ggggtgcgcca ggccccggc aagggcctcg agtgggtcgc ccggatctac 240

cccacgaacg ggtacacccg ctacgccgac agcgtgaagg gccggttac catcagcgcg 300

gacacctcga agaacacggc ctacctgcag atgaacagcc tgcgcgccga ggacaccgcc 360

gtgtactact gcagccggtg gggcggcgac gggttctacg ccatggacta ctgggggcag 420

ggcaccctcg tcaccgtgag cagcgcgctc acgaagggc ccagcgtgtt cccgctggcc 480

cccagcagca agagcaccag cggcgggacc gccgccctgg gctgcctcgt caaggactac 540

ttccccgagc ccgtgaccgt gtcgtggaac agcggcgcgc tgacgagcgg ggtccacacc 600

ttccccggcg tgctgcagag cagcggcctc tactcgtgga gcagcgtggt caccgtgccc 660

agcagcagcc tggggaccca gacgtacatc tgcaacgtga accacaagcc ctcgaacacc 720

```

aaggtgaca agaagtgga gccccgaag agctegaca agaccacac ctgcccgcc 780
tgccccgcc ctagctctt gggcgggccc agcgtgtcc tgttcccgcc caagcccaag 840
gacacgctca tgatcagccg caccctcgag gtcacctgag tggtagtca cgtagccac 900
gaggaccgg aggtgaagt caactggtac gtcgacggcg tggaggtca caagcccaag 960
accaagcgc ggaagagca gtacaactcg acgtacggcg tctgagcgt gctgaccgtc 1020
ctgaccagag actggctca cggcaaggag tacaagtca aggtagcaa caagccctg 1080
cccgcgcca tcgagaagc catcagcaag gcccaagggc agccccgga gccgaggtg 1140
tacaccctgc cccccagcc gacagactc acgaagaacc aggtcagctt gacctgctg 1200
gtgaaggct tctaccctc ggaactgct gtagagtgag agagcaacgg gcagccgag 1260
aacaactaca agaccaccc gccctcttc gacagcagc gcagctctt cctgtacagc 1320
aagctgacg tgacaagtc gcggtgcaag caggcaacg tgttcagctg cagcgtcatg 1380
cagagggccc tcacaacca ctacaccag aagagctga gcctgagccc cgggaagcat 1440
catcatcacc atcattgacc agatctttct gacatttctg acatttctga catttctgac 1500
atctctgaca ttctgacat ttctgacatt tctgacattt ctgacatttc tgacatagc 1560
atacatggc cgtatggcg ccgagaccg tggctctct gctgagcgc gccctcgccc 1620
tgagcgagac ctggcgggg gacatccaga tgaccagag ccctgagagc ctgagcgcca 1680
gctggggcga cgggtcagc atcaactgccc gcgagacca ggaactgaa accgcccgg 1740
cctggtagca gcagaagccc ggaagggccc caaagctctt gatctactcg gcgagcttcc 1800
tgtacagcgg cgtcccagc cggttcagcg ggtcgcgca cggaccgac ttcagctca 1860
ccatcagcag cctgacggc gaggacttg cacctacta ctgacagcag cactacacca 1920
cgcccccaac cttcgggcag ggcaccaagg tggagatca gcggaccgtg gccgccccca 1980
gctcttcat cttcccgcc agcagcagc agctgaagt gggcagccc agcgtggtg 2040
gcctctgaa caactctac ccccgagag cgaaggtcca gtggaagtg gacaagccc 2100
tgagagcgg gaaccagcag gagagctga cggacagga ctggaagac agcaactaca 2160
gcctcagcag caccctgagc ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtctagcct 2220
gcgaggtgac ccaccaggg cctctgagc ccgtgacca gaagctcaac cggggcgagt 2280
gctgatgacc actag 2295

```

5 <210> 16
 <211> 13
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia: secuencia Kozak

<400> 16
gccgccacca ugg

13

15 <210> 17
 <211> 15
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia: secuencia de estabilización genérica

<220>

5 <221> variación
 <222> (1)..(1)
 <223> /sustituye = "citosina"
 /sustituye = "uracilo"

10 <220>

<221> variación
 <222> (5)..(5)
 <223> /sustituye = "citosina"
 /sustituye = "uracilo"
 /sustituye = "guanosina"
 /sustituye = "adenosina", o cualquier otro ácido nucleico

15 <220>

<221> repeat_unit
 <222> (5)..(5)
 <223> x = cualquier número

20 <220>

<221> variación
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituye = "uracilo"
 /sustituye = "adenosina"

25 <220>

<221> repeat_unit
 <222> (10)..(10)
 <223> x = cualquier número

30 <220>

<221> variación
 <222> (10)..(10)
 <223> /sustituye = "pirimidina"

35 <220>

<221> variación
 <222> (13)..(13)
 <223> /sustituye = "citosina"
 /sustituye = "uracilo"

40 <220>

45 <400> 17
nccancccn ucnc

50 <210> 18
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de localización para el retículo endoplasmático

55 <400> 18
Lys Asp Glu Leu
1

60 <210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

ES 2 614 901 T3

<223> secuencia de localización para el retículo endoplasmático
 <400> 19
Asp Asp Glu Leu
 5 **1**
 <210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de localización para el retículo endoplasmático
 15 <400> 20
Asp Glu Glu Leu
 1
 <210> 21
 20 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> secuencia de localización para el retículo endoplasmático
 <400> 21
Gln Glu Asp Leu
 1
 30 <210> 22
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> secuencia de localización para el retículo endoplasmático
 <400> 22
 40 <400> 22
Arg Asp Glu Leu
 1
 <210> 23
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de localización para el núcleo
 50 <400> 23
Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5
 55 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>

<223> secuencia de localización para el núcleo
 <400> 24

5 Pro Gln Lys Lys Ile Lys Ser
 1 5

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia de localización para el núcleo

15 <400> 25

Gln Pro Lys Lys Pro
 1 5

20 <210> 26
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> secuencia de localización para el núcleo

<400> 26

Arg Lys Lys Arg
 1

30 <210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> secuencia de localización para la región nuclear

<400> 27

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

<210> 28
 <211> 16
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia de localización para la región nuclear

50 <400> 28

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

55 <210> 29
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>

ES 2 614 901 T3

<223> secuencia de localización para la región nuclear

<400> 29

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

5 Pro Thr Pro

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de localización para el compartimento endosomal

15 <400> 30

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

<210> 31

20 <211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> secuencia de miristoilación, localizando el anticuerpo en la matriz mitocondrial

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 31

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

40 <210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática

<400> 32

50 Gly Cys Val Cys Ser Ser Asn Pro

1 5

<210> 33

<211> 8

55 <212> PRT

ES 2 614 901 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 5 <400> 33
 Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu
 1 5
 <210> 34
 10 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 <400> 34
 Gly Gln Glu Leu Ser Gln His Glu
 1 5
 20 <210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 <400> 35
 30 Gly Asn Ser Pro Ser Tyr Asn Pro
 1 5
 <210> 36
 <211> 8
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 40 <400> 36
 Gly Val Ser Gly Ser Lys Gly Gln
 1 5
 45 <210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 <400> 37
 Gly Gln Thr Ile Thr Thr Pro Leu
 1 5
 55 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 <400> 38
 5
 Gly Gln Thr Leu Thr Thr Pro Leu
 1 5
 <210> 39
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 15 <400> 39
 Gly Gln Ile Phe Ser Arg Ser Ala
 1 5
 20 <210> 40
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 <400> 40
 Gly Gln Ile His Gly Leu Ser Pro
 1 5
 30 <210> 41
 <211> 8
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 40 <400> 41
 Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser
 1 5
 45 <210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática
 <400> 42
 Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu
 1 5
 55 <210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60

<220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en el retículo endoplasmático
 <400> 43
 5
 Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn
 1 5
 <210> 44
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en el núcleo
 15 <400> 44
 Gly Ala Ala Leu Thr Ile Leu Val
 1 5
 20 <210> 45
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en el núcleo
 <400> 45
 Gly Ala Ala Leu Thr Leu Leu Gly
 1 5
 30 <210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en el núcleo, el retículo endoplasmático y el citoplasma
 40 <400> 46
 Gly Ala Gln Val Ser Ser Gln Lys
 1 5
 45 <210> 47
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en el núcleo, el retículo endoplasmático y el citoplasma
 <400> 47
 Gly Ala Gln Leu Ser Arg Asn Thr
 1 5
 55 <210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60

ES 2 614 901 T3

- <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en el aparato de Golgi, el núcleo, el citoplasma y el citoesqueleto
- 5 <400> 48
- Gly Asn Ala Ala Ala Ala Lys Lys
 1 5
- <210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
- <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en el citoplasma y el citoesqueleto
- 15 <400> 49
- Gly Asn Glu Ala Ser Tyr Pro Leu
 1 5
- 20 <210> 50
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 25 <220>
 <223> secuencia para la localización de anticuerpos en la membrana plasmática y el citoesqueleto
- 30 <400> 50
- Gly Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys
 1 5
- 35 <210> 51
 <211> 2269
 <212> ADN
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Secuencia alternativa de el constructo de la Figura 12 (anticuerpo rituximab), en la que los sitios de restricción han sido modificados en comparación con la SEQ ID N°: 5 de la Figura 12.
- 40 <400> 51

ES 2 614 901 T3

aagcttacca tggccgtgat ggcgccggy accctggtcc tccctgctgag cggcgcctc 60
 gccctgacgc agacctgggc cgggcaggcc tacctgcagc agagcggcgc ggagctcgtg 120
 cggccggggg cctcgttcaa gatgagctc aaggccagcg gctacacctt cagcagctac 180
 aacatgcact gggtagaaca gaccccgcg caggggctgg agtggatcgg cgccatctac 240
 cccgggaacg gcgacaccag ctacaaccag aagttcaagg gcaaggcgac cctgacggtg 300
 gacaagtcca gcagaccgc ctacatgcag ctacagcagc tgacctcga gacagcgcc 360
 gtctacttct gcgccgggt ggtgtactac agcaacagct actggtactt cgagctctgg 420
 gggaccggca cgacctgac cgtgagcggg cccagcgtct tccccctgg cccctcgac 480
 aagagacca gcggcggcac ggcggcctc gggtcctgg tgaaggacta ctccccgag 540
 cccgtgacgc tcagctggaa ctccggcgc ctgaccagcg ggtgcacac ctccccgccc 600
 gtgctccaga gcagcggcct gtacagcctg agctcggctg tgacggtgcc cagcagcagc 660
 ctccgggacc agacctacat ctgcaacgct aaccacaagc ccagcaaac caaggtggac 720
 aagaaggcgg agcccaagt gtgcgacaag acgcacacct gcccgccctg ccccgcccc 780
 gagctgctgg gcggcccgag cgtgttctc tccccccca agcccaagga caccctgatg 840
 atcagccgca cccccagggt cagctcgtg gtggtcagc tgagccacga gacccccgag 900
 gtgaagtcca actggtacgt gcagggggt gaggtgcaca acgccaagac caagccccg 960
 gaggagcagt acaacagcac ctaccgcgtc gtgagcgtgc tgaccgtcct ccaccaggac 1020
 tggctgaacg gcaaggagta caagtcaag gtgtcaaca aggcctctgc gggccccatc 1080
 gagaagcga tcagcaagg gaaggggag cccgggagc cccaggtgta caccctccg 1140
 cccagccgcy acgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgctctgt gaagggctt 1200
 tacccagcgc acatcgcctg ggaagggag tcgaacgggc agcccgaga caactacaag 1260
 acgacccgcy ccgtcctgga cagcagcgc agcttcttc tgcacagaa gctcaccgtg 1320
 gacaagagcc ggtggcagca ggcacaagct ttcagctgct cggatgca cgaggccctg 1380
 cacaaccact acaccagaa gagcctgagc ctacgcccc ggaagcatca tcatcatcat 1440
 cattgacct gcatttctga catttctgac atttctgaca ttctgacat ttctgacatt 1500
 tctgacattt ctgacattt tgacatttct gacatttctg acatagatct accatggccg 1560
 tgatggcgc gcggaccctg gtcctcctgc tgagcggcgc cctcgccctg acgacagcct 1620
 gggccgggca gatcgtgctg agccagtcgc cggccatcct cagcgcgagc cccggcgaga 1680
 aggtcaccat gacgtgccg gccagcagct cggtagccta catgcactgg taccagcaga 1740
 agcccgagg cagccccag ccgtgatct acgccccag caacctggcc tcgggcgtgc 1800
 ccgctgctt cagcgggagc ggcagcggga ccagctacag cctgaccatc tcgggggtcg 1860
 agcccgagg cagccccacc tactactgcc agcagtgga cttcaaccg cccaggtctg 1920
 gcgccggcac caagctcgag ctgaagcga ccgtggcgg cccagcgtg ttcattctcc 1980

cgcccagcga cgagcagctg aagagcggga ccgctcgggt cgtgtgcctc ctgaacaact 2040
 tctacccccg ggaggccaag gtgacgtgga aggtcgacaa cgcgctgag agcggcaaca 2100
 gccaggagag cgtgacggag caggacagca aggacagcac ctactcgtc agcagcacc 2160
 tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgag gtcacgcacc 2220
 aggggctcag ctcgccccgtg accaagagct tcaaccgctg accactagt 2269

ES 2 614 901 T3

<210> 52
 <211> 2293
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia alternativa de el constructo de la Figura 17 (anticuerpo cetuximab), en la que los sitios de restricción han sido modificados en comparación con la SEQ ID N°: 10 de la Figura 17.

