CONSTRUCCIONES DE VECTORES PARA LA DISTRIBUCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS ANTI-IGF-1R Y MÉTODOS PARA USARLOS

REFERENCIA CRUZADA DE LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reclama el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 63/297,787, presentada el 9 de enero de 2022, y de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 63/374,878, presentada el 7 de septiembre de 2022, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS ENVIADO ELECTRÓNICAMENTE

El contenido del listado de secuencias enviado electrónicamente (Nombre: 4525_074PC02_Seqlisting_ST26.xml; Tamaño: 214,621 bitios; y Fecha de creación: 9 de enero de 2023), presentada con la solicitud, se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al campo médico, incluyendo terapia génica AAV.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las enfermedades autoinmunitarias son la tercera patología humana más frecuente después del cáncer y las enfermedades cardiovasculares. La etiología de las enfermedades autoinmunitarias es multifactorial, con

desencadenantes genéticos y ambientales que surgen de un trasfondo de defectos críticos en la regulación inmunitaria. Las enfermedades autoinmunitarias más frecuentes en Occidente son la enfermedad de Graves y la tiroiditis de Hashimoto. En la enfermedad de Graves, el hipertiroidismo se debe a la activación de la glándula tiroides por anticuerpos agonistas del receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR, por sus siglas en inglés). Los fibroblastos orbitarios también expresan el TSHR, y la unión de los anticuerpos TSHR a los fibroblastos orbitarios conduce a la producción de hialuronano y a la diferenciación a adipocitos y miofibroblastos (Eckstein *et al*. Endocrine 68: 265-70, 2020). La consecuencia es un aumento de la grasa orbital y fibrosis del tejido conectivo orbital, especialmente en los músculos extraoculares, lo que conduce a la enfermedad ocular tiroidea (TED, por sus siglas en inglés), también llamada orbitopatía de Graves (GO, por sus siglas en inglés) (Eckstein *et al*. *Endocrine* 68: 265-70, 2020). La sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R) y su interacción con el receptor de tirotropina (TSH-R) es una característica patogénica clave de esta enfermedad.

La inhibición del IGF-1R puede lograrse con anticuerpos monoclonales anti-IGF-1R, por ejemplo, teprotumumab (también conocido como teprotumumab-trbw; RG-1507) (comercializado bajo la marca Tepezza). La unión del

teprotumumab inhibe la señalización a través del complejo IGF-1R/TSH-R y las vías descendentes. El teprotumumab se aprobó por primera vez en EE.UU. en 2020 para el tratamiento del TED agudo y crónico. El teprotumumab es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 totalmente humano, que se administra mediante infusión intravenosa. Para la mayoría de las indicaciones, el tratamiento de mantenimiento requiere infusiones repetidas, por ejemplo, 8 infusiones en total, con la primera recomendada a 10mg/kg seguida de la duplicación de la dosis a 20mg/kg para 7 infusiones más, cada una espaciada tres semanas. Por lo general, las infusiones se administran durante 60 a 90 minutos en un entorno clínico, lo que impone una carga de tratamiento significativa a los pacientes.

La terapia génica consiste en introducir ácidos nucleicos en las células de un paciente para tratar una enfermedad. Los avances en el campo de la terapia génica se han logrado usando virus para administrar material genético terapéutico. Aunque se han desarrollado diversos métodos físicos y químicos para introducir ADN exógeno en células eucariotas, los virus han demostrado ser más eficaces para este fin. Varios virus que contienen ADN, como los parvovirus, adenovirus, herpesvirus y poxvirus, y virus que contienen ARN, como los retrovirus, se han usado para desarrollar vectores eucarióticos de clonación y expresión. Algunos de los problemas que plantean los vectores virales son su baja eficacia, su

capacidad de empaquetamiento del ADN y su falta de especificidad con respecto a la célula objetivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Ciertos aspectos de la descripción se refieren al desarrollo de polinucleótidos (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos) que codifican un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (anti-IGF-1R) o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en terapia génica; vectores (por ejemplo, vectores virales) que comprenden los mismos; partículas de virus adeno-asociado recombinante (rAAV, por sus siglas en inglés) que comprenden los mismos; composiciones que comprenden los mismos, que son adecuadas para el suministro del polinucleótido que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo a un sitio objetivo de interés; y métodos de uso de los mismos. En ciertos aspectos, la descripción se dirige a la administración por rAAV de casetes de expresión de anticuerpos que codifican un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto que lo necesita (por ejemplo, un sujeto que padece orbitopatía de Graves).

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) que comprende una cápside y un genoma vectorial, comprendiendo el genoma vectorial una repetición terminal invertida (ITR, por

sus siglas en inglés) y un casete de expresión de anticuerpos, en el que el casete de expresión de anticuerpos comprende (a) un promotor, (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (anti-IGF-1R) o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH del anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (i) un ácido nucleico que codifica una región determinante complementaria (CDR, por sus siglas en inglés) 1 de la VH que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 7 o 10 (o una secuencia codificante VH CDR1 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5), (ii) un ácido nucleico que codifica una VH CDR2 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 8, 11 o 14 (o una secuencia codificante de VH CDR2 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5), y (iii) un ácido nucleico que codifica una VH CDR3 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 9, 12 o 15 (o una secuencia codificante VH CDR3 descrita en la Tabla 3 o la Tabla 5); y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL del anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (i) una secuencia de ácido nucleico que comprende VL CDR1 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 16 (o una secuencia codificante VL CDR1 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7), (ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una VL CDR2 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 17, 20 o 23 (o una secuencia codificante VL CDR2 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7), y (iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una VL CDR3 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 18, 21 o 24 (o una secuencia codificante VL CDR3 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7).

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a un vector (por ejemplo, un genoma vectorial) que comprende un casete de expresión de anticuerpos que comprende:

(a) un promotor;

(b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una

región variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (anti-IGF-1R) o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (i) un ácido nucleico que codifica una región determinante complementaria (CDR) 1 de VH que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 7 o 10 (o una secuencia codificante VH CDR1 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5), (ii) un ácido nucleico que codifica una VH CDR2 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 8, 11 o 14 (o una secuencia codificante de VH CDR2 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5), y (iii) un ácido nucleico que codifica una VH CDR3 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 9, 12 o 15 (o una secuencia de codificación VH CDR3 descrita en la Tabla 3 o la Tabla 5);

(c) una secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (i) una secuencia de ácido nucleico que comprende una VL CDR1 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 16 (o una secuencia codificante VL CDR1 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7), (ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una VL CDR2 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 17, 20 o 23 (o una secuencia codificante VL CDR2 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7), y (iii) una secuencia de ácido nucleico que comprende una VL CDR3 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 18, 21 o 24 (o una secuencia codificante VL CDR3 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7).

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal. En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal. En ciertos aspectos, el primer y el segundo péptido señal son el mismo. En ciertos aspectos, el primer y el segundo péptido señal son diferentes. En ciertos aspectos, el primer péptido señal (por ejemplo, el péptido señal HC) comprende una secuencia señal de IL-10 humana. En ciertos aspectos, el segundo péptido señal (por ejemplo, péptido señal LC) comprende

una secuencia señal de IL-2 humana.

En ciertos aspectos, el péptido señal (por ejemplo, el primer péptido señal o el segundo péptido señal) comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NO: 119 o 120.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende una secuencia enlazadora seleccionada a partir de una secuencia de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés), un sitio de escisión proteolítico, o una combinación de los mismos.

En ciertos aspectos, el sitio de escisión proteolítica comprende un sitio de escisión furina, un sitio de escisión 2A, o una combinación de los mismos.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH, el IRES y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer péptido señal, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH, el IRES, la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo péptido señal, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL, el IRES y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer péptido señal, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL, el IRES, la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo péptido señal, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH, el sitio de escisión proteolítico y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer péptido señal, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH, el sitio de escisión proteolítico, la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo péptido señal, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor, la secuencia de ácido

nucleico que codifica la VL, el sitio de escisión proteolítico y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer péptido señal, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL, el sitio de escisión proteolítico, la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo péptido señal, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el IRES comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 43 o a una secuencia IRES descrita en la Tabla 15.

En ciertos aspectos, el sitio de escisión de furina comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia de al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 44 o una secuencia de sitio de escisión de furina descrita en la Tabla 15.

En ciertos aspectos, el sitio de escisión 2A comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 45 o una secuencia de sitio de escisión 2A (por ejemplo, F2A) descrita en la Tabla

15.