10 <400> 52

```

aagcttacca tggccgtgat ggcgccgagg accctgggtcc tcctgctgag cggcgccctc      60
gccctgacgc agacctgggc cgggcaggtg cagctgaagc agagcggccc ggggctcgtc      120
cagccctcgc agagcctgag catcacctgc acggtgagcg gcttcagcct gaccaactac      180
gggggtgact ggggtccggca gtcgcccggc aaggggctcg agtggctggg cgtgatctgg      240
agcggcggga acaccgacta caacaccccc ttcacgagcc gcctgagcat caacaaggac      300
aacagcaagt cgcaggtggt cttcaagatg aacagcctcc agagcaacga caccgccatc      360
tactactgcg cgcgggcccct gacctactac gactacgagt tcgcctactg gggccagggg      420
accctgggtca cgggtgagcgc cgcgagcacc aagggcccga gcgtgttccc cctcgccccc      480
tcgagcaaga gcaccagcgg cgggaccgcc gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc      540
cccagagccgg tgacggtgag ctggaactcg ggggcccctca ccagcggcgt ccacaccttc      600
cccgcgggtgc tgcagagcag cgggctgtac agcctcagct cgggtgtcac cgtgccccagc      660
agcagcctgg gcacgcagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag      720
gtcgacaagc gcgtggagcc gaagtcgccc aagagctgcg acaagacca cacgtgcccg      780
ccctgccccg cccccgagct gctcggcggg cccagcgtgt tcctgttccc gcccagccc      840
aaggacacc tgatgatcag ccggaccccc gaggtcacct gcgtgggtgt cgacgtgagc      900
cacgaggacc cggaggtgaa gttcaactgg tacgtcgagc gcgtggaggt gcacaacgcc      960
aagacgaagc cccgcgagga gcagtacaac agcacctacc gggtcgtgtc ggtgctcacc     1020
gtcctgcacc aggactggct gaacgggaag gagtacaagt gcaaggtgag caacaaggcc     1080
ctccccgcgc ccatcgagaa gaccatcagc aaggccaagg gccagccgcg cgagccccag     1140
gtgtacacgc tgccccccag ccgggacgag ctgaccaaga accagggtcag cctcacctgc     1200
ctgggtgaagg ggttctacct gtcggacatc gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc     1260
gagaacaact acaagaccac gcccccggtc ctggacagcg acggcagctt cttcctctac     1320
agcaagctga ccgtggacaa gagccgctgg cagcagggga acgtgttctc gtgcagcgtc     1380
atgcacgagg ccctgcacaa cactacacc cagaagagcc tcagcctgag ccccggaag     1440
    
```

ES 2 614 901 T3

catcatcatc atcatcattg accatgcatt tctgacattt ctgacatttc tgacatttct 1500
gacatttctg acatttctga catttctgac atttctgaca tttctgacat ttctgacata 1560
gatctaccat ggccgtgatg ggcgccgga ccctggctct cctgctgagc ggcgccctcg 1620
ccctgacgca gacctgggccc ggggacatcc tgctcaccca gagcccggtg atcctgtcgg 1680
tcagccccgg cgagcgggtg agcttcagct gccgcgccag ccagtcgatc gggacgaaca 1740
tccactggta ccagcagcgg accaacggca gccccgcct gctcatcaag tacgcgagcg 1800
agagcatcag cgggatcccc tcgcggttca gcggcagcgg gagcggcacc gacttcaccc 1860
tgagcatcaa cagcgtggag tcggaggaca tcgccgacta ctactgccag cagaacaaca 1920
actggccgac gaccttcggc gccgggacca agctggagct caagcgcacc gtcgccgcgc 1980
ccagcgtgtt catcttcccg cccagcagc agcagctgaa gagcggcacg gccagcgtgg 2040
tctgctgct caacaacttc taccctcggg aggccaaagt gcagtggaag gtggacaacg 2100
ccctgcagtc ggggaacagc caggagagcg tcaccgagca ggacagcaag gacagcacct 2160
acagcctgtc gagcaccctc acgctgagca aggccgacta cgagaagcac aagggtgtacg 2220
cgtgcgaggt gaccaccag ggcctgagca gccccgtcac caagtcgttc aaccgcggcg 2280
cctgaccact agt 2293

- <210> 53
- <211> 2295
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Secuencia alternativa de el constructo de la Figura 22 (anticuerpo trastuzumab), en la que los sitios de restricción han sido modificados en comparación con la SEQ ID N°: 15 de la Figura 22.

<400> _53
aagcttacca tggccgtgat ggcgccgagg accctggctc tcctgctgag cggcgccctc 60
gccctgacgc agacctgggc cggggagggtg cagctggctg agagcggcgg gggcctcgtg 120
cagccgggcg ggtcgtcgtg gctgagctgc gccgcgagcg ggtcaacat caaggacacc 180
tacatccact ggggtgcgca ggcctccggc aagggcctcg agtgggtcgc ccggatctac 240
cccacgaacg ggtacacccg ctacgccgac agcgtgaagg gccggttcac catcagcgcg 300
gacacctcga agaacacggc ctacctgag atgaacagcc tgcgcgccga ggacaccgcc 360
gtgtactact gcagccggtg gggcggcagc gggttctacg ccatggacta ctgggggagc 420
ggcaccctcg tcaccgtgag cagcgcgtcg acgaagggc ccagcgtgtt cccgctggcc 480
cccagcagca agagcaccag cggcgggacc gccgccctgg gctgcctcgt caaggactac 540
ttccccgagc ccgtgaccgt gtcgtggaac agcggcgcgc tgacgagcgg ggtccacacc 600
ttcccgccg tgctgcagag cagcggcctc tactcgtgga gcagcgtggt caccgtgccc 660
agcagcagcc tggggaccca gacgtacatc tgcaactgga accacaagcc ctcgaacacc 720
aaggctcaca agaaggtgga gccccgaag agctgcgaca agaccacac ctgccccccc 780

ES 2 614 901 T3

tgccccgccc	ccgagctcct	gggcgggccc	agcgtgttcc	tgttcccgcc	caagcccaag	840
gacacgctca	tgatcagccg	cacccccgag	gtcacctgcg	tggtggtcga	cgtgagccac	900
gaggaccccc	aggtgaagtt	caactggtac	gtcgacggcg	tggaggtgca	caacgccaaag	960
accaagccgc	gggaggagca	gtacaactcg	acgtaccgcg	tcgtgagcgt	gctgaccgtc	1020
ctgcaccagg	actggctcaa	cggcaaggag	tacaagtgca	aggtgagcaa	caaggccctg	1080
cccgcgcca	tcgagaagac	catcagcaag	gccaaagggc	agccccggga	gccgcaggtg	1140
tacaccctgc	ccccagccg	cgacgagctc	acgaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	1200
gtgaagggct	tctaccctc	ggacatcgcc	gtggagtggg	agagcaacgg	gcagccggag	1260
aacaactaca	agaccacccc	gccccctctc	gacagcgacg	gcagcttctt	cctgtacagc	1320
aagctgacgg	tggacaagtc	gcggtggcag	cagggcaacg	tgttcagctg	cagcgtcatg	1380
cacgaggccc	tccacaacca	ctacaccag	aagagcctga	gcctgagccc	cgggaagcat	1440
catcatcatc	atcattgacc	atgcatttct	gacatttctg	acatttctga	catttctgac	1500
atctctgaca	tttctgacat	ttctgacatt	tctgacattt	ctgacatttc	tgacatagat	1560
ctaccatggc	cgtgatggcg	ccgcggaccc	tggtcctcct	gctgagcggc	gccctcgccc	1620
tgacgcagac	ctgggccggg	gacatccaga	tgacccagag	cccgtcgagc	ctgagcgcca	1680
gcgtgggcga	ccgggtcacg	atcacctgcc	gcgcgagcca	ggacgtgaac	accgccgtgg	1740
cctggtacca	gcagaagccc	gggaaggccc	ccaagctcct	gatctactcg	gcgagcttcc	1800
tgtacagcgg	cgtccccagc	cggttcagcg	ggtcgcgag	cggcaccgac	ttcacgctca	1860
ccatcagcag	cctgcagccg	gaggacttctg	ccacctacta	ctgccagcag	cactacacca	1920
cgccccccac	cttcgggcag	ggcaccaagg	tggagatcaa	gcggaccgtg	gccgccccca	1980
gcgtcttcat	cttcccgc	agcgacgagc	agctgaagtc	gggcacggcc	agcgtggtgt	2040
gcctcctgaa	caacttctac	ccccgcgagg	cgaaggctca	gtggaagggtg	gacaacgccc	2100
tgacagcgg	gaacagccag	gagagcgtga	ccgagcagga	ctcgaaggac	agcacctaca	2160
gcctcagcag	caccctgacg	ctgagcaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtctacgcct	2220
gcgaggtgac	ccaccagggg	ctctcgagcc	ccgtgaccaa	gagcttcaac	cggggcgagt	2280
gctgatgacc	actag					2295

Reivindicaciones

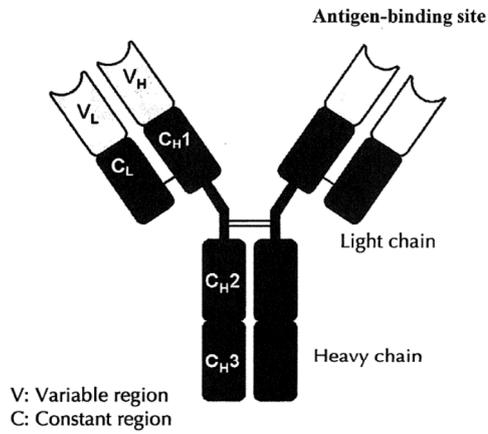
1. ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunes, donde
 - 5 – el ARNm es adecuado para la expresión intracelular de un anticuerpo, y
 - contiene al menos una región codificadora, codificando la o las regiones codificadoras al menos un anticuerpo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, teniendo ambas dominios variables y constantes.
- 10 2. ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo codificado se elige entre anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, intracuerpos y fragmentos de estos anticuerpos, eligiéndose los fragmentos de anticuerpo codificados entre fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ o Facb de estos anticuerpos.
- 15 3. ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo codificados reconocen específicamente y se unen a antígenos de superficie específicos de tumor (TSSA), antígenos tumorales o antígenos mutantes expresados en enfermedades cancerosas seleccionadas entre 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-actinina-4/m, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-catenina/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA 72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CAP-1, CASP-5/m, CASP-8, CASP-8/m, catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, proteína de tío coactosina, colágeno XXIII, COX-2, CT, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM, DAM-10/MAGE-B1, DAM-6/MAGEB2, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, EGFR/Her1, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, FN1/m, Fra-1, G250, G250/CAIX, GAGE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu/ErbB2, HERVK-MEL, HLA-A-0201-R170I, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, caja homeótica NKX 3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT/hTRT, iCE, IGF-1R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmadura, calicreína 2, calicreína 4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, KM-HN-1, K-Ras/m, LAGE, LAGE-1, LDLR/FUT, livina, MAGE, MAGE-A1, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGEA9, MAGE-B1, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-HL, MAGEL2, mamoglobina A, MART-1/Melan-A, MART-2, MART2/m, MART-2/Ski, proteína de matriz 22, MC1 R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP 11, antígeno MN/C IX, antígeno MN/CA IX, MRP-3, MUC1, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clase I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, Neo-PAP, neo-PAP/m, NFYC/m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-Eso-1, NY-Eso-B, OA1, OFAiLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteocalcina, osteopontina, p15, p190 menor bcr-abl, p53, p53/m, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PAP, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-quinasa, Pin1, Pml/RAR α , POTE, PRAME, PRDX5/m, prosteína, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE, 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, TEL-AML1, TGFbeta, TGFbRII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2, TRP-2/6b, TRP-2/INT2, Trp-p8, tirosinasa, UPA, VEGF, VEGFR-2/FLK-1 o WT1.
4. ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ARNm tiene un contenido de G/C en la región codificadora del ARNm con codificación de bases que es mayor que el contenido de G/C de la región codificadora de la secuencia de ARN nativa, permaneciendo la secuencia de aminoácidos codificada inalterada con respecto al tipo silvestre.
5. ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ARNm tiene una modificación de lípidos.