En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-2 o un péptido señal de IL-10. En ciertos aspectos, el péptido señal codificado comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 119 o 120. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 121 o 122.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende un segundo promotor.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor (un primer promotor), la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL, el segundo promotor, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor (un primer promotor), la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer péptido señal, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL, el segundo promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo péptido señal, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor (un primer promotor), la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH, el segundo promotor, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende el promotor (un primer promotor), la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer péptido señal, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH, el segundo promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo péptido señal, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH, el promotor (un primer promotor), el segundo promotor, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer péptido señal, la VH, el promotor (un primer promotor), el segundo promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo péptido señal, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de

anticuerpos comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un VL, el promotor (un primer promotor), el segundo promotor, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer péptido señal, la secuencia de ácido nucleico que codifica un VL, el promotor (un primer promotor), el segundo promotor, la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo péptido señal, y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el promotor y/o el segundo promotor es un promotor constitutivamente activo, un promotor específico de tipo celular, un promotor sintético o un promotor inducible.

En ciertos aspectos, el promotor y/o el segundo promotor es un promotor CBA, un promotor CMV (opcionalmente, un promotor CMV humano o un promotor CMV de ratón), un promotor EF1α, un promotor CAG o un promotor específico de tejido.

En ciertos aspectos, el promotor comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 47-51, 83, o 93, o una secuencia promotora y/o potenciadora descrita en la Tabla 15.

En ciertos aspectos, el promotor es un promotor

específico del músculo. En ciertos aspectos, el promotor específico de músculo se selecciona de entre un promotor de desmina (DES), un promotor de α-actina de músculo esquelético humano (HSA, por sus siglas en inglés), un promotor de miosina creatina cinasa (MCK, por sus siglas en inglés), un promotor de α miosina cadena pesada miosina creatina cinasa 7 (HMCK7, por sus siglas en inglés), un promotor MCK doble potenciador MCK (dMCK, por sus siglas en inglés), un promotor MCK triple potenciador MCK (tMCK, por sus siglas en inglés), un promotor MCK doble potenciador de la creatina cinasa muscular 8 e (CK8e, por sus siglas en inglés), un promotor SPc5-12, un promotor SP-301, un promotor α de la cadena pesada de miosina (MHC, por sus siglas en inglés), un promotor Sk-CRM o un promotor Sk-CRM4.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende un intrón. En ciertos aspectos, el intrón es un intrón CAG, un intrón SV40, un intrón MVM, o un intrón beta-globina humana, o cualquier combinación de los mismos.

En ciertos aspectos, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a los SEC ID NOs: 46 u 82 o a una secuencia de intrón descrita en la Tabla 15.

En ciertos aspectos, el promotor comprende un primer y un segundo promotor que son diferentes.

En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor

inician la transcripción en la misma dirección.

En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor inician la transcripción en direcciones diferentes.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende un elemento de pausa entre el primer y el segundo promotor.

En ciertos aspectos, el elemento de pausa comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 54 o una secuencia de elemento de pausa descrita en la Tabla 15.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es un anticuerpo monoclonal. En ciertos aspectos, las CDR 1-3 de VH corresponden a las CDR de teprotumumab y/o las CDR 1-3 de VL corresponden a las CDR de teprotumumab. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotumumab.

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de las SEC ID NO: 25-27 (o una secuencia codificante de VH descrita en la Tabla 5). En ciertos aspectos, la VH codificada comprende SEC ID NO: 28 o SEC ID NO: 91 (o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de VH de la Tabla 6).

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico

que codifica la VL comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de las SEC ID NO: 29-31 (o una secuencia codificante de VL descrita en la Tabla 7). En ciertos aspectos, la VL codificada comprende SEC ID NO: 32 o SEC ID NO: 92 (o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de VL de la Tabla 8).

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada (HC) comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NO: 35-37 (o una secuencia de codificación de HC descrita en la Tabla 11). En ciertos aspectos, la HC codificada comprende SEC ID NO: 38 (o la secuencia de aminoácidos de HC de la Tabla 12).

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera (LC) comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NO: 39-41 (o una secuencia codificante de LC descrita en la Tabla 13). En ciertos aspectos, la LC codificada comprende SEC ID NO: 42 (o la secuencia de aminoácidos de LC de la Tabla 14).

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R codificado es teprotumumab.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende una secuencia poli(A). En ciertos aspectos, la secuencia poli(A) se selecciona entre una bGHpA, una hGHpA, una SV40pA o una pA sintética.

En ciertos aspectos, poli(A) comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NOs: 52 o 53 o a una secuencia de poli(A) descrita en la Tabla 15.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 57-67 y 94-97 o una secuencia ORF descrita en la Tabla 16.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpo comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 68-76 o a una secuencia de casete de expresión de anticuerpo descrita en la Tabla 17.

En ciertos aspectos, una repetición terminal invertida (ITR). En ciertos aspectos, la ITR del AAV comprende un par de ITR que flanquean el casete de expresión del

anticuerpo. En ciertos aspectos, las ITR son del mismo serotipo entre sí. En ciertos aspectos, las ITR son del serotipo AAV2.

En ciertos aspectos, el vector está empaquetado en una cápside AAV.

En ciertos aspectos, el serotipo de cápside AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVRh8, AAVrh9, AAV9, AAVrh10, AAV10, AAV11, AAV12, y una versión modificada de los mismos.

En ciertos aspectos, el serotipo de cápside de AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV6, AAV8, AAV9 y una versión modificada de los mismos.

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a una célula hospedera que comprende la partícula rAAV o el vector descrito en el presente documento.

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a una composición que comprende la partícula rAAV o el vector descrito en el presente documento y un portador. En ciertos aspectos, el portador es agua o solución salina.

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a un método para expresar un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo en una célula, que comprende administrar a la célula la partícula rAAV, el vector, o la composición descrita en el presente documento, expresando así el anticuerpo anti-IGF-1R o el fragmento de unión a antígeno del mismo en la célula.

En ciertos aspectos, la célula es una célula fibroblástica, una célula adipocitaria, una célula miofibroblástica, una célula miocitaria, una célula muscular o cualquier combinación de las mismas.

En ciertos aspectos, la administración es *in vitro*.

En ciertos aspectos, la administración es *in vivo*.

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a un método para expresar un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto la partícula rAAV, el vector, o la composición descrita en el presente documento, expresando así el anticuerpo anti-IGF-1R o el fragmento de unión a antígeno del mismo en el sujeto.

En ciertos aspectos, el sujeto padece una enfermedad ocular tiroidea seleccionada entre la Orbitopatía de Graves activa y la Orbitopatía de Graves crónica.

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a un método de tratamiento de una enfermedad ocular tiroidea en un sujeto que la necesita, que comprende administrar al sujeto la partícula rAAV, el vector o la composición descrita en el presente documento, expresando así el anticuerpo anti-IGF-1R o el fragmento de unión a antígeno del mismo en el sujeto y tratando la enfermedad ocular tiroidea.

En ciertos aspectos, la enfermedad ocular tiroidea seleccionada entre Orbitopatía de Graves activa y Orbitopatía

de Graves crónica.

En ciertos aspectos, la administración es adecuada para administrar la partícula de rAAV o el vector a un sitio de administración ocular, un sitio de administración retro o periorbital, un sitio de administración retrobulbar, un sitio de administración de músculo extraocular, un sitio de administración de tejido conjuntivo o cualquier combinación de sitios de administración de los mismos.

En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección o infusión.

En ciertos aspectos, la administración es intramuscular (IM), intravenosa (IV), intralinfática, intraocular, retroorbitaria, periorbitaria, retrobulbar, o cualquier combinación de las mismas.

En ciertos aspectos, la administración es adecuada para administrarse a células de fibroblastos retro o periorbitarias, células de adipocitos, células de miofibroblastos, células de miocitos, o cualquier combinación de las mismas.

En ciertos aspectos, la administración es a un músculo extraocular.

En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar.

En ciertos aspectos, la administración es a un tejido conjuntivo.

En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario.

En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular.

En ciertos aspectos, la administración es una dosis única. En ciertos aspectos, dosis única, múltiples inyecciones y/o infusiones.

En ciertos aspectos, la administración es una dosis única. En ciertos aspectos, dosis única, múltiples inyecciones y/o infusiones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 muestra un mapa plasmídico de un vector que incluye los siguientes elementos ITR a ITR: ITR de AAV2 flanqueando en orden 5' a 3' un potenciador CMV, un promotor CBA, un intrón CAG, un ácido nucleico que codifica un péptido señal, un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de teprotumumab (Tepro HC), una secuencia F2A, un ácido nucleico que codifica un péptido señal, un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de teprotumumab (Tepro LC), y una poli adenilación bovina (bGH pA).

La FIG. 2 muestra un mapa plasmídico de un vector que incluye los siguientes elementos ITR a ITR: ITR de AAV2 flanqueando en orden 5' a 3' un potenciador CMV, un promotor CBA, un intrón CAG, un ácido nucleico que codifica un péptido señal, un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de

teprotumumab (Tepro LC), una secuencia IRES (IRES2), un ácido nucleico que codifica un péptido señal, un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de teprotumumab (Tepro HC), y un sitio de poli adenilación sintético (syn pA).

La FIG. 3 muestra un mapa plasmídico de un vector que incluye los siguientes elementos ITR a ITR: ITR de AAV2 flanqueando en orden de 5' a 3' un potenciador de CMV, un promotor de CMV, un intrón de SV40, un ácido nucleico que codifica un péptido señal, un ácido nucleico que codifica la cadena ligera de teprotumumab (Tepro LC), un sitio de poli adenilación bovina (bGH PA), un sitio de pausa, un promotor central EF-1a, un 5'LTR truncado, un intrón quimérico de cadena pesada de betaglobina/inmunoglobulina humana, un ácido nucleico que codifica un péptido señal, un ácido nucleico que codifica la cadena pesada de teprotumumab (Tepro HC) y un sitio de poli adenilación sintético (syn pA).

Las FIGS. 4A-4D muestran la cuantificación de proteína y ARNm de teprotumumab secretado a partir de células HEK-293 transfectadas. La FIG. 4A es un gráfico que muestra la cantidad de teprotumumab secretado a partir de células HEK-293 transfectadas con construcciones de plásmido AAV de teprotumumab H-F2A-L (ORF #1), H-F2A-L (ORF #2), L-IRES-H (ORF #12), L-IRES-H (ORF #13), promotor dual (ORF #4 y 5), o promotor dual (ORF #6 y 7). LA FIG. 4B es un gráfico que muestra la cantidad de teprotumumab secretado a partir de células HEK-293

transfectadas con H-F2A-L (ORF #1), H-F2A-L (ORF #2), L-IRES-H (ORF #12) o L-IRES-H (ORF #13) construcciones plásmidas AAV de teprotumumab o H-F2A-L (ORF #1) (plásmido) o L-IRES-H (ORF #4 y 5) (plásmido) construcciones plásmidas no AAV de teprotumumab. La FIG. 4C muestra un análisis Western Blot de cadenas ligeras y pesadas de teprotumumab secretado realizado en condiciones reductoras y no reductoras como se indica. La FIG. 4D es un gráfico que muestra los niveles de ARNm de teprotumumab en células HEK-293 transfectadas con construcciones de plásmido AAV de teprotumumab H-F2A-L (ORF #1), L-IRES-H (ORF #12) o promotor dual (ORF #4 y 5).

Las FIGS. 5A-5B muestran la unión de teprotumumab vectorizado secretado a partir de células HEK-293 transfectadas al IGF-1R. La FIG. 5A es un gráfico que muestra la capacidad de unión de IGF-1R de teprotumumab secretado a partir de células HEK-293 transfectadas con construcciones de plásmido AAV de teprotumumab H-F2A-L (ORF #1), H-F2A-L (ORF #2), L-IRES-H (ORF #12) o L-IRES-H (ORF #13). La FIG. 5B es un gráfico que muestra la linealidad de la unión de teprotumumab vectorizado secretado a partir de células HEK-293 transfectadas a IGF-1R en dos réplicas del mismo experimento de unión.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra la reducción de los niveles de fosforilación del IGF-1R tras el tratamiento con teprotumumab recombinante o teprotumumab secretado a partir de células HEK-293 transfectadas con H-F2A-L (ORF #1) o H-F2A-

L (ORF #2).

Las FIGS. 7A-7B muestran las disminuciones de expresión total y fosfo-IGF-1R en células HT-1080 (FIG. 7A) y Colo205 (FIG. 7B) tras 48 horas de tratamiento con Teprotumumab recombinante o vectorizado, según se indica. Todos los pocillos de la placa MSD se cargaron con el mismo µg total de lisado de células enteras de HT-1080 o Colo205. Todos los valores presentados son un porcentaje del valor tratado/valor medio del tratamiento simulado. N=3 repeticiones técnicas por muestra, las barras son la media +/-SD. Todas las estadísticas son ANOVAs unidireccionales con comparación *post-hoc* de cada tratamiento con Teprotumumab con el control simulado tratado, realizadas por separado para los valores totales o fosfo. Todos los "Teprotumumab vectorizado" son sobrenadantes de HEK293T que contienen las respectivas ng de Teprotumumab tras la transducción con AAV que expresa H-F2A-L (ORF No. 2).

Las FIGS. 8A-8C muestran la reducción porcentual de la expresión de la proteína del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R) (FIG. 8A), la proteína del receptor de insulina (IR) (FIG. 8B) y la proteína del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) (FIG. 8C) en células fibrocitarias primarias cultivadas aisladas de sangre periférica de un donante normal (indicado como Normal) o de un donante con enfermedad de Graves (indicado como Graves) tras el tratamiento con Teprotumumab vectorizado (vTepro) o

Teprotumumab recombinante (rTepro) a una concentración de 500 ng/ml. Todos los valores presentados son un porcentaje de (valor medio tratado de prueba/valor medio tratado de prueba*100)-(valor tratado/valor medio tratado de prueba *100) donde cada valor medio es n=2 réplicas técnicas. Los valores de las muestras normales se representan como la media de n=2 réplicas biológicas por muestra; las barras son la media +/- SEM. Los valores de las muestras de Graves se representan como N=1 réplicas biológicas. Todos los "Teprotumumab vectorizado" son sobrenadantes HEK293T que contienen los respectivos ng de Teprotumumab tras la transducción con AAV que expresa H-F2A-L (ORF No. 2). El tratamiento con Teprotumumab vectorizado produjo una disminución sustancial de los niveles de expresión de las proteínas IGF-1R, IR e IRS-1 en el fibrocito de la enfermedad de Graves.

La FIG. 9 muestra inmunocitoquímica de células Colo205 para IGF-1R con o sin tratamiento con 500 ng/ml de Teprotumumab recombinante durante 24 - 48 horas mostrando reducción de la expresión de IGF-1R. Los paneles A y E muestran controles celulares no tratados durante 24 horas; y los paneles B y F muestran células tratadas con Teprotumumab durante 24 horas. Los paneles C y G muestran controles celulares no tratados durante 48 horas; y los paneles D y H muestran células tratadas con Teprotumumab durante 48 horas. Los paneles A, B, C y D muestran células que no fueron permeabilizadas; y los

paneles E, F, G y H muestran células que fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0.1%.

Las FIGS. 10A-10C muestran el crecimiento tumoral en ratones xenoinjertados con Colo205 tratados con el casete de expresión de anticuerpo AAV1 que codifica Teproumumab (FIG. 10A), el casete de expresión de anticuerpo AAV2 que codifica Teproumumab (FIG. 10B) o el casete de expresión de anticuerpo AAV9 que codifica Teproumumab (FIG. 10C), en comparación con ratones de control no tratados, y ratones tratados con teprotumumab recombinante (6 mg/kg cada 7 días) como se indica en la leyenda de la figura.

La FIG. 11 muestra los niveles de Teprotumumab en tumores obtenidos de animales tratados con el casete de expresión de anticuerpos liberado por AAV1 que codifica Teprotumumab, el casete de expresión de anticuerpos liberado por AAV2 que codifica Teprotumumab, el casete de expresión de anticuerpos liberado por AAV9 que codifica Teprotumumab desde el día 7 hasta el día 31, y en tumores obtenidos de animales tratados con Teprotumumab recombinante (6 mg/kg cada 7 días) en el día 31. Las barras representan la media ±SEM. Los días 7, 14 y 28 son los brazos de muestreo, el día 31 es el brazo de eficacia.