6. ARNm desnudo, opcionalmente complado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ARNm contiene, al menos en un nucleótido del ARNm, una modificación de nucleótido, representando los nucleótidos modificados análogos o derivados de purinas o pirimidinas seleccionados preferentemente entre 1-metiladenina, 2-metiladenina, 2-metil-⁶N6-isopenteniladenina, ⁶N6-metiladenina, ⁶N6-isopenteniladenina, 2-tiocitosina, 3-metilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-metilcitosina, 2,6-diaminopurina, 1-metilguanina, 2-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 7-metilguanina, inosina, 1-metilinosina, dihidrouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetil-aminometil-uracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metiluracilo, N-uracil-5-oxiacetato de metilo, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5'-metoxycarbonilmetil-uracilo, 5-metoxiuracilo, uracil-5-oxiacetato de metilo, ácido uracil-5-oxiacético (v), pseudouracilo, 1-metilpseudouracilo, queosina, beta-D-manosilqueosina, wybutoxosina, o porque los nucleótidos modificados representan modificaciones de la estructura principal, preferentemente seleccionadas entre fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos peptídicos, metilfosfonatos, boranofosfonatos y metilfosforamidatos, y/o porque el ARNm contiene, al menos en un nucleótido del ARNm, una modificación de bases de nucleótido, preferentemente seleccionada entre el grupo consistente en 2-amino-6-cloropurina ribósido 5'-trifosfato, 2-aminoadenosina 5'-trifosfato, 2-tiocitidina 5'-trifosfato, 2-tiouridina 5'-trifosfato, 4-tiouridina 5'-trifosfato, 5-aminoalilciticidina 5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina 5'-trifosfato, 5-bromocitidina 5'-trifosfato, 5-bromouridina 5'-trifosfato, 5-yodocitidina 5'-trifosfato, 5-yodouridina 5'-trifosfato, 5-metilciticidina 5'-trifosfato, 5-metiluridina 5'-trifosfato, 6-azacitidina 5'-trifosfato, 6-azauridina 5'-trifosfato, 6-cloropurina ribósido 5'-trifosfato, 7-desazaadenosina 5'-trifosfato, 7-desazaguanosina 5'-trifosfato, 8-azaadenosina 5'-trifosfato, 8-azidoadenosina 5'-trifosfato, benzimidazol ribósido 5'-trifosfato, N1-metiladenosina 5'-trifosfato, N1-metilguanina 5'-trifosfato, N6-metiladenosina 5'-trifosfato, O6-metilguanina 5'-trifosfato, pseudouridina 5'-trifosfato, puromicina 5'-trifosfato o xantosina 5'-trifosfato.
7. ARNm desnudo, opcionalmente complejo con un polímero (poli)catiónico, para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ARNm contiene al menos en un nucleótido una modificación de bases de nucleótido seleccionada entre 5-metilciticidina 5'-trifosfato o pseudouridina 5'-trifosfato.
8. ARNm desnudo, opcionalmente complejo con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, caracterizado porque el ARNm tiene adicionalmente una estructura de caperuza 5' seleccionada entre el grupo consistente en m7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G).
9. ARNm desnudo, opcionalmente complejo con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ARNm tiene adicionalmente una cola poli-A de 10 a 200 nucleótidos de adenosina y/o porque el ARN tiene adicionalmente una cola poli-C de 10 a 200 nucleótidos de citosina.
10. ARNm desnudo, opcionalmente complejo con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ARNm está complejo mediante protamina, poli-L-lisina, poli-L-arginina, nucleolina, espermina o histonas.
11. ARNm desnudo, opcionalmente complejo con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ARNm codifica un anticuerpo seleccionado entre el grupo consistente en Oregovomab (OvaRex), Cantuzumab, HuC242-DM4, PAM4 (IMMU-107), HuC242-DM4, HuHMF1 WX-G250 (Rencarex), MT103, Ibritumomab (Zevalin), Rituximab (Rituxan, MabThera), Tositumomab (Bexxar), Ofatumumab (HuMax-CD20), Epratuzumab (LymphoCide), MDX-060, SGN-30, Gemtuzumab (Mylotarg), Zanolimumab (HuMax-CD4), SGN-40, Alemtuzumab (MabCampath), HuN901-DM1, Galiximab, Labetuzumab, Ipilimumab (MDX-010), Cetuximab (Erbix), Panitumumab (Vectibix), Nimotuzumab (TheraCim), Matuzumab, Zalutumumab, Pertuzumab (Omnitarg), Catumaxomab (Removab), MORab-003, MORab-009, Ertumaxomab, Trastuzumab (Herceptin), AMG 102, Apolizumab (Remitogen), CNTO 95, ID09C3, Denosumab (AMG-102), GC1008, Mapatumumab, Bevacizumab (Avastin), MEDI 522, Volociximab, Eculizumab (Alexion), Mepolizumab, CaroRx (CaroRx), Efalizumab (Raptiva), Epratuzumab (LymphoCide), Lumiliximab, Daclizumab, Natalizumab (Tysabri), Omalizumab (Xolair), Mepolizumab, Tocilizumab (Actemra), Adalimumab (Humira), Infliximab (Remicade), Golimumab (CNTO 148), Mapatumumab, Rituximab (Rituxan, MabThera), Epratuzumab (LymphoCide), R1450, Ranibizumab (Lucentis), Bevacizumab (Avastin), Palivizumab (Synagis), Abciximab (ReoPro), Denosumab (AMG-102), GC1008, y Bevacizumab (Avastin).

12. ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ARNm codifica adicionalmente un péptido señal y/o una secuencia de localización, en particular una secuencia de secreción o una secuencia de localización seleccionada entre una de las secuencias de acuerdo con las SEQ ID N°: 18 a 50.
13. ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque
- el ARNm contiene una secuencia codificadora de anticuerpos que codifica la cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID N°: 2 y la cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID N°: 4, o
 - el ARNm contiene una secuencia codificadora de anticuerpos de acuerdo con la SEQ ID N°: 5, o
 - el ARNm contiene una secuencia codificadora de anticuerpos que codifica la cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID N°: 7 y la cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID N°: 9, o
 - el ARNm contiene una secuencia codificadora de anticuerpos de acuerdo con la SEQ ID N°: 10, o
 - el ARNm contiene una secuencia codificadora de anticuerpos que codifica la cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID N°: 12 y la cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID N°: 14, o
 - el ARNm contiene una secuencia codificadora de anticuerpos de acuerdo con la SEQ ID N°: 15, o
 - el ARNm contiene una secuencia codificadora de anticuerpos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 70% con la secuencia de acuerdo con las SEQ ID N°: 5, 10 o 15 a lo largo de toda la longitud de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con las SEQ ID N°: 5, 10 o 15.
14. ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las enfermedades cancerosas o tumorales se seleccionan entre el grupo consistente en melanomas, melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas de riñón, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores de próstata, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, metástasis de hígado, carcinomas de mama (= cáncer de mama), cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, diversos tumores inducidos por virus, carcinomas inducidos por el virus de los papilomas, carcinoma de cuello uterino (= cáncer de cuello uterino), adenocarcinomas, tumores inducidos por virus herpes, linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por EBV, tumores inducidos por la hepatitis B, carcinomas hepatocelulares, linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neurinoma del acústico, carcinomas de pulmón (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas de pulmón de células pequeñas, cáncer de garganta, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma del recto, astrocitoma, tumores cerebrales, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebrales, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer de testículo, carcinoma de tiroides, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneckberger, tumor de la pituitaria, micosis fungoides, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer de riñón, timoma, carcinoma del cuerpo uterino, cáncer de hueso, linfomas no Hodgkin, cáncer de uretra, síndrome de CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendroglioma, cáncer vulvar, cáncer intestinal, carcinoma esofágico (= cáncer esofágico), condiciones verrugosas, tumores del intestino delgado, craneofaringiomas, carcinoma de ovario, tumores de tejidos blandos (sarcomas), cáncer de ovario (= carcinoma de ovario), carcinoma de páncreas (= cáncer de páncreas), carcinoma endometrial, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumor palpebral y cáncer de próstata (= tumores de próstata), o porque las enfermedades infecciosas se seleccionan entre el grupo consistente en enfermedades infecciosas o enfermedades infecciosas virales seleccionadas entre gripe, malaria, SARS, fiebre amarilla, SIDA, borreliosis de Lyme, leishmaniasis, ántrax, meningitis, enfermedades infecciosas virales, condiloma acuminado, molusco contagioso, dengue, fiebre de los tres días, virus del Ébola, resfriados, meningoencefalitis de principio de verano (ESME), herpes, hepatitis, herpes simplex tipo I, herpes simplex tipo II, herpes zóster, gripe, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, virus de Marburg, sarampión, fiebre aftosa, mononucleosis, paperas, infección por virus Norwalk, fiebre glandular de Pfeiffer, viruela, polio (poliomielitis), pseudocrup, eritema infeccioso, rabia, verrugas, fiebre del Nilo occidental, varicela, citomegalovirus (CMV), enfermedades infecciosas bacterianas, enfermedades infecciosas bacterianas causadas por aborto (infeccioso, séptico), prostatitis (inflamación de la próstata), ántrax, apendicitis (inflamación del intestino ciego), borreliosis, botulismo, Campylobacter, Chlamydia trachomatis (inflamación de la uretra, conjuntiva), cólera, difteria, donovanosis, epiglotitis, tífus transmitido por piojos, fiebre tifoidea, gangrena gaseosa, gonorrea, peste de la liebre, Helicobacter pylori, tos ferina, bubón climático, osteomielitis, enfermedad del legionario, lepra, listeriosis, neumonía, meningitis, meningitis bacteriana, inflamación del oído medio, Mycoplasma hominis, sepsis neonatal (corioamnionitis), noma, fiebre paratifoidea, peste, síndrome de Reiter, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, fiebre paratifoidea por Salmonella, fiebre tifoidea por Salmonella, escarlatina, sífilis, tétanos, gonorrea, fiebre