La FIG. 12 muestra los niveles séricos de Teprotumumab en animales tratados con el casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV1 que codifica Teprotumumab, el

casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV2 que codifica Teprotumumab, el casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV9 que codifica Teprotumumab desde el día 7 hasta el día 31, y en el suero de animales tratados con Teprotumumab recombinante (6 mg/kg cada 7 días) en el día 31. Las barras representan la media ±SEM. Los días 7, 14 y 28 son los brazos de muestreo, el día 31 es el brazo de eficacia.

La FIG. 13 muestra los niveles de IGF-1R en tumores obtenidos de animales tratados con el casete de expresión de anticuerpo AAV1 que codifica Teprotumumab, el casete de expresión de anticuerpo AAV2 que codifica Teprotumumab, el casete de expresión de anticuerpo AAV9 que codifica Teprotumumab desde el día 7 hasta el día 31, y en tumores obtenidos de animales tratados con Teprotumumab recombinante (6 mg/kg cada 7 días) en el día 31. Las barras de error corresponden a la media ± SEM. Las barras de error representan la media ±SEM. Los días 7, 14 y 28 son los brazos de muestreo, el día 31 es el brazo de eficacia. La disminución de los niveles de IFG-1R en relación con los controles no tratados fue estadísticamente significativa en todos los puntos temporales. En el día 31, la disminución de los niveles de IFG-1R causada por Teprotumumab administrado por AAV1 y Teprotumumab administrado por AAV9 no fue estadísticamente diferente de la causada por Teprotumumab recombinante (6 mg/kg cada 7 días).

La FIG. 14 muestra las copias del genoma del vector

como copias/µg de ADN genómico del hospedero en tumores obtenidos de animales tratados con el casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV1 que codifica Teprotumumab, el casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV2 que codifica Teprotumumab, el casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV9 que codifica Teprotumumab y en animales de control no tratados en los días 7, 14 y 28, como se indica en la leyenda de la figura.

La FIG. 15 muestra la expresión de ARNm como copias monocatenario/µg de ARN hospedero en tumores obtenidos de animales tratados con casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV1 que codifica Teprotumumab, casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV2 que codifica Teprotumumab, casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV9 que codifica Teprotumumab y en animales de control no tratados en los días 7, 14 y 28, como se indica en la leyenda de la figura.

LA FIG. 16 muestra las copias del genoma del vector como copias/µg de ADN genómico del hospedero, y la expresión de ARNm como copias monocatenario/µg de ARN del hospedero, en tumores obtenidos de animales tratados con el casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV1 que codifica Teprotumumab, casete de expresión de anticuerpos con codificación de teprotumumab administrado por AAV2, casete de expresión de anticuerpos con codificación de teprotumumab

administrado por AAV9 y animales de control no tratados en los días 7, 14 y 28, como se indica en la leyenda de la figura.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Ciertos aspectos de la descripción se relacionan con vectores de terapia génica y constructos de expresión que codifican anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (anti-IGF-1R) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos; vectores virales (por ejemplo, vectores rAAV) que comprenden los mismos; composiciones que comprenden los mismos adecuadas para administración (por ejemplo, administración retrobulbar, periorbitaria y/o intramuscular), y métodos de uso de los mismos. En ciertos aspectos, la descripción se dirige a la administración por vectores de virus adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés) de casetes de expresión de anticuerpos que codifican anticuerpos anti-IGF-1R (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos a un sujeto que los necesita.

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a un polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (también denominado IGF-1R o IGF-1R en el presente documento). En ciertos aspectos, el polinucleótido (por

ejemplo, un casete de expresión de anticuerpo) comprende un marco de lectura abierto (ORF) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada anti-IGF-1R y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera anti-IGF-1R. En ciertos aspectos, el ORF está unido de forma operable a un promotor (por ejemplo, un promotor CBA o un promotor CMV). En ciertos aspectos, el ORF está unido de forma operable a un potenciador (por ejemplo, un potenciador CMV) y/o una secuencia de intrón (por ejemplo, un intrón CAG o una secuencia de intrón SV40). En ciertos aspectos, el ORF está unido de forma operable a un elemento de poliadenilación (poliA) (por ejemplo, un bGHpA, un hGHpA, un SV40pA o un pA sintético).

En ciertos aspectos, el ORF comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-2 o un péptido señal de IL-10. En ciertos aspectos, el ORF comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal y una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal. En ciertos aspectos, el primer y el segundo péptido señal son el mismo. En ciertos aspectos, el primer y el segundo péptido señal son diferentes.

En ciertos aspectos, el ORF comprende un enlazador entre la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada anti-IGF-1R y la secuencia de ácido nucleico que

codifica la cadena ligera anti-IGF-1R. En ciertos aspectos, el enlazador es una secuencia de entrada ribosómica interna (IRES), un sitio de escisión proteolítico (por ejemplo, un sitio de escisión de furina y/o 2A (por ejemplo, F2A)), o una combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el OFR comprende además un ácido nucleico que codifica una secuencia señal. En ciertos aspectos, el OFR se sitúa entre dos repeticiones terminales invertidas (ITR).

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena pesada anti-IGF-1R, un IRES, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena ligera anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena pesada anti-IGF-1R, un IRES, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena ligera anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de

cadena ligera anti-IGF-1R, un IRES, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena pesada anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena ligera anti-IGF-1R, un IRES, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena pesada anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena pesada anti-IGF-1R, un sitio de escisión F2A, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena ligera anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena pesada anti-IGF-1R, un sitio de escisión F2A, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena ligera anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena ligera anti-IGF-1R, un sitio de escisión F2A, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena pesada anti-IGF-1R secuencias en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena ligera anti-IGF-1R, un sitio de escisión F2A, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una región de cadena pesada anti-IGF-1R secuencias en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende además un segundo promotor.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera anti-IGF-1R, un segundo promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo,

un casete de expresión de anticuerpos) comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera anti-IGF-1R, un segundo promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada anti-IGF-1R, un segundo promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada anti-IGF-1R, un segundo promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada anti-IGF-1R, un primer promotor, un segundo promotor, y una secuencia de

ácido nucleico que codifica una cadena ligera anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada anti-IGF-1R, un primer promotor, un segundo promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera anti-IGF-1R, un primer promotor, un segundo promotor, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera anti-IGF-1R, un primer promotor, un segundo promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada anti-IGF-1R en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el promotor es un promotor

constitutivamente activo, un promotor específico de tipo celular, un promotor sintético o un promotor inducible. En ciertos aspectos, el promotor se selecciona entre un promotor CAG, un promotor CBA, un promotor CMV humano, un promotor CMV de ratón, un promotor EF1α, un promotor EF1α con un potenciador CMV, un promotor CMV con un potenciador CMV (CMVe/p), un promotor CMV con un intrón SV40, o un promotor específico de tejido. En ciertos aspectos, el promotor específico de tipo celular es un promotor específico de músculo que incluye un promotor DES, un promotor HSA, un promotor MCK, un promotor HMCK7, un promotor dMCK, un promotor tMCK, un promotor CK8e, un promotor SPc5-12, un promotor SP-301, un promotor MH, un promotor Sk-CRM o un promotor Sk-CRM4 (véase, por ejemplo, Skopenkova *et al*., Acta Naturae 13: 47-58, 2012).

En ciertos aspectos, el promotor comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 47-51, 83, o 93, o una secuencia promotora y/o potenciadora descrita en la Tabla 15. En ciertos aspectos, el promotor puede comprender un intrón. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que comprende el promotor puede comprender un intrón. En ciertos aspectos, el intrón se selecciona del grupo que consiste en un intrón CAG, un intrón SV40, un intrón MVM, un intrón de betaglobina humana o un intrón quimérico de cadena de inmunoglobulina humana y

betaglobina humana. En ciertos aspectos, el intrón CAG comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 82. En ciertos aspectos, el intrón SV40 comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 46. En ciertos aspectos, el promotor comprende una secuencia de intrón descrita en la Tabla 15.

En ciertos aspectos, el promotor comprende un primer y un segundo promotor. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor son diferentes. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor son iguales. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor inician la transcripción en la misma dirección. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor inician la transcripción en direcciones diferentes. En ciertos aspectos, el primer y/o segundo promotor en un promotor CMV. En ciertos aspectos, el primer y/o segundo promotor es un promotor EF-1α. En ciertos aspectos, el primer y/o segundo promotor es un promotor CBA.

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer promotor y la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo promotor están unidas de forma operable. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer promotor y la secuencia de ácido

nucleico que codifica el segundo promotor están unidas de forma operable por un elemento de pausa. En ciertos aspectos, el elemento de pausa comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 54 o una secuencia de elemento de pausa descrita en la Tabla 15.

En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal endógeno de HGH y sus variantes; un péptido señal endógeno de interferones y sus variantes, incluido el péptido señal de interferones de tipo I, II y III y sus variantes; un péptido señal endógeno de citocinas conocidas y sus variantes, como el péptido señal de eritropoyetina (EPO), insulina, TGF-β1, TNF, IL1-α e IL1-β, y sus variantes. En algunas modalidades, el péptido señal es un péptido señal modificado. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-2. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-10. En ciertos aspectos, el péptido señal comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 119 o 120.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es un anticuerpo monoclonal. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotumumab.

En ciertos aspectos, la cadena pesada del anticuerpo anti-IGF-1R comprende una región variable (VH) de cadena pesada

que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, una CDR VH2 y una CDR VH3. En ciertos aspectos, las CDR 1-3 de la VH corresponden a las CDR del teprotumumab. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH CDR1 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 7 o 10 (o una secuencia codificante VH CDR1 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5); la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH CDR2 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 8, 11 o 14 (o una secuencia codificante VH CDR2 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5); y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH CDR3 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 9, 12 o 15 (o una secuencia codificante VH CDR3 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5).

En ciertos aspectos, la cadena ligera del anticuerpo anti-IGF-1R comprende una región variable (VL) de cadena ligera que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, una CDR VL2 y una CDR VL3. En ciertos aspectos, las CDR 1-3 de VL corresponden a las CDR de teprotumumab. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL

CDR1 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 16 (o una secuencia codificante VL CDR1 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7); la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL CDR2 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 17, 20 o 23 (o una secuencia codificante de VL CDR2 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7); y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL CDR3 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 18, 21 o 24 (o una secuencia codificante de VL CDR3 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7).

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada (VH) comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de las SEC ID NO: 25-27 (o una secuencia codificante de VH descrita en la Tabla 5). En ciertos aspectos, la VH codificada comprende SEC ID NO: 28 o SEC ID NO: 91 (o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de VH de la Tabla 6). En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera (VL) comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 29-31 (o una secuencia codificante de VL descrita en la Tabla 7). En ciertos aspectos, la VL codificada comprende SEC ID NO: 32 o SEC ID NO: 92 (o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de VL de la Tabla 8).

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada (HC) comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NO: 35-37 (o una secuencia codificante de HC descrita en la Tabla 11). En ciertos aspectos, la HC codificada comprende SEC ID NO: 38 (o la secuencia de aminoácidos de HC de la Tabla 12). En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera (LC) comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 39-41 (o una secuencia codificante de LC descrita en la Tabla 13). En ciertos aspectos, la LC codificada comprende SEC ID NO: 42 (o la secuencia de aminoácidos de LC de la Tabla 14).

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera están unidas de forma operable. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que

codifica la cadena pesada y la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera están unidas de forma operable por una secuencia enlazadora. En ciertos aspectos, la secuencia enlazadora se selecciona a partir de una secuencia IRES, un sitio de escisión proteolítico (por ejemplo, un sitio de escisión furina y/o 2A, por ejemplo, F2A), o una combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el IRES comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 43 o a una secuencia IRES descrita en la Tabla 15. En ciertos aspectos, el sitio de escisión de furina comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 44 o una secuencia de sitio de escisión de furina descrita en la Tabla 15. En ciertos aspectos, el sitio de escisión 2A comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 45 o una secuencia de sitio de escisión 2A (por ejemplo, F2A) descrita en la Tabla 15.

En ciertos aspectos, el polinucleótido comprende un marco de lectura abierto (ORF) que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 57-67 y 94-97 o una secuencia ORF descrita

en la Tabla 16.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende una secuencia poli(A). En ciertos aspectos, la secuencia poliA comprende una secuencia señal poliA de hormona de crecimiento humana. En ciertos aspectos, la secuencia poliA comprende una secuencia señal poliA de hormona de crecimiento bovina. En ciertos aspectos, la secuencia poliA comprende una secuencia sintética poliA. En ciertos aspectos, la secuencia poliA comprende una secuencia señal SV40 poliA (SV40pA). En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) comprende una secuencia poli(A) que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 52 o 53 o una secuencia poli(A) descrita en la Tabla 15. En ciertos aspectos, la secuencia poli(A) comprende una secuencia poli(A) sintética.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpo comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76 o a una secuencia de casete de expresión de anticuerpo descrita en la Tabla 17.

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a un método para expresar y/o producir un anticuerpo anti-IGF-1R o

un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende administrar a una célula un polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpo), un vector, o una partícula rAAV de la descripción, expresando y/o produciendo así el anticuerpo anti-IGF-1R o el fragmento de unión a antígeno del mismo en la célula. En ciertos aspectos, la célula es una célula fibroblástica, una célula adipocitaria, una célula miofibroblástica, una célula miocitaria, una célula muscular, o cualquier combinación de las mismas.

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a una composición (por ejemplo, una composición de terapia génica) que comprende un polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), un vector o una partícula rAAV de la descripción.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula de rAAV o la composición de la descripción son adecuados para su administración a un sujeto que los necesite (por ejemplo, un sujeto que padezca oftalmopatía de Graves). En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula de rAAV o la composición de la descripción son adecuados para su administración a un sitio de administración ocular, un sitio de administración retro o periorbital, un sitio de administración retrobulbar, un sitio de administración de

músculo extraocular, un sitio de administración de tejido conjuntivo o cualquier combinación de sitios de administración de los mismos. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección o infusión. En ciertos aspectos, la administración se realiza por una vía seleccionada entre intramuscular (IM), intravenosa (IV), intralinfática, intraocular, retroorbitaria, periorbitaria, retrobulbar o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración es adecuada para administrarse a células de fibroblastos retro o periorbitarias, células de adipocitos, células de miofibroblastos, células de miocitos o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración es a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición de la descripción es adecuado para una administración de dosis única. En ciertos aspectos, dosis única, múltiples inyecciones y/o infusiones.

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a un

método de expresión de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a IGF-1R en un sujeto que lo necesita, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpo), vector, partícula de rAAV o composición de la descripción. En ciertos aspectos, la administración es una dosis única. En ciertos aspectos, la dosis única comprende múltiples inyecciones a un sitio de administración ocular, retro- o peri-orbital, retrobulbar, músculo ocular, o cualquier otro sitio de administración descrito en el presente documento.

En ciertos aspectos, la entrega o administración puede ser intramuscular (IM), intravenosa (IV), intraocular (IC), intralinfática, periorbitaria, retrobulbar, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza en o cerca de un ojo (por ejemplo., uno o ambos ojos), por ejemplo., intraocular, retro o periorbitaria, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo (por ejemplo., en un músculo elevador y/o un músculo glabelar), en el tejido conjuntivo cerca del ojo, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza a células fibroblásticas retroorbitarias o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En

ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones.

También se proporciona en el presente documento un método para expresar un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpo), vector, partícula de rAAV o composición de la descripción, en el que la administración es intramuscular (IM), intravenosa (IV), intraocular (IC), intralinfática, periorbital, retrobulbar o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la composición de terapia génica o cápside de AAV se administra mediante inyección periorbitaria, retrobulbar y/o intramuscular (por ejemplo, inyección a un músculo elevador y/o un músculo glabelar). En ciertos aspectos, la administración es a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En

ciertos aspectos, la administración da lugar a la expresión del anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo en un tipo celular seleccionado del grupo que consiste en fibroblastos, adipocitos, miofibroblastos, miocitos y cualquier combinación de los mismos.

En ciertos aspectos, el sujeto padece una enfermedad ocular tiroidea (TED), por ejemplo, una oftalmopatía de Graves activa o crónica.

En la presente descripción se muestran ejemplos no limitativos de los diversos aspectos.

I. Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente descripción, en primer lugar se definen algunos términos. A lo largo de la descripción detallada se ofrecen definiciones adicionales.