- tsutsugamushi, tuberculosis, tifus, vaginitis (colpitis), chancro blando, enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoos u hongos, como disentería amebiana, bilharziosis, enfermedad de Chagas, Echinococcus, tenia de los peces, ictiotoxismo (ciguatera), tenia del zorro, micosis del pie, tenia del perro, candidiasis, pitiriasis, prurito (escabiosis), leishmaniasis cutánea, disentería por lamblia (giardiasis), piojos, oncocercosis (ceguera de los ríos), enfermedades fúngicas, tenia de la vaca, esquistosomiasis, enfermedad del sueño, tenia del cerdo, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad del sueño), leishmaniasis visceral, dermatitis del pañal o infecciones causadas por la tenia enana, o porque las enfermedades cardiovasculares se seleccionan entre el grupo consistente en cardiopatía isquémica, arteriosclerosis, apoplejía e hipertensión, o porque las enfermedades autoinmunes se seleccionan entre el grupo consistente en enfermedades autoinmunes de tipo I, enfermedades autoinmunes de tipo II, enfermedades autoinmunes de tipo III o enfermedades autoinmunes de tipo IV, por ejemplo esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide, diabetes, diabetes de tipo I (diabetes mellitus), lupus eritematoso sistémico (LES), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, formas autoinmunes de hepatitis crónica, colitis ulcerosa, enfermedades alérgicas de tipo I, enfermedades alérgicas de tipo II, enfermedades alérgicas de tipo III, enfermedades alérgicas de tipo IV, fibromialgia, alopecia, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, miastenia gravis, neurodermatitis, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (ESP), psoriasis, síndrome de Reiter, psoriasis o vasculitis.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 15.** Uso de un ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades cancerosas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunes.
- 16.** Uso de un ARNm desnudo, opcionalmente complejado con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la preparación de una composición farmacéutica según la reivindicación 15 para el tratamiento o la prevención de enfermedades cancerosas, seleccionándose las enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales entre el grupo consistente en melanomas, melanomas malignos, carcinomas de colon, linfomas, sarcomas, blastomas, carcinomas de riñón, tumores gastrointestinales, gliomas, tumores de próstata, cáncer de vejiga, tumores rectales, cáncer de estómago, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, metástasis de hígado, carcinomas de mama (= cáncer de mama), cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoide aguda (ALL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), hepatomas, diversos tumores inducidos por virus, carcinomas inducidos por el virus de los papilomas, carcinoma de cuello uterino (= cáncer de cuello uterino), adenocarcinomas, tumores inducidos por virus herpes, linfoma de Burkitt, linfoma de células B inducido por EBV, tumores inducidos por la hepatitis B, carcinomas hepatocelulares, linfomas inducidos por HTLV-1 y HTLV-2, neurinoma del acústico, carcinomas de pulmón (= cáncer de pulmón = carcinoma bronquial), carcinomas de pulmón de células pequeñas, cáncer de garganta, carcinoma anal, glioblastoma, carcinoma del recto, astrocitoma, tumores cerebrales, retinoblastoma, basalioma, metástasis cerebrales, meduloblastomas, cáncer vaginal, cáncer de testículo, carcinoma de tiroides, síndrome de Hodgkin, meningiomas, enfermedad de Schneeberger, tumor de la pituitaria, micosis fungoides, carcinoides, neurinoma, espinalioma, linfoma de Burkitt, cáncer de laringe, cáncer de riñón, timoma, carcinoma del cuerpo uterino, cáncer de hueso, linfomas no Hodgkin, cáncer de uretra, síndrome de CUP, tumores de cabeza/cuello, oligodendroglioma, cáncer vulvar, cáncer intestinal, carcinoma esofágico (= cáncer esofágico), condiciones verrugosas, tumores del intestino delgado, craneofaringiomas, carcinoma de ovario, tumores de tejidos blandos (sarcomas), cáncer de ovario (= carcinoma de ovario), carcinoma de páncreas (= cáncer de páncreas), carcinoma endometrial, cáncer de pene, cáncer de lengua, cáncer de vesícula biliar, leucemia, plasmocitoma, tumor palpebral y cáncer de próstata (= tumores de próstata); o enfermedades infecciosas, seleccionándose las enfermedades infecciosas entre el grupo consistente en enfermedades infecciosas o enfermedades infecciosas virales seleccionadas entre gripe, malaria, SARS, fiebre amarilla, SIDA, borreliosis de Lyme, leishmaniasis, ántrax, meningitis, enfermedades infecciosas virales, condiloma acuminado, molusco contagioso, dengue, fiebre de los tres días, virus del Ébola, resfriados, meningoencefalitis de principio de verano (ESME), herpes, hepatitis, herpes simplex tipo I, herpes simplex tipo II, herpes zóster, gripe, encefalitis japonesa, fiebre de Lassa, virus de Marburg, sarampión, fiebre aftosa, mononucleosis, paperas, infección por virus Norwalk, fiebre glandular de Pfeiffer, viruela, polio (poliomielitis), pseudocrup, eritema infeccioso, rabia, verrugas, fiebre del Nilo occidental, varicela, citomegalovirus (CMV), enfermedades infecciosas bacterianas, enfermedades infecciosas bacterianas causadas por aborto (infeccioso, séptico), prostatitis (inflamación de la próstata), ántrax, apendicitis (inflamación del intestino ciego), borreliosis, botulismo, Campylobacter, Chlamydia trachomatis (inflamación de la uretra, conjuntiva), cólera, difteria, donovanosis, epiglotitis, tifus transmitido por piojos, fiebre tifoidea, gangrena gaseosa,

- 5 gonorrea, peste de la liebre, Helicobacter pylori, tos ferina, bubón climático, osteomielitis, enfermedad del legionario, lepra, listeriosis, neumonía, meningitis, meningitis bacteriana, inflamación del oído medio, Mycoplasma hominis, sepsis neonatal (corioamnionitis), noma, fiebre paratifoidea, peste, síndrome de Reiter, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, fiebre paratifoidea por Salmonella,
- 10 fiebre tifoidea por Salmonella, escarlatina, sífilis, tétanos, gonorrea, fiebre tsutsugamushi, tuberculosis, tifus, vaginitis (colpitis), chancro blando, enfermedades infecciosas causadas por parásitos, protozoos u hongos, como disentería amebiana, bilharziosis, enfermedad de Chagas, Echinococcus, tenia de los peces, ictiotoxismo (ciguatera), tenia del zorro, micosis del pie, tenia del perro, candidiasis, pitiriasis, prurito (escabiosis), leishmaniasis cutánea, disentería por lamblia (giardiasis), piojos, oncocercosis (ceguera de los ríos), enfermedades fúngicas, tenia de la vaca, esquistosomiasis, enfermedad del sueño, tenia del cerdo, toxoplasmosis, tricomoniasis, tripanosomiasis (enfermedad del sueño), leishmaniasis visceral, dermatitis del pañal o infecciones causadas por la tenia enana; o enfermedades cardiovasculares, seleccionándose las enfermedades cardiovasculares entre el grupo consistente en
- 15 cardiopatía isquémica, arteriosclerosis, apoplejía e hipertensión; o enfermedades autoinmunes, seleccionándose las enfermedades autoinmunes entre el grupo consistente en enfermedades autoinmunes de tipo I, enfermedades autoinmunes de tipo II, enfermedades autoinmunes de tipo III o enfermedades autoinmunes de tipo IV, por ejemplo esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide, diabetes, diabetes de tipo I (diabetes mellitus), lupus eritematoso sistémico (LES), poliartritis crónica, enfermedad de Basedow, formas autoinmunes de hepatitis crónica, colitis ulcerosa, enfermedades
- 20 alérgicas de tipo I, enfermedades alérgicas de tipo II, enfermedades alérgicas de tipo III, enfermedades alérgicas de tipo IV, fibromialgia, alopecia, enfermedad de Bechterew, enfermedad de Crohn, miastenia gravis, neurodermatitis, polimialgia reumática, esclerosis sistémica progresiva (ESP), psoriasis, síndrome de Reiter, psoriasis o vasculitis.
- 25 **17.** Composición farmacéutica que comprende un ARNm desnudo, opcionalmente complejo con un polímero (poli)catiónico, poliplexos, proteína(s) o péptido(s), tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades cancerosas, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares o enfermedades autoinmunes.



Sitio de unión de antígeno

Cadena ligera

Fig. 1

Cadena pesada

V: Región variable

C: Región constante

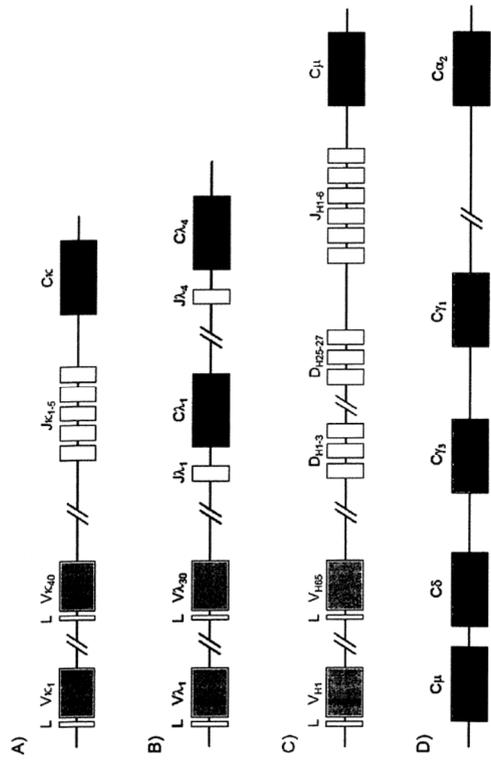


Fig. 2

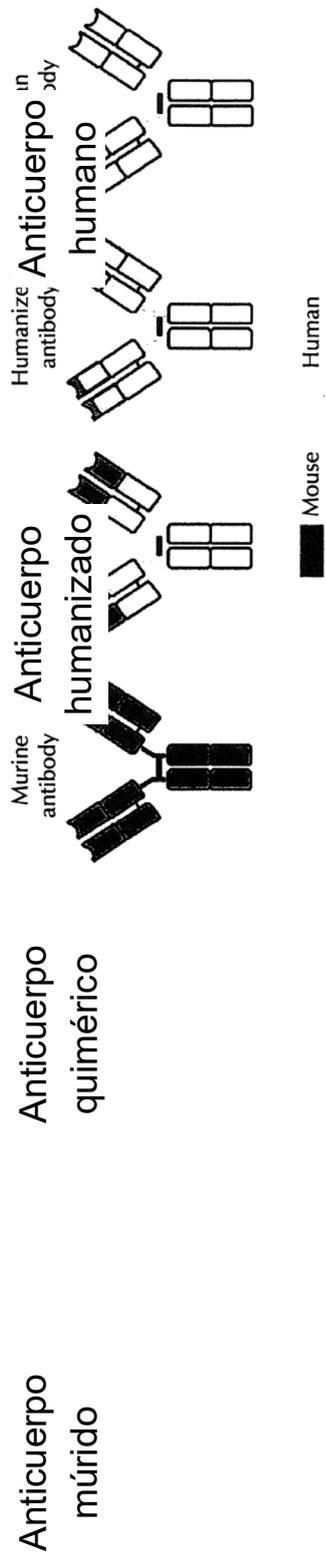


Fig. 3

Ratón Humano

Fragment	Structure
Fragmento	Estructura
F(ab') ₂	
Fab'	
Fab	
Fc	
Facb	
pFc'	
Fd	
Fv	