Cabe señalar que el término "un" o "uno, una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, "una secuencia de ácido nucleico," se entiende que representa una o más secuencias de ácido nucleico, a menos que se indique lo contrario. Como tales, los términos "un" (o "uno, una"), "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

Además, "y/o", cuando se usa en el presente documento, debe entenderse como la descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados

con o sin la otra. Por lo tanto, el término "y/o" usado en una frase como "A y/o B" incluye "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Del mismo modo, el término "y/o" usado en una frase como "A, B, y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Los valores numéricos aquí presentados pueden escribirse o expresarse en notación científica, es decir, $x \times 10^{y}$, o en notación científica E xEy.

Se entiende que siempre que en el presente documento se describan aspectos con la expresión "que comprende", también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

El término "aproximadamente" se usa aquí para referirse a aproximadamente, más o menos, aproximadamente, o en las regiones de. Cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un intervalo numérico, modifica tal intervalo ampliando los límites por arriba o por abajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" puede modificar un valor numérico por arriba o por abajo del valor establecido mediante una variación de, por ejemplo, el 10 por ciento, hacia arriba o hacia abajo (mayor o menor).

Se entiende que el término "al menos" antepuesto a un número o serie de números incluye el número adyacente al

término "al menos" y todos los números o enteros subsiguientes que lógicamente podrían incluirse, según se desprenda del contexto. Por ejemplo, el número de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico debe ser un número entero. Por ejemplo, "al menos 18 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de 21 nucleótidos" significa que 18, 19, 20 o 21 nucleótidos tienen la propiedad indicada. Cuando se antepone "al menos" a una serie de números o a un intervalo, se entiende que "al menos" puede modificar cada uno de los números de la serie o intervalo. "Al menos" tampoco se limita a números enteros (por ejemplo, "al menos 5%" incluye 5.0%, 5.1%, 5.18% sin tener en cuenta el número de cifras significativas).

Como se usa aquí, "no más que" o "menos que" se entiende como el valor adyacente a la frase y los valores inferiores lógicos o enteros, como se deduce lógicamente del contexto, a cero. Cuando "no más que" está presente antes de una serie de números o un intervalo, se entiende que "no más que" puede modificar cada uno de los números de la serie o intervalo.

Como se usa el presente documento, el término "intraocular" se refiere a un lugar situado dentro del ojo o a través de él.

Como se usa en el presente documento los términos "intraorbital" se refieren a un lugar situado dentro de la órbita. La órbita es la cavidad del cráneo que contiene el ojo,

los músculos, las glándulas, los vasos sanguíneos, los nervios, etc. relacionados con el ojo.

Como se usa en el presente documento, el término "periorbital" se refiere a un lugar situado alrededor o que rodea la órbita (por ejemplo, los tejidos que rodean o revisten la órbita del ojo).

Como se usa en el presente documento, los términos "retroorbital" o "retrobulbar" se refieren a un lugar situado detrás del globo ocular.

Como se usa en el presente documento, el término "retrobulbar" se refiere a un lugar situado detrás del globo ocular.

Como se usa en el presente documento, "intralinfático" se refiere a una localización asociada a un ganglio linfático o a un vaso linfático.

Como se usa en el presente documento, el término "vector de administración" o "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación y/o transferencia de un ácido nucleico a una célula hospedera, como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc. Un vector puede ser un replicón al que se puede unir otro segmento de ácido nucleico para provocar la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad

autónoma de replicación *in vivo*, es decir, capaz de replicarse bajo su propio control. El término "vector de administración" o "vector" incluye vehículos virales y no virales para introducir el ácido nucleico en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En la técnica se conoce y usa un gran número de vectores que incluyen, por ejemplo, plásmidos, virus eucarióticos modificados o virus bacterianos modificados. En ciertos aspectos, la inserción de un polinucleótido en un vector adecuado puede realizarse ligando los fragmentos de polinucleótido apropiados en un vector elegido que tenga terminales cohesivos complementarios. Los vectores pueden diseñarse para codificar marcadores o informadores seleccionables que permitan la selección o identificación de las células que han incorporado el vector. La expresión de marcadores o informadores seleccionables permite la identificación y/o selección de células hospederas que incorporan y expresan otras regiones codificantes contenidas en el vector. Ejemplos de genes marcadores seleccionables conocidos y usados en la técnica incluyen: genes que proporcionan resistencia a la ampicilina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, higromicina, herbicida bialafos, sulfonamida, y similares; y genes que se usan como marcadores fenotípicos, es decir, genes reguladores de antocianina, gen isopentanil transferasa, y similares. Ejemplos de reporteros conocidos y usados en la técnica incluyen: luciferasa (Luc),

proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β-galactosidasa (LacZ), β-glucuronidasa (Gus), y similares. Los marcadores seleccionables también pueden considerarse informadores. En ciertos aspectos, el vector de administración se selecciona del grupo que consiste en un vector viral (por ejemplo, un vector AAV), un plásmido, un lípido, una partícula proteica, un vector bacteriano y un lisosoma.

Algunos aspectos de la descripción se dirigen a vectores biológicos, que pueden incluir virus, particularmente virus atenuados y/o deficientes en replicación.

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de un gen. El término "promotor" también se refiere a aquellos elementos de ácido nucleico suficientes para la expresión génica dependiente del promotor, controlable por señales o agentes externos específicos del tipo de célula, específicos del tejido o inducibles; tales elementos pueden localizarse en las regiones 5′ o 3′ del gen nativo. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor constitutivamente activo, un promotor específico de tipo celular o un promotor inducible.

Como se usa en el presente documento, el término "potenciador" es un elemento de acción cis que estimula o

inhibe la transcripción de genes adyacentes. Un potenciador que inhibe la transcripción también se denomina "silenciador". Los potenciadores pueden funcionar (por ejemplo, pueden estar asociados a una secuencia codificante) en cualquier orientación, a distancias de hasta varios pares de kilobases (kb) de la secuencia codificante y desde una posición corriente abajo de una región transcrita.

Como se usa en el presente documento, el término "promotor regulable" es cualquier promotor cuya actividad se ve afectada por un factor de acción cis o trans (por ejemplo, un promotor inducible, como una señal o agente externo).

Como se usa en el presente documento, el término "promotor constitutivo" es cualquier promotor que dirija la producción de ARN en muchos o todos los tipos de tejidos/células en la mayoría de los momentos, por ejemplo, la región potenciadora/promotora temprana inmediata del CMV humano que promueve la expresión constitutiva de insertos de ADN clonados en células de mamífero.

Los términos "proteína reguladora transcripcional", "factor regulador transcripcional" y "factor de transcripción" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una proteína nuclear que se une a un elemento de respuesta del ADN y, por tanto, regula transcripcionalmente la expresión de un gen o genes asociados. Por lo general, las proteínas reguladoras transcripcionales se unen directamente a un

elemento de respuesta del ADN; sin embargo, en algunos casos, la unión al ADN puede ser indirecta mediante la unión a otra proteína que, a su vez, se une o está unida a un elemento de respuesta del ADN.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia señal de terminación" puede ser cualquier elemento genético que haga que la polimerasa de ARN termine la transcripción, como por ejemplo una secuencia señal de poliadenilación. Una secuencia señal de poliadenilación es una región de reconocimiento necesaria para la escisión por endonucleasas de un transcrito de ARN que va seguida de la secuencia consenso de poliadenilación AATAAA. Una secuencia señal de poliadenilación proporciona un "sitio poliA", es decir, un sitio en un transcrito de ARN al que se añadirán residuos de adenina mediante poliadenilación postranscripcional.

Como se usa en el presente documento, el término "péptido señal" se refiere a una secuencia polipeptídica o combinación de secuencias que son suficientes para mediar en la translocación de un polipéptido a la superficie celular. Sin estar limitado por ninguna teoría en particular, la translocación de un polipéptido a la superficie celular puede estar mediada por la vía secretora, incluida la translocación de un polipéptido desde el citosol al retículo endoplásmico, y el posterior transporte del polipéptido a través del Golgi, y

a la membrana celular, donde la proteína puede permanecer incrustada en la membrana celular, o ser secretada de la célula. Como se usa en el presente documento, los "péptidos señal" incluyen secuencias señal naturales y sintéticas, "parches" señal y similares. Ejemplos de péptidos señal incluyen, pero no se limitan a, el péptido señal endógeno para HGH y variantes del mismo; el péptido señal endógeno para interferones y variantes del mismo, incluyendo el péptido señal de interferones tipo I, II y III y variantes del mismo; y los péptidos señal endógenos para citocinas conocidas y variantes del mismo, tales como el péptido señal de eritropoyetina (EPO), insulina, TGF-β1, TNF, IL1-α, e IL1-β, y variantes del mismo. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-2. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-10. En algunas modalidades, el péptido señal es un péptido señal modificado.