Fig. 4

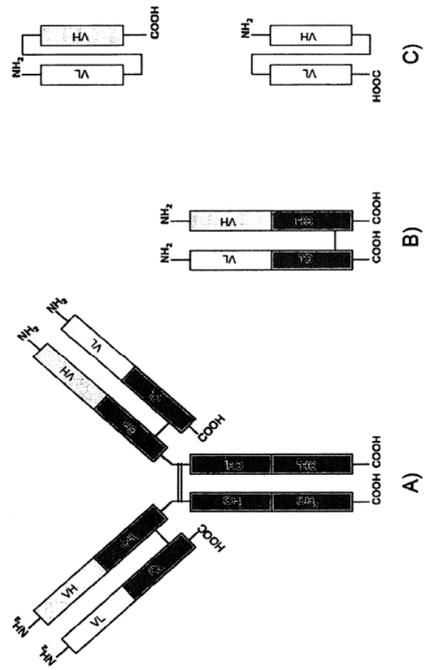


Fig. 5



Fig. 6

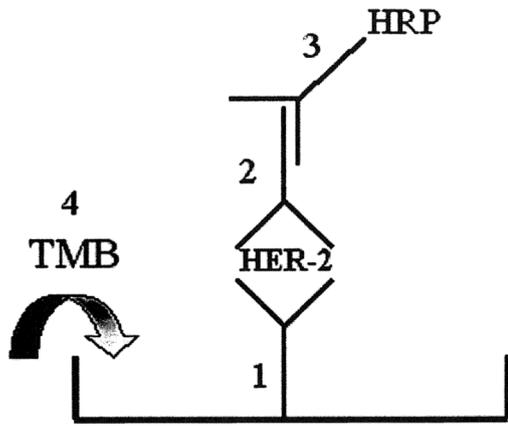


Fig. 7

CAG GCG TAT CTG CAG CAG AGC GGC GCG GAA CTG GTG CGC CCG
 GGC GCG AGC GTG AAA ATG AGC TGC AAA GCG AGC GGC TAT ACC
 TTT ACC AGC TAT AAC ATG CAT TGG GTG AAA CAG ACC CCG CGC
 CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGC GCG ATT TAT CCG GGC AAC GGC
 GAT ACC AGC TAT AAC CAG AAA TTT AAA GGC AAA GCG ACC CTG
 ACC GTG GAT AAA AGC AGC AGC ACC GCG TAT ATG CAG CTG AGC
 AGC GTG ACC AGC GAA GAT AGC GCG GTG TAT TTT TGC GCG CGC
 GTG GTG TAT TAT AGC AAC AGC TAT TGG TAT TTT GAT GTG TGG
 GGC ACC GGC ACC ACC GTG ACC GTG AGC GGC CCG AGC GTG TTT
 CCG CTG GCG CCG AGC AGC AAA AGC ACC AGC GGC GGC ACC GCG
 GCG CTG GGC TGC CTG GTG AAA GAT TAT TTT CCG GAA CCG GTG
 ACC GTG AGC TGG AAC AGC GGC GCG CTG ACC AGC GGC GTG CAT
 ACC TTT CCG GCG GTG CTG CAG AGC AGC GGC CTG TAT AGC CTG
 AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCG AGC AGC AGC CTG GGC ACC CAG
 ACC TAT ATT TGC AAC GTG AAC CAT AAA CCG AGC AAC ACC AAA
 GTG GAT AAA AAA GCG GAA CCG AAA AGC TGC GAT AAA ACC CAT
 ACC TGC CCG CCG TGC CCG GCG CCG GAA CTG CTG GGC GGC CCG
 AGC GTG TTT CTG TTT CCG CCG AAA CCG AAA GAT ACC CTG ATG
 ATT AGC CGC ACC CCG GAA GTG ACC TGC GTG GTG GTG GAT GTG
 AGC CAT GAA GAT CCG GAA GTG AAA TTT AAC TGG TAT GTG GAT
 GGC GTG GAA GTG CAT AAC GCG AAA ACC AAA CCG CGC GAA GAA
 CAG TAT AAC AGC ACC TAT CGC GTG GTG AGC GTG CTG ACC GTG
 CTG CAT CAG GAT TGG CTG AAC GGC AAA GAA TAT AAA TGC AAA
 GTG AGC AAC AAA GCG CTG CCG GCG CCG ATT GAA AAA ACC ATT
 AGC AAA GCG AAA GGC CAG CCG CGC GAA CCG CAG GTG TAT ACC
 CTG CCG CCG AGC CGC GAT GAA CTG ACC AAA AAC CAG GTG AGC
 CTG ACC TGC CTG GTG AAA GGC TTT TAT CCG AGC GAT ATT GCG
 GTG GAA TGG GAA AGC AAC GGC CAG CCG GAA AAC AAC TAT AAA
 ACC ACC CCG CCG GTG CTG GAT AGC GAT GGC AGC TTT TTT CTG
 TAT AGC AAA CTG ACC GTG GAT AAA AGC CGC TGG CAG CAG GGC
 AAC GTG TTT AGC TGC AGC GTG ATG CAT GAA GCG CTG CAT AAC
 CAT TAT ACC CAG AAA AGC CTG AGC CTG AGC CCG GGC AAA TAA

Fig. 8

CAG GCC TAC CTG CAG CAG AGC GGC GCG GAG CTC GTG CGG CCG
GGG GCC TCG GTC AAG ATG AGC TGC AAG GCC AGC GGC TAC ACC
TTC ACG AGC TAC AAC ATG CAC TGG GTG AAG CAG ACC CCG CGC
CAG GGG CTG GAG TGG ATC GGC GCC ATC TAC CCC GGG AAC GGC
GAC ACC AGC TAC AAC CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCG ACC CTG
ACG GTG GAC AAG TCG AGC AGC ACC GCC TAC ATG CAG CTC AGC
AGC CTG ACC TCG GAG GAC AGC GCC GTC TAC TTC TGC GCC CGG
GTG GTG TAC TAC AGC AAC AGC TAC TGG TAC TTC GAC GTC TGG
GGG ACC GGC ACG ACC GTG ACC GTG AGC GGG CCC AGC GTC TTC
CCC CTG GCC CCC TCG AGC AAG AGC ACC AGC GGC GGC ACG GCG
GCC CTC GGG TGC CTG GTG AAG GAC TAC TTC CCC GAG CCC GTG
ACC GTC AGC TGG AAC TCG GGC GCC CTG ACC AGC GGG GTG CAC
ACC TTC CCG GCC GTG CTC CAG AGC AGC GGC CTG TAC AGC CTG
AGC TCG GTC GTG ACG GTG CCC AGC AGC AGC CTC GGG ACC CAG
ACC TAC ATC TGC AAC GTC AAC CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG
GTG GAC AAG AAG GCG GAG CCC AAG TCG TGC GAC AAG ACG CAC
ACC TGC CCG CCC TGC CCC GCC CCC GAG CTG CTG GGC GGC CCG
AGC GTG TTC CTC TTC CCG CCC AAG CCC AAG GAC ACC CTG ATG
ATC AGC CGC ACC CCC GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTC GAC GTG
AGC CAC GAG GAC CCC GAG GTG AAG TTC AAC TGG TAC GTC GAC
GGG GTG GAG GTG CAC AAC GCC AAG ACC AAG CCC CGG GAG GAG
CAG TAC AAC AGC ACC TAC CGC GTC GTG AGC GTG CTG ACC GTC
CTC CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG
GTG TCG AAC AAG GCC CTG CCG GCC CCC ATC GAG AAG ACG ATC
AGC AAG GCG AAG GGG CAG CCC CGG GAG CCC CAG GTG TAC ACC
CTC CCG CCC AGC CGC GAC GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC
CTG ACC TGC CTC GTG AAG GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC
GTG GAG TGG GAG TCG AAC GGG CAG CCC GAG AAC AAC TAC AAG
ACG ACC CCG CCC GTC CTG GAC AGC GAC GGC AGC TTC TTC CTG
TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC CGG TGG CAG CAG GGC
AAC GTG TTC AGC TGC TCG GTC ATG CAC GAG GCC CTG CAC AAC
CAC TAC ACC CAG AAG AGC CTG AGC CTC AGC CCC GGG AAG TGA

Fig. 9

ES 2 614 901 T3

CAG ATT GTG CTG AGC CAG AGC CCG GCG ATT CTG AGC GCG AGC
CCG GGC GAA AAA GTG ACC ATG ACC TGC CGC GCG AGC AGC AGC
GTG AGC TAT ATG CAT TGG TAT CAG CAG AAA CCG GGC AGC AGC
CCG AAA CCG TGG ATT TAT GCG CCG AGC AAC CTG GCG AGC GGC
GTG CCG GCG CGC TTT AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACC AGC TAT
AGC CTG ACC ATT AGC CGC GTG GAA GCG GAA GAT GCG GCG ACC
TAT TAT TGC CAG CAG TGG AGC TTT AAC CCG CCG ACC TTT GGC
GCG GGC ACC AAA CTG GAA CTG AAA CGC ACC GTG GCG GCG CCG
AGC GTG TTT ATT TTT CCG CCG AGC GAT GAA CAG CTG AAA AGC
GGC ACC GCG AGC GTG GTG TGC CTG CTG AAC AAC TTT TAT CCG
CGC GAA GCG AAA GTG CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCG CTG CAG
AGC GGC AAC AGC CAG GAA AGC GTG ACC GAA CAG GAT AGC AAA
GAT AGC ACC TAT AGC CTG AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC AAA
GCG GAT TAT GAA AAA CAT AAA GTG TAT GCG TGC GAA GTG ACC
CAT CAG GGC CTG AGC AGC CCG GTG ACC AAA AGC TTT AAC CGC
TAA

Fig. 10

CAG ATC GTG CTG AGC CAG TCG CCG GCC ATC CTC AGC GCG AGC
CCC GGC GAG AAG GTC ACC ATG ACG TGC CGG GCC AGC AGC TCG
GTG AGC TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCC GGG AGC AGC
CCC AAG CCG TGG ATC TAC GCC CCC AGC AAC CTG GCC TCG GGC
GTG CCC GCG CGC TTC AGC GGG AGC GGC AGC GGG ACC AGC TAC
AGC CTG ACC ATC TCG CGG GTC GAG GCC GAG GAC GCC GCC ACC
TAC TAC TGC CAG CAG TGG AGC TTC AAC CCG CCC ACG TTC GGC
GCC GGC ACC AAG CTC GAG CTG AAG CGC ACC GTG GCG GCC CCC
AGC GTG TTC ATC TTC CCG CCC AGC GAC GAG CAG CTG AAG AGC
GGG ACC GCC TCG GTC GTG TGC CTC CTG AAC AAC TTC TAC CCC
CGG GAG GCC AAG GTG CAG TGG AAG GTC GAC AAC GCC CTG CAG
AGC GGC AAC AGC CAG GAG AGC GTG ACG GAG CAG GAC AGC AAG
GAC AGC ACC TAC TCG CTC AGC ACC CTG ACC CTG AGC AAG
GCC GAC TAC GAG AAG CAC AAG GTG TAC GCC TGC GAG GTC ACG
CAC CAG GGG CTC AGC TCG CCC GTG ACC AAG AGC TTC AAC CGC
TGA

Fig. 11

AAGCTTACCATGGCCGTGATGGCCCGCGGACCCTGGTCTCTGCTGAGCGGGCC
TCGCCCTGACGCAGACCTGGCCGGCCAGGCCTACCTGCAGCAGAGCGGCGGGAGCT
CGTGGCCCGGGGCTCGGTCAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACG
AGCTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGACCCCGCCAGGGGCTGGAGTGGATCGGG
CCATCTACCCCGGGAACGGCGACACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGCGAC
CCTGACGGTGGACAAGTCGAGCAGCACCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCG
GAGGACAGCGCCGTCTACTTCTGCGCCGGGTGGTGTACTACAGCAACAGCTACTGGT
ACTTCGACGCTCGGGGACCGGCACGCGTACCGTGAGCGGGCCAGCGCTCTCCC
CCTGGCCCCCTCGAGCAAGCAGCACCAGCGGGCCACGGCGGCCCTCGGGTGCCTGGTG
AAGGACTACTTCCCAGCCGTCGACCTCAGCTGGAACTCGGGCGCCCTGACCAGCG
GGGTGCACACCTTCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCTCGGT
CGTACGGTGCACAGCAGCCTCGGGACCCAGACTACATCTGCAACGTCAACCAC
AAGCCAGCAACACCAGTGGACAAGAGGGAGCCCAAGTCTGCGACAAGACGC
ACACCTGCCCGCCCTGCCCGCCCCGAGCTGTGGGGCGCCGAGCGTGTCTCTT
CCCGCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGACCCCGGAGGTACGTCGGTG
GTGTTCGACGTGAGCCACGAGGACCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGACGGGG
TGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCG
CGTCTGAGCGTGTGACCTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGATACAAG
TGCAAGGTTCGAACAAGCCCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACGATCAGCAAGCGCA
AGGGGACGCCCGGGAGCCCAAGGTGTACACCTCCCGCCAGCCGCGACGAGTGAC
CAAGAACAGTCAAGCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTCTACCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGTCGAACGGGACGCCGAGAACAACTACAGAGCAGCCCGCCGTC
TGGACAGCGCAGCGAGCTTCTCTGTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCGGTG
GCAGAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCGGTATGCACAGGSCCTGCACAACTAC
ACCCAGAGAGCCTGAGCCTCAGCCCCGGGAAGCATCATCATCATCATGAC
ATCTCTCGCAATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACAT
TTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATATGCATACCATGGCCGTGATGG
CGCCGGGACCCCTGGTCTCTGCTGAGCGGGCCCTCGCCCTGACGAGACCTGGGG
CGGGCAGATCGTGTGAGCCAGTCCCGGCCATCCTCAGCGCGAGCCCGCGGAGAAG
GTACCATGACGTGCCGGCCAGCAGCTCGGTGAGTACATGCATGTTACCAGCAGA
AGCCCGGAGCAGCCCAAGCCGTGGATCTACGCCCCAGCAACTGGCTCGGGCGT
GCCCGGGCCTTACGGGGAGCGGCAGCGGACCGAGCTACAGCCTGACCATCTCGGG
GTGAGGGCGAGGACCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGCTTCAACCCGCCCA
CGTTCCGGCCCGCACCAAGCTCGAGCTGAAGCGCACCGTGGCGCCCGCAGCGTGT
CATCTTCCCGCCAGCGACGAGCAGCTGAAGCGGGACCCCTCGGTCTGTGCCTC
CTGAACAATTCTACCCCGGGAGGCCAAGTGCAGTGGAAAGTGCACAACCGGCTGC
AGAGCGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACGGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACT
GCTCAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCC
TGCGAGTCAAGCACCAGGGGCTCAGCTCGCCCGTACCAAGAGCTTCAACCGT
CACTAGT