Como se usa en el presente documento, el término "sitio de entrada del ribosoma interno" o "IRES" hace referencia a un elemento que promueve la entrada directa del ribosoma interno al codón de iniciación, como ATG, de un cistrón (una región codificante de proteínas), lo que conduce a la traducción del gen independiente de la caperuza. Véase, por ejemplo, Jackson R J *et. al.*, *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83 (199); Jackson R J y Kaminski, A. *RNA* 1(10):985-1000 (1995). "Bajo el control traslacional de un IRES"

significa que la traducción está asociada con el IRES y procede de forma independiente de la caperuza.

El término "sitio de escisión de autoprocesamiento" o "secuencia de escisión de autoprocesamiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sitio o secuencia de escisión de procesamiento postraduccional o cotraduccional. Tal sitio o secuencia de "escisión de autoprocesamiento" se refiere a una secuencia de ADN o aminoácido, ejemplificada aquí por un sitio, secuencia o dominio 2A o un sitio, secuencia o dominio similar a 2A. El término "péptido de autoprocesamiento" se define en el presente documento como el producto de expresión peptídica de la secuencia de ADN que codifica un sitio o secuencia de escisión de autoprocesamiento que, tras la traducción, media en la escisión intramolecular (cis) rápida de una proteína o polipéptido que comprende el sitio de escisión de autoprocesamiento para dar lugar a productos proteicos o polipeptídicos maduros discretos.

Como se usa en el presente documento, el término "sitio de escisión proteolítico adicional" se refiere a una secuencia que se incorpora a una construcción de expresión de la descripción adyacente a un sitio de escisión de autoprocesamiento, tal como una secuencia 2A o similar a 2A, y proporciona un medio para eliminar aminoácidos adicionales que permanecen tras la escisión por la secuencia de escisión de autoprocesamiento. Los péptidos 2A ejemplares incluyen, entre

otros, P2A, E2A, F2A y T2A. Los "sitios de escisión proteolítica adicionales" ejemplares se describen en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, sitios de escisión de furina con la secuencia consenso RXK(R)R. Tales sitios de escisión de furina pueden ser de cualquier tipo. Tales sitios de escisión de furina pueden ser escindidos por proteasas endógenas similares a la subtilisina, tales como furina y otras proteasas de serina dentro de la vía de secreción de proteínas. En ciertos aspectos, pueden usarse otros "sitios de escisión proteolítica adicionales" ejemplares, como se describe en, por ejemplo, Lie *et al*., *Sci Rep* 7, 2193 (2017).

Los términos "operativamente ligado", "operativamente insertado", "operativamente posicionado", "bajo control" o "bajo control transcripcional" significan que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con el ácido nucleico para controlar la iniciación de la polimerasa de ARN y la expresión del gen. El término "enlazado operablemente" significa que una secuencia de ADN y una secuencia o secuencias reguladoras están conectadas de tal manera que permiten la expresión del gen cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) están unidas a la secuencia o secuencias reguladoras. El término "operablemente insertado" significa que el ADN de interés introducido en la célula está situado junto a una secuencia de ADN que dirige la transcripción y

traducción del ADN introducido (es decir, facilita la producción de, por ejemplo, un polipéptido codificado por un ADN de interés).

El término "vector o constructo de expresión" se entiende cualquier tipo de constructo genético que contenga un ácido nucleico en el que parte o la totalidad de la secuencia codificante del ácido nucleico pueda transcribirse.

Como se usa en el presente documento, el término "multicistrónico" o "vector multicistrónico" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que tiene dos o más marcos de lectura abiertos (por ejemplo, genes). En este contexto, un marco de lectura abierto es una secuencia de codones traducible en un polipéptido o proteína (por ejemplo, una cadena pesada o una cadena ligera). "Bicistrónico" o "vector bicistrónico" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que tiene dos marcos abiertos de lectura (por ejemplo, genes). En este contexto, un marco de lectura abierto es una secuencia de codones traducible a un polipéptido o proteína (por ejemplo, una cadena pesada o una cadena ligera). En ciertos aspectos, la construcción de la descripción es una construcción multicistrónica (por ejemplo., bicistrónica) (por ejemplo., que comprende una cadena pesada y una cadena ligera).

Un "vector viral" se refiere a un vector creado a partir de al menos parte de un genoma viral que puede usarse para transportar o entregar una o más regiones

polinucleotídicas que codifican o comprenden una molécula de interés, por ejemplo, una proteína, un péptido y un oligonucleótido o una pluralidad de ellos. Los vectores virales pueden usarse para introducir materiales genéticos en las células. Los vectores virales pueden modificarse para aplicaciones específicas. En ciertos aspectos, el vector de administración de la descripción es un vector viral seleccionado del grupo que consiste en un vector viral adeno-asociado (AAV), un vector adenoviral, un vector lentiviral o un vector retroviral.

El término "vector de virus adeno-asociado" o "vector AAV", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier vector que comprenda o derive de componentes de un vector adeno-asociado y sea adecuado para infectar células de mamíferos, preferentemente células humanas. El término vector AAV designa típicamente una partícula viral o virión de tipo AAV que comprende una carga útil. El vector AAV puede derivarse de varios serotipos, incluyendo combinaciones de serotipos (es decir, AAV "pseudotipados") o de varios genomas (por ejemplo, monocatenarios o autocomplementarios). Además, el vector AAV puede ser de replicación defectuosa y/o dirigida. Como se usa en el presente documento, el término "virus adeno-asociado" (AAV) incluye, entre otros, AAV de tipo 1, AAV de tipo 2, AAV de tipo 3 (incluidos los tipos 3A y 3B), AAV de tipo 4, AAV de tipo 5, AAV de tipo 6, AAV de tipo 7, AAV de tipo 8, AAV de

tipo 9, AAV de tipo 10, AAV de tipo 11, AAV de tipo 12, AAV de tipo 13, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh.74, AAV serpiente, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, AAV caprino, AAV camarón, los serotipos y clados de AAV descritos por Gao *et al*. (J. Virol. 78:6381 (2004)) y Moris *et al*. (Virol. 33:375 (2004)), y cualquier otro AAV conocido ahora o descubierto posteriormente. Véase, por ejemplo, FIELDS *et al*. VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers). En ciertos aspectos, un "vector AAV" incluye un derivado de un vector AAV conocido. En ciertos aspectos, un "vector AAV" incluye un vector AAV modificado o artificial (por ejemplo, AAV miotrópico como AAVMYO (véase Weinmann *et al*. Nat. Comm. 11: 5432, 2020)). Los términos "genoma AAV" y "vector AAV" pueden usarse indistintamente. En ciertos aspectos, el vector AAV se modifica en relación con la secuencia de serotipo AAV de tipo salvaje.

Como se usa en el presente documento, una "partícula AAV" es un virus AAV que comprende un genoma de vector AAV que tiene al menos una región de carga útil (por ejemplo, un polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) que codifica una proteína o péptido terapéutico) y al menos una región de repetición terminal invertida (ITR). En ciertos aspectos, los términos "vectores AAV de la presente descripción" o "vectores AAV" se refieren a vectores AAV que comprenden un polinucleótido (por ejemplo, un casete de

expresión de anticuerpo) que codifica un anticuerpo, por ejemplo, encapsulado en una partícula AAV.

Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" una molécula concreta (por ejemplo, una proteína terapéutica o un péptido) es un ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) o se traduce (en el caso del ARNm) en polipéptido, *in vitro* o *in vivo*, cuando se une de forma operativa a una secuencia reguladora adecuada, como un promotor. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de inicio en el extremo 5′ (amino) y un codón de detención de la traducción en el extremo 3′ (carboxi). Una secuencia codificante puede incluir, entre otras, ADNc de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o eucariota y secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción se situará normalmente 3′ a la secuencia codificante.