Fig. 12

CAG GTG CAG CTG AAA CAG AGC GGC CCG GGC CTG GTG CAG CCG
 AGC CAG AGC CTG AGC ATT ACC TGC ACC GTG AGC GGC TTT AGC
 CTG ACC AAC TAT GGC GTG CAT TGG GTG CGC CAG AGC CCG GGC
 AAA GGC CTG GAA TGG CTG GGC GTG ATT TGG AGC GGC GGC AAC
 ACC GAT TAT AAC ACC CCG TTT ACC AGC CGC CTG AGC ATT AAC
 AAA GAT AAC AGC AAA AGC CAG GTG TTT TTT AAA ATG AAC AGC
 CTG CAG AGC AAC GAT ACC GCG ATT TAT TAT TGC GCG CGC GCG
 CTG ACC TAT TAT GAT TAT GAA TTT GCG TAT TGG GGC CAG GGC
 ACC CTG GTG ACC GTG AGC GCG GCG AGC ACC AAA GGC CCG AGC
 GTG TTT CCG CTG GCG CCG AGC AGC AAA AGC ACC AGC GGC GGC
 ACC GCG GCG CTG GGC TGC CTG GTG AAA GAT TAT TTT CCG GAA
 CCG GTG ACC GTG AGC TGG AAC AGC GGC GCG CTG ACC AGC GGC
 GTG CAT ACC TTT CCG GCG GTG CTG CAG AGC AGC GGC CTG TAT
 AGC CTG AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCG AGC AGC AGC CTG GGC
 ACC CAG ACC TAT ATT TGC AAC GTG AAC CAT AAA CCG AGC AAC
 ACC AAA GTG GAT AAA CGC GTG GAA CCG AAA AGC CCG AAA AGC
 TGC GAT AAA ACC CAT ACC TGC CCG CCG TGC CCG GCG CCG GAA
 CTG CTG GGC GGC CCG AGC GTG TTT CTG TTT CCG CCG AAA CCG
 AAA GAT ACC CTG ATG ATT AGC CGC ACC CCG GAA GTG ACC TGC
 GTG GTG GTG GAT GTG AGC CAT GAA GAT CCG GAA GTG AAA TTT
 AAC TGG TAT GTG GAT GGC GTG GAA GTG CAT AAC GCG AAA ACC
 AAA CCG GCG GAA GAA CAG TAT AAC AGC ACC TAT CGC GTG GTG
 AGC GTG CTG ACC GTG CTG CAT CAG GAT TGG CTG AAC GGC AAA
 GAA TAT AAA TGC AAA GTG AGC AAC AAA GCG CTG CCG GCG CCG
 ATT GAA AAA ACC ATT AGC AAA GCG AAA GGC CAG CCG CGC GAA
 CCG CAG GTG TAT ACC CTG CCG CCG AGC CGC GAT GAA CTG ACC
 AAA AAC CAG GTG AGC CTG ACC TGC CTG GTG AAA GGC TTT TAT
 CCG AGC GAT ATT GCG GTG GAA TGG GAA AGC AAC GGC CAG CCG
 GAA AAC AAC TAT AAA ACC ACC CCG CCG GTG CTG GAT AGC GAT
 GGC AGC TTT TTT CTG TAT AGC AAA CTG ACC GTG GAT AAA AGC
 CGC TGG CAG CAG GGC AAC GTG TTT AGC TGC AGC GTG ATG CAT
 GAA GCG CTG CAT AAC CAT TAT ACC CAG AAA AGC CTG AGC CTG
 AGC CCG GGC AAA TAA

Fig. 13

ES 2 614 901 T3

CAG GTG CAG CTG AAG CAG AGC GGC CCG GGG CTC GTC CAG CCC
TCG CAG AGC CTG AGC ATC ACC TGC ACG GTG AGC GGC TTC AGC
CTG ACC AAC TAC GGG GTG CAC TGG GTC CGG CAG TCG CCC GGC
AAG GGG CTC GAG TGG CTG GGC GTG ATC TGG AGC GGC GGG AAC
ACC GAC TAC AAC ACC CCC TTC ACG AGC CGC CTG AGC ATC AAC
AAG GAC AAC AGC AAG TCC CAG GTG TTC TTC AAG ATG AAC AGC
CTC CAG AGC AAC GAC ACC GCC ATC TAC TAC TGC GCG CGG GCC
CTG ACC TAC TAC GAC TAC GAG TTC GCC TAC TGG GGC CAG GGG
ACC CTG GTC ACG GTG AGC GCC GCG AGC ACC AAG GGC CCG AGC
GTG TTC CCC CTC GCC CCC TCG AGC AAG AGC ACC AGC GGC GGG
ACC GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAG
CCG GTG ACG GTG AGC TGG AAC TCG GGG GCC CTC ACC AGC GGC
GTC CAC ACC TTC CCC GCG GTG CTG CAG AGC AGC GGG CTG TAC
AGC CTC AGC TCG GTG GTC ACC GTG CCC AGC AGC AGC CTG GGC
ACG CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAC CAC AAG CCC AGC AAC
ACC AAG GTC GAC AAG CGC GTG GAG CCG AAG TCG CCC AAG AGC
TGC GAC AAG ACC CAC ACG TGC CCG CCC TGC CCC GCC CCC GAG
CTG CTC GGC GGG CCC AGC GTG TTC CTG TTC CCG CCC AAG CCC
AAG GAC ACC CTG ATG ATC AGC CGG ACC CCC GAG GTC ACC TGC
GTG GTG GTC GAC GTG AGC CAC GAG GAC CCG GAG GTG AAG TTC
AAC TGG TAC GTC GAC GGC GTG GAG GTG CAC AAC GCC AAG ACG
AAG CCC CGC GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACC TAC CGG GTC GTG
TCG GTG CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGG AAG
GAG TAC AAG TGC AAG GTG AGC AAC AAG GCC CTC CCC GCG CCC
ATC GAG AAG ACC ATC AGC AAG GCC AAG GGC CAG CCG CGC GAG
CCC CAG GTG TAC ACG CTG CCC CCC AGC CGG GAC GAG CTG ACC
AAG AAC CAG GTC AGC CTC ACC TGC CTG GTG AAG GGG TTC TAC
CCG TCG GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAC GGC CAG CCC
GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCC CCG GTC CTG GAC AGC GAC
GGC AGC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTG ACC GTG GAC AAG AGC
CGC TGG CAG CAG GGG AAC GTG TTC TCG TGC AGC GTC ATG CAC
GAG GCC CTG CAC AAC CAC TAC ACC CAG AAG AGC CTC AGC CTG
AGC CCC GGC AAG TGA

Fig. 14

ES 2 614 901 T3

GAT ATT CTG CTG ACC CAG AGC CCG GTG ATT CTG AGC GTG AGC
CCG GGC GAA CGC GTG AGC TTT AGC TGC CGC GCG AGC CAG AGC
ATT GGC ACC AAC ATT CAT TGG TAT CAG CAG CGC ACC AAC GGC
AGC CCG CGC CTG CTG ATT AAA TAT GCG AGC GAA AGC ATT AGC
GGC ATT CCG AGC CGC TTT AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACC GAT
TTT ACC CTG AGC ATT AAC AGC GTG GAA AGC GAA GAT ATT GCG
GAT TAT TAT TGC CAG CAG AAC AAC AAC TGG CCG ACC ACC TTT
GGC GCG GGC ACC AAA CTG GAA CTG AAA CCG ACC GTG GCG GCG
CCG AGC GTG TTT ATT TTT CCG CCG AGC GAT GAA CAG CTG AAA
AGC GGC ACC GCG AGC GTG GTG TGC CTG CTG AAC AAC TTT TAT
CCG CGC GAA GCG AAA GTG CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCG CTG
CAG AGC GGC AAC AGC CAG GAA AGC GTG ACC GAA CAG GAT AGC
AAA GAT AGC ACC TAT AGC CTG AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC
AAA GCG GAT TAT GAA AAA CAT AAA GTG TAT GCG TGC GAA GTG
ACC CAT CAG GGC CTG AGC AGC CCG GTG ACC AAA AGC TTT AAC
CGC GGC GCG TAA

Fig. 15

GAC ATC CTG CTC ACC CAG AGC CCG GTG ATC CTG TCG GTC AGC
CCC GGC GAG CGG GTG AGC TTC AGC TGC CGC GCC AGC CAG TCG
ATC GGG ACG AAC ATC CAC TGG TAC CAG CAG CGG ACC AAC GGC
AGC CCC CGC CTG CTC ATC AAG TAC GCG AGC GAG AGC ATC AGC
GGG ATC CCC TCG CGG TTC AGC GGC AGC GGG AGC GGC ACC GAC
TTC ACC CTG AGC ATC AAC AGC GTG GAG TCG GAG GAC ATC GCC
GAC TAC TAC TGC CAG CAG AAC AAC AAC TGG CCG ACG ACC TTC
GGC GCC GGG ACC AAG CTG GAG CTC AAG CGC ACC GTC GCC GCG
CCC AGC GTG TTC ATC TTC CCG CCC AGC GAC GAG CAG CTG AAG
AGC GGC ACG GCC AGC GTG GTC TGC CTG CTC AAC AAC TTC TAC
CCC CGG GAG GCC AAG GTG CAG TGG AAG GTG GAC AAC GCC CTG
CAG TCG GGG AAC AGC CAG GAG AGC GTC ACC GAG CAG GAC AGC
AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTG TCG AGC ACC CTC ACG CTG AGC
AAG GCC GAC TAC GAG AAG CAC AAG GTG TAC GCG TGC GAG GTG
ACC CAC CAG GGC CTG AGC AGC CCC GTC ACC AAG TCG TTC AAC.
CGC GGC GCC TGA

Fig. 16

ES 2 614 901 T3

GAA GTG CAG CTG GTG GAA AGC GGC GGC GGC CTG GTG CAG CCG
GGC GGC AGC CTG CGC CTG AGC TGC GCG GCG AGC GGC TTT AAC
ATT AAA GAT ACC TAT ATT CAT TGG GTG CGC CAG GCG CCG GGC
AAA GGC CTG GAA TGG GTG GCG CGC ATT TAT CCG ACC AAC GGC
TAT ACC CGC TAT GCG GAT AGC GTG AAA GGC CGC TTT ACC ATT
AGC GCG GAT ACC AGC AAA AAC ACC GCG TAT CTG CAG ATG AAC
AGC CTG CGC GCG GAA GAT ACC GCG GTG TAT TAT TGC AGC CGC
TGG GGC GGC GAT GGC TTT TAT GCG ATG GAT TAT TGG GGC CAG
GGC ACC CTG GTG ACC GTG AGC AGC GCG AGC ACC AAA GGC CCG
AGC GTG TTT CCG CTG GCG CCG AGC AGC AAA AGC ACC AGC GGC
GGC ACC GCG GCG CTG GGC TGC CTG GTG AAA GAT TAT TTT CCG
GAA CCG GTG ACC GTG AGC TGG AAC AGC GGC GCG CTG ACC AGC
GGC GTG CAT ACC TTT CCG GCG GTG CTG CAG AGC AGC GGC CTG
TAT AGC CTG AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCG AGC AGC AGC CTG
GGC ACC CAG ACC TAT ATT TGC AAC GTG AAC CAT AAA CCG AGC
AAC ACC AAA GTG GAT AAA AAA GTG GAA CCG CCG AAA AGC TGC
GAT AAA ACC CAT ACC TGC CCG CCG TGC CCG GCG CCG GAA CTG
CTG GGC GGC CCG AGC GTG TTT CTG TTT CCG CCG AAA CCG AAA
GAT ACC CTG ATG ATT AGC CGC ACC CCG GAA GTG ACC TGC GTG
GTG GTG GAT GTG AGC CAT GAA GAT CCG GAA GTG AAA TTT AAC
TGG TAT GTG GAT GGC GTG GAA GTG CAT AAC GCG AAA ACC AAA
CCG CGC GAA GAA CAG TAT AAC AGC ACC TAT CGC GTG GTG AGC
GTG CTG ACC GTG CTG CAT CAG GAT TGG CTG AAC GGC AAA GAA
TAT AAA TGC AAA GTG AGC AAC AAA GCG CTG CCG GCG CCG ATT
GAA AAA ACC ATT AGC AAA GCG AAA GGC CAG CCG CGC GAA CCG
CAG GTG TAT ACC CTG CCG CCG AGC GCG GAT GAA CTG ACC AAA
AAC CAG GTG AGC CTG ACC TGC CTG GTG AAA GGC TTT TAT CCG
AGC GAT ATT GCG GTG GAA TGG GAA AGC AAC GGC CAG CCG GAA
AAC AAC TAT AAA ACC ACC CCG CCG GTG CTG GAT AGC GAT GGC
AGC TTT TTT CTG TAT AGC AAA CTG ACC GTG GAT AAA AGC CGC
TGG CAG CAG GGC AAC GTG TTT AGC TGC AGC GTG ATG CAT GAA
GGC CTG CAT AAC CAT TAT ACC CAG AAA AGC CTG AGC CTG AGC
CCG GGC AAA TAA

Fig. 18

GAG GTG CAG CTG GTC GAG AGC GGC GGG GGC CTC GTG CAG CCG
GGC GGG TCG CTG CGG CTG AGC TGC GCC GCG AGC GGG TTC AAC
ATC AAG GAC ACC TAC ATC CAC TGG GTG CGC CAG GCC CCC GGC
AAG GGC CTC GAG TGG GTC GCC CGG ATC TAC CCC ACG AAC GGG
TAC ACC CGC TAC GCC GAC AGC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC
AGC GCG GAC ACC TCG AAG AAC ACG GCC TAC CTG CAG ATG AAC
AGC CTG CGC GCC GAG GAC ACC GCC GTG TAC TAC TGC AGC CGG
TGG GGC GGC GAC GGG TTC TAC GCC ATG GAC TAC TGG GGG CAG
GGC ACC CTC GTC ACC GTG AGC AGC GCG TCG ACG AAG GGG CCC
AGC CTG TTC CCG CTG GCC CCC AGC AGC AAG AGC ACC AGC GGC
GGG ACC GCC GCC CTG GGC TGC CTC GTC AAG GAC TAC TTC CCC
GAG CCC GTG ACC GTG TCG TGG AAC AGC GGC GCG CTG ACG AGC
GGG GTC CAC ACC TTC CCG GCC GTG CTG CAG AGC AGC GGC CTC
TAC TCG CTG AGC AGC GTG GTC ACC GTG CCC AGC AGC AGC CTG
GGG ACC CAG ACG TAC ATC TGC AAC GTG AAC CAC AAG CCC TCG
AAC ACC AAG GTC GAC AAG AAG GTG GAG CCC CCG AAG AGC TGC
GAC AAG ACC CAC ACC TGC CCG CCC TGC CCC GCC CCC GAG CTC
CTG GGC GGG CCC AGC GTG TTC CTG TTC CCG CCC AAG CCC AAG
GAC ACG CTC ATG ATC AGC CGC ACC CCC GAG GTC ACC TGC GTG
GTG GTC GAC GTG AGC CAC GAG GAC CCC GAG GTG AAG TTC AAC
TGG TAC GTC GAC GGC GTG GAG GTG CAC AAC GCC AAG ACC AAG
CGG CGG GAG GAG CAG TAC AAC TCG ACG TAC CGC GTC GTG AGC
GTG CTG ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTC AAC GGC AAG GAG
TAC AAG TGC AAG GTG AGC AAC AAG GCC CTG CCC GCG CCC ATC
GAG AAG ACC ATC AGC AAG GCC AAG GGG CAG CCC CGG GAG CCG
CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCC AGC CGC GAC GAG CTC ACG AAG
AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTG AAG GGC TTC TAC CCC
TCG GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAC GGG CAG CCG GAG
AAC AAC TAC AAG ACC ACC CCG CCC GTC CTC GAC AGC GAC GGC
AGC TTC TTC CTG TAC AGC AAG CTG ACG GTG GAC AAG TCG CGG
TGG CAG CAG GGC AAC GTG TTC AGC TGC AGC GTC ATG CAC GAG
GCC CTC CAC AAC CAC TAC ACC CAG AAG AGC CTG AGC CTG AGC
CCC GGG AAG TGA

Fig. 19

GAT ATT CAG ATG ACC CAG AGC CCG AGC AGC CTG AGC GCG AGC
GTG GGC GAT CGC GTG ACC ATT ACC TGC CGC GCG AGC CAG GAT
GTG AAC ACC GCG GTG GCG TGG TAT CAG CAG AAA CCG GGC AAA
GCG CCG AAA CTG CTG ATT TAT AGC GCG AGC TTT CTG TAT AGC
GGC GTG CCG AGC CGC TTT AGC GGC AGC CGC AGC GGC ACC GAT
TTT ACC CTG ACC ATT AGC AGC CTG CAG CCG GAA GAT TTT GCG
ACC TAT TAT TGC CAG CAG CAT TAT ACC ACC CCG CCG ACC TTT
GGC CAG GGC ACC AAA GTG GAA ATT AAA CGC ACC GTG GCG GCG
CCG AGC GTG TTT ATT TTT CCG CCG AGC GAT GAA CAG CTG AAA
AGC GGC ACC GCG AGC GTG GTG TGC CTG CTG AAC AAC TTT TAT
CCG CCG GAA GCG AAA GTG CAG TGG AAA GTG GAT AAC GCG CTG
CAG AGC GGC AAC AGC CAG GAA AGC GTG ACC GAA CAG GAT AGC
AAA GAT AGC ACC TAT AGC CTG AGC AGC ACC CTG ACC CTG AGC
AAA GCG GAT TAT GAA AAA CAT AAA GTG TAT GCG TGC GAA GTG
ACC CAT CAG GGC CTG AGC AGC CCG GTG ACC AAA AGC TTT AAC
CGC GGC GAA TGC TAA

Fig. 20

GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCG TCG AGC CTG AGC GCC AGC
GTG GGC GAC CGG GTC ACG ATC ACC TGC CGC GCG AGC CAG GAC
GTG AAC ACC GCC GTG GCC TGG TAC CAG CAG AAG CCC GGG AAG
GCC CCC AAG CTC CTG ATC TAC TCG GCG AGC TTC CTG TAC AGC
GGC GTC CCC AGC CGG TTC AGC GGG TCG CGC AGC GGC ACC GAC
TTC ACG CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCG GAG GAC TTC GCC
ACC TAC TAC TGC CAG CAG CAC TAC ACC ACG CCC CCC ACC TTC
GGG CAG GGC ACC AAG GTG GAG ATC AAG CGG ACC GTG GCC GCC
CCC AGC GTC TTC ATC TTC CCG CCC AGC GAC GAG CAG CTG AAG
TCG GGC ACG GCC AGC GTG GTG TGC CTC CTG AAC AAC TTC TAC
CCC CGC GAG GCG AAG GTC CAG TGG AAG GTG GAC AAC GCC CTG
CAG AGC GGG AAC AGC CAG GAG AGC GTG ACC GAG CAG GAC TCG
AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC
AAG GCC GAC TAC GAG AAG CAC AAG GTC TAC GCC TGC GAG GTG
ACC CAC CAG GGG CTC TCG AGC CCC GTG ACC AAG AGC TTC AAC
CGG GGC GAG TGC TGA

Fig. 21

AAGCTTACCATGGGCCGTGATGGCGCCGGACCCCTGGTCCCTGCTGAGCGGGCCCC
TCGCCCTGACGCAGACTGGGCCGGGAGGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGGGGCCCT
CGTGACGCGGGGGTCCGCTGCGGGTGCAGTGCGCCGGGACGGGTCAACATCAAG
GACACCTACATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGCAAGGGCCTCGAGTGGGTGCGCC
GGATCTACCCACGAACGGGTACACCCGCTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCAC
CATCAGCGCGGACACCTCGAAGAACCGGCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCC
GAGGACACCGCGGTGTAATACTGACGCCGTGGGGCGGGACGGGTTCACGCCATGG
ACTACTGGGGGAGGGCACCTCGTCACCGTGAGCAGCGCTCGACGAAGGGGGCCAG
CGTGTCCCGCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACAGCGGGGACCGGCCCTGGGC
TGCCCTCGTCAAGGACTACTCCCGAGCCCGTACCGTGTCTGGAACAGCGCGCGC
TGACGAGCGGGTCCACACCTTCCCGGCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCCTACTCGCT
GAGCAGCGTGGTCAACGTCGCCAGCAGCGCTGGGACCCAGAGCTACATCTGCAAC
GTGAACCAAGCCCTCGAACCAAGGTGCACAAGAAGTGGAGCCCCGAAGAGT
CGGACAAGACCACACCTGCCCGCCCTGCCCGCCCCGAGCTCCTGGGGGGCCCCAG
CGTGTTCCTGTCCCGCCAAGGCCAAGGACACGCTCATGATCAGCGCCACCCCCGAG
GTCAACCTGCGTGGTGGTGCAGCTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTCAACTGGT
ACGTCACGGGTGGAGGTGCACAACGGCAAGCAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAA
CTCGAGTACCGCTCGTGAGCGTGTGACCGTCTGCACAGGACTGGCTCAACGGC
AAGGACTACAAGTGAAGTGAGCAACAGGCCCTGCCCGGCCCATCGAGAAGACCA
TCAGCAAGGCCAAGGGGACGCCCGGGACCGCAGGTGTACACCTGCCCGCCAGCCG
CGACGAGCTCACGAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCTGGTGAAGGGCTCTACCCC
TCGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGCAACGGGCAGCGGAGAACAATAAGACCA
CCCCGCCGCTCTCGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACGGTGA
CAAGTCCCGTGGCAGCGGGCAACGTGTTGACGCTGCAGCCTCATGCACGAGGCCCTC
CACAACTACTACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCGGGAAGCATCATCATATC
ATCATGACCAGATCTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGA
CATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGAC
ATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGAC
ATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGAC
ATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGAC
TGCCCTGATGGCCCCGGCCCTGGTCCCTGCTGAGCGGGCCCTCGCCCTGAC
GCAGACTGGGCCGGGACATCCAGATGACCAGAGCCCGTGCAGCCTGAGCGCCAGC
GTGGCGACCGGGTACGATACCTGCCGCCGAGCCAGGACGTGAACACCGCCGCTG
CCTGGTACCAGAGAAGCCGGGAAGGCCCCCAAGCTCCTGATCTACTCGCGAGCTT
CCTGTACAGCGCGCTCCCGAGCCGGTTCAGCGGGTCCGCGAGCGGCACCGACTCAGC
CTCACCATCAGCAGCCTGCAGCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCACT
ACACCACGCCCCCACTTCGGGGAGGGCACCAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGC
CGCCCCAGCGCTTCTATCTCCCGCCAGCAGCAGCAGTGAAGTCGGGCACGGCC
AGCGTGGTGTCTCTGAACAACCTTACCCCCGAGGGCAAGGTCCAGTGGAAAGG
TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGGAACAGCCAGGAGAGCGTACCGCAGCAGGACTCGAA
GGACAGCCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG
CACAAGTCTACGCTGCGAGGTGACCCACCGAGGGCTCTCGAGCCCGTGAACAAG
GCTTCAACCGGGGGAGTGTGATGACCACTAG

Fig. 22

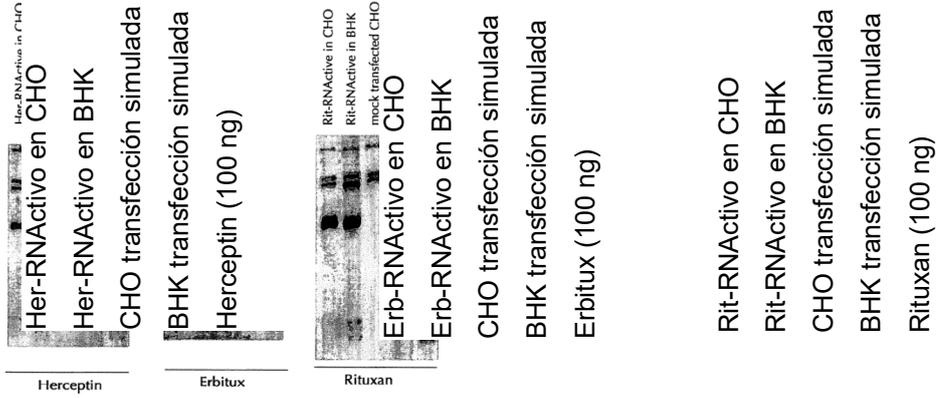


Fig. 23

Cadenas pesadas

Cadenas ligeras

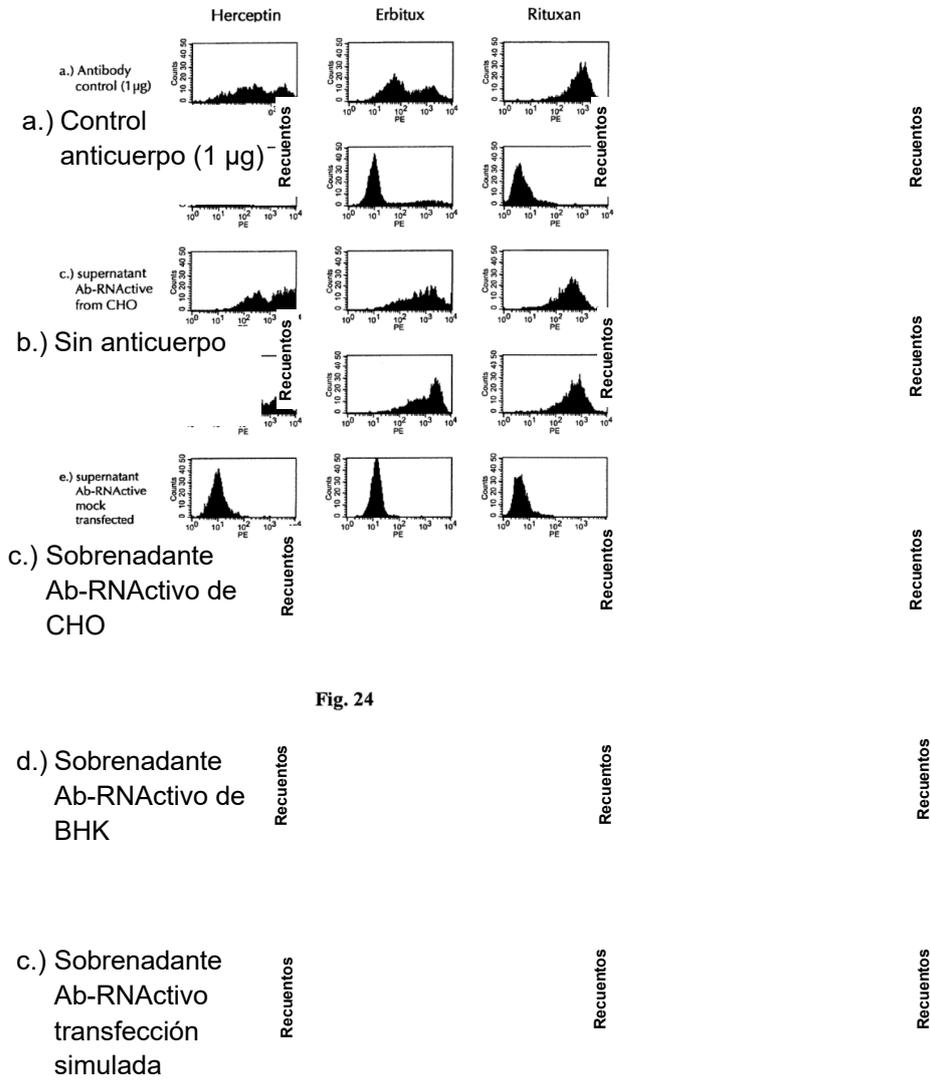


Fig. 24

AAGCTTACCATGGCCGTGATGGCGCCGGACCCCTGGTCTCCTGCTGAGCGCGCCC
TCGCCCTGACGCAGACCTGGGGCCGGCAGGCCCTACCTGCAGCAGAGCGGCCGGAGCT
CGTGGCCGGGGGCCCTCGGTCAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACG
AGCTACAACATGCACTGGTGAAGCAGACCCCGCGCCAGGGGCTGGAGTGGATCGGGC
CCATCTACCCGGGAACGGCGACACCAGCTACAACCAGAAGTCAAGGGCAAGCGGAC
CCTGACCGTGGACAAGTGCAGCAGCACCGCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCG
GAGGACAGCGCCCTACTTCTGCGCCGGGTGGTACTACAGCAACAGTACTGGT
ACTTCGACGTCTGGGGACCGGCACGCCGTGACCGTGAGCGGGCCAGCGTCTTCCC
CCTGGCCCCCTCGAGCAAGAGCACAGCGCGGCACGGCGGCCCTCGGTGCCTGGTG
AAGGACTACTTCCCGAGCCGTGACCGTCACTGGGACTCGGGCCCTGACAGCG
GGTGCACACTTCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGCCCTGTACAGCTGAGCTCGGT
CGTGACGCTGCCAGCAGCCTCGGGACCCAGCTACATCTGCAACGTCAACCAC
AAGCCAGCAACCAAGTGGACAAGAAGCGGGACCCAGTCTGTGCGACAAGACGC
ACACTGCCCCGCTGCCCGCCCCGAGCTGCTGGGGGCCGAGCGTGTCTCTT
CCCGCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGACCCCGAGGTCACGTGCGTG
TGGTCGACGTGAGCCACGAGGACCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTCGACGGGG
TGGAGGTGCACAACGCCAAGCAAGCCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCG
CGTGTGAGCGTGTGACCGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGTGTGCAACAAGCCCTCGCGGCCCATCGAGAAGCAGTACGCAAGGGCA
AGGGGAGCCCCGGGAGCCCGAGGTGTACACCTCCCGCCAGCGCGCAGGAGTGAC
CAAGAACAGGTGAGCTGACCTGCTCGTGAAGGGCTTACCCCGAGCAGATCGCC
GTGGAGTGGAGTGAACGGGCAGCCGAGAACAACACAGAGCAGCCCGCCCTCC
TGGACAGCGCAGCGAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCCGGT
GCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCTCGGTATGCAGCAGGSCCTGCACAACCCTAC
ACCCAGAAGAGCCTGAGCCTCAGCCCCGGGAAGCATCATCATCATCATCATGACCAT
GCATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACAT
TTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTGACATTTCTG
CGCCCGGACCCCTGGTCCCTCCTGCTGAGCGGCCCTCGCCCTGACGAGACCTGGGG
CGGCAGATCGTGTGAGCCAGTCCCGGCCATCCTCAGCGCAGCCCGGCGGAGAAG
GTCACTGAGCTGCGGGCCAGCAGCTCGGTGAGCTACATGCACTGGTACAGCAGA
AGCCCGGAGCAGCCCAAGCCGTGGATCTACGCCCCAGCAACCTGGCCCTCGGGCT
GCCCGCGCTTACGCGGAGCGGACCGGACAGCTACAGCCTGACCATCTCGCGG
GTGAGGCGGAGGACCGCCCACTACTACTGCCAGCAGTGGAGCTTCAACCCGCCCA
CGTTCGGCGCCGGCACCAAGCTCGAGCTGAAGCGCACCGTGGCGGCCCCAGCGTGT
CATCTTCCCGCCAGCGAGCAGCTGAAGCGGGACCGCTCGGTCTGTGCTC
CTGAACAATTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGACGTGGAAGTGCACAACCGCTGC
AGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACGGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACT
GCTCAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAAGGTGTACGCC
TGCGAGTACGCACACGGGGCTCAGCTCGCCGTCAGCAAGAGCTTCAACCGTAC
CACTAGT

Fig. 25

AGCTTACCATGGCCGTGATGGCGCCGGACCCTGGTCCTCTGCTGAGCGGCGCC
 TCGCCCTGACCGAGACCTGGCCGGCAGGTGCAGCTGAAGCAGAGCGCCCGGGCT
 CGTCCAGCCCTCGCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACGGTGAAGCGCTTCAGCCTGACC
 AACTACGGGGTGCACCTGGGTCCGGCAGTCCGCCGCAAGGGGCTCGAGTGGTGGGG
 TGATCTGGAGCGCGGGAACCCGACTACAACACCCCTTACGAGCCGCTGAGCAT
 CAACAAGGACAACAGCAAGTGCAGGTGTTCTTCAAGATGAACAGCCTCCAGAGCAAC
 GACCCCGCATCTACTACTGCGCGCGGGCCCTGACCTACTACGACTACGAGTTCGCCT
 ACTGGGGCCAGGGACCTGGTACAGGTGAGCGCCGAGACCAAGGGCCGAGCGT
 GTTCCCTCCGCCCTCGAGCAAGAGCACAGCGCGGGACCCGCCCTGGGTGC
 CTGGTCAAGGACTACTTCCCGAGCCGGTACGGTGAAGTGGAACTCGGGGCCCTCA
 CCAGCGCGCTCCACCTTCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGGGCTGTACAGCCTCAG
 CTGGTGGTACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACGAGACCTACATCTGCAACGTG
 AACCAAGCCAGCAACCAAGGTGCAGAAAGCGGTGGAGCCGAAGTCCGCCAAGA
 GCTGGCAAGACCCACAGCTGCCGCCCTGCCCGCCCGGAGTGTCTGGGGGGCC
 CAGGTGTCTCTGTTCCGCCAAGCCAAAGGACACCTGATGATCAGCCGGACCCCG
 GAGGTCACTGCTGGTGGTGCAGCTGAGCCACGAGGACCCGGAGTGAAGTCAACT
 GGTAGTGCAGCGCTCGAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCCGGAGGACGTA
 CAACAGCACCTACCGGGTCTGTGGTGTCAACCTCTGCACAGGACTGGTGAAC
 GGGAAGGAGTACAAGTGAAGTGAAGTGAACAAGGCCCTCCCGCGCCATCGAGAAGA
 CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCGCAGGCCAGCCAGGTGTACAGCTGCCCCAG
 CCGGACAGAGTGCACCAAGAACAGGTACGCTCACCTGCCTGGTGAAGGGTCTTAC
 CCGTGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGACAACGGCCAGCCGAGAAACACTACAAGA
 CCACGCCCGGCTCTGGACAGCGCGGACGCTTCTCTCTACAGCAAGCTGACCGT
 GGCAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGAACTGTCTGTCAGCGTCAAGCAGAGGCC
 CTGCACAACCACTACACCCAGAAGGCTCAGCCTGAGCCCGGCAAGCATCATC
 ATCATCTGACATGCAATTCGACATTCGACATTCGACATTCGACATTC
TGACATTCGACATTCGACATTCGACATTCGACATTCGACATTCGACATTC
CCATGCCGTGATGGCGCCGGACCCCTGGTCTCTCTGCTGAGCGGCGCCCTCGCCCT
 GACGACACCTGGCCGGGGACATCCTGCTCACCCAGAGCCCGGTGATCCTGTGGTC
 AGCCCCGGCGAGCGGGTGAAGTTCAGCTGCCCGCCAGCCACTCGATCGGGACGAACA
 TCCACTGGTACAGCAGCGGACCAACGGCAGCCCGCCCTGCTCATCAAGTACGCGAG
 CGAGAGCTCAGCGGATCCCTCGCGGTTCAGCGGACGCGGAGCGGCACCGACTTC
 ACCCTGACATCAACAGCGTGGAGTCGGAGGACATCGCCGACTACTACTGCCAGCAGA
 ACAACAACTGGCCGACGACCTTCGGCGCCGGGACCAAGTGGAGTCAAGCGCACCTG
 CGCCCGCCAGCGTGTTCATCTTCCCGCCAGCGACGAGCAGTGAAGAGCGGCAG
 GCCAGCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTACCCCGGGAGCCAAAGTGCAGTGA
 AGTGGACAACGCCCTGCAGTGGGGAACAGCCAGGAGAGCGTCAACGAGCAGGACAG
 CAAGGACAGCACCTACAGCCTGTGCAGACCCCTCAGCTGAGCAAGGCCGACTACAG
 AAGCACAAAGTGTACCGGTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGAGCAGCCCGTACCA
 AGTCGTTCAACCGCGCGCTGACCACTAGT

Fig. 26