El término "derivado de", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un componente que está aislado de una molécula u organismo especificado, o fabricado usando esta molécula u organismo, o información (por ejemplo, secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos) de la molécula u organismo especificado. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un vector AVV) que se deriva de una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, otro vector AVV) puede incluir una secuencia de nucleótidos que es idéntica

o sustancialmente similar a la secuencia de nucleótidos de la segunda secuencia de ácido nucleico.

En el caso de un polinucleótido descrito en el presente documento, las especies derivadas pueden obtenerse, por ejemplo, mediante mutagénesis natural, mutagénesis artificial dirigida o mutagénesis artificial aleatoria. La mutagénesis usada para derivar polinucleótidos puede ser intencionadamente dirigida o intencionadamente aleatoria, o una mezcla de ambas. La mutagénesis de un polinucleótido para crear un polinucleótido diferente derivado del primero puede ser un evento aleatorio (por ejemplo, causado por la infidelidad de la polimerasa) y la identificación del polinucleótido derivado puede realizarse mediante métodos de cribado apropiados.

Como se usa en el presente documento, el término "mutación" hace referencia a cualquier cambio en la estructura de un gen, que da lugar a una forma variante (también denominada "mutante") que puede transmitirse a las generaciones posteriores. Las mutaciones en un gen pueden estar causadas por la alternancia de una sola base en el ADN, o por la deleción, inserción o reordenación de secciones más grandes de genes o cromosomas.

Como se usa en el presente documento, el término "administración" se refiere a la administración de una composición de la presente descripción (por ejemplo, un

polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), un vector AAV, una partícula rAAV o una composición descrita en el presente documento) a un sujeto o sistema. La administración a un sujeto animal (por ejemplo, a un ser humano) puede realizarse por cualquier vía apropiada, como por ejemplo, pero sin limitarse a, inyección periorbital, retrobulbar, intralinfática y/o intramuscular.

Como se usa en el presente documento, el término "modificado" se refiere a un cambio de estado o estructura de una molécula de la descripción. Las moléculas pueden modificarse de muchas maneras, incluyendo química, estructural y funcionalmente. En ciertos aspectos, la modificación es relativa a una molécula de referencia de tipo salvaje.

Como se usa en el presente documento, el término "sintético" significa producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. La síntesis de polinucleótidos o polipéptidos u otras moléculas de la presente descripción puede ser química o enzimática.

"Ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente en la presente solicitud. Estos términos se refieren únicamente a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, estos términos incluyen el ADN de cadena doble y simple, así como el ARN de cadena doble y simple. Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido", tal y como se usan en el

presente documento, se definen como una molécula que comprende dos o más nucleósidos unidos covalentemente, tal y como lo entiende generalmente el experto. Tales nucleósidos unidos covalentemente también pueden denominarse moléculas de ácido nucleico u oligómeros. Los polinucleótidos pueden fabricarse de forma recombinante, enzimática o sintética, por ejemplo, mediante síntesis química en fase sólida seguida de purificación. Cuando se hace referencia a una secuencia del polinucleótido o ácido nucleico, se hace referencia a la secuencia u orden de las moléculas nucleobásicas, o modificaciones de las mismas, de los nucleótidos o nucleósidos enlazados covalentemente.

El término "ARNm", como se usa en el presente documento, se refiere a un ARN monocatenario que codifica la secuencia de aminoácidos de una o más cadenas polipeptídicas.

El término "antisentido", como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico que es suficientemente complementario a todo o parte de un gen, transcrito primario o ARNm procesado, como para interferir con la expresión del gen endógeno. Los polinucleótidos "complementarios" son aquellos capaces de emparejarse según las reglas estándar de complementariedad Watson-Crick. En concreto, las purinas se emparejarán con las pirimidinas para formar una combinación de guanina emparejada con citosina (G:C) y adenina emparejada con timina (A:T) en el caso del ADN, o

adenina emparejada con uracilo (A:U) en el caso del ARN. Se entiende que dos polinucleótidos pueden hibridarse entre sí aunque no sean completamente complementarios entre sí, siempre que cada uno tenga al menos una región que sea sustancialmente complementaria de la otra.

Los términos "cadena antisentido" y "cadena guía" se refieren a la cadena de un ARNds, por ejemplo, un ARNsh que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia objetivo, por ejemplo, ARNm. La cadena antisentido tiene una secuencia suficientemente complementaria a la secuencia de ARNm objetivo deseada para dirigir el silenciamiento específico de la objetivo, por ejemplo, complementariedad suficiente para desencadenar la destrucción del ARNm objetivo deseado por la maquinaria o proceso de ARNi.

Los términos "cadena sentido" y "cadena pasajera", tal como se usan en el presente documento, se refieren a la cadena de un ARNds, por ejemplo, un ARNsh que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la cadena antisentido tal como se define tal término en el presente documento. Las cadenas antisentido y sentido de un ARNds, por ejemplo, un ARNsh, se hibridan para formar una estructura dúplex.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" abarca tanto un "polipéptido" en singular como "polipéptidos" en plural, y comprende cualquier cadena o

cadenas de dos o más aminoácidos. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, un "péptido", una "subunidad peptídica", una "proteína", una "cadena de aminoácidos", una "secuencia de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen en la definición de "polipéptido", aunque cada uno de estos términos pueda tener un significado más específico. El término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o indistintamente con, cualquiera de estos términos. El término incluye además polipéptidos que han sufrido modificaciones post-traduccionales o post-síntesis, por ejemplo, conjugación de un grupo palmitoilo, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos no naturales. El término "péptido", tal como se usa en el presente documento, abarca péptidos de longitud completa y fragmentos, variantes o derivados de los mismos. Un "péptido", tal como se describe en el presente documento, puede formar parte de un polipéptido de fusión que comprenda componentes adicionales como, por ejemplo, un dominio Fc o un dominio albúmina, para aumentar la semivida. Un péptido como el descrito en el presente documento también puede derivatizarse de diferentes maneras. Un péptido descrito en el presente documento puede incluir modificaciones como, por ejemplo, la conjugación de un grupo palmitoilo.

Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una objetivo, como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. En el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada, siempre que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada.

Un anticuerpo puede pertenecer a cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), según la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las distintas clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas como toxinas, radioisótopos, etc.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto. Un "fragmento de unión a

antígeno", "dominio de unión a antígeno" o "región de unión a antígeno" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto que se une a un antígeno. Un fragmento de unión a antígeno puede contener un sitio de reconocimiento de antígeno de un anticuerpo intacto (por ejemplo, regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) suficientes para unirse al antígeno). Ejemplos de fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv, anticuerpos lineales y anticuerpos de cadena simple (por ejemplo, nanocuerpos). Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede derivarse de cualquier especie animal, como roedores (por ejemplo, ratón, rata o hámster) y humanos, o puede producirse artificialmente.

El término "nanocuerpo" o "nanocuerpos" o "anticuerpo de dominio único" o "sdAb" se refiere a una clase de fragmentos de unión a antígeno que es una molécula de inmunoglobulina de cadena única que consta de un dominio de anticuerpo variable monomérico, que reconoce y se une específicamente a un antígeno.

El término anticuerpo "monoclonal" o fragmento de unión a antígeno del mismo se refiere a una población homogénea de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno implicados en el reconocimiento y unión altamente específicos de un único determinante antigénico, o epítopo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que suelen incluir diferentes

anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término anticuerpo "monoclonal" o fragmento de unión a antígeno del mismo abarca tanto anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa como fragmentos de anticuerpos (como Fab, Fab', F(ab')2, Fv), mutantes de cadena única (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, un anticuerpo "monoclonal" o un fragmento de unión a antígeno del mismo se refiere a tales anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos fabricados de cualquier manera, incluyendo pero sin limitarse a, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

El término "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" o fragmento de unión a antígeno del mismo se refiere a un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/luz diferentes y dos sitios de unión distintos. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por diversos métodos, incluida la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

El término "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades para más de dos

epítopos diferentes, normalmente epítopos no solapados o un anticuerpo que contiene más de dos sitios distintos de unión a antígenos.

El término "inmunoglobulina" se usa aquí para incluir anticuerpos, fragmentos funcionales de los mismos, Fabs, scFvs, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, nanocuerpos), DARTs, F(ab')2, BITEs, e inmunoadhesinas. Estos fragmentos de anticuerpos o construcciones artificiales pueden incluir un anticuerpo de cadena simple, un fragmento Fab, un anticuerpo univalente, un anticuerpo bivalente o multivalente, o una inmunoadhesina. La construcción de anticuerpo de unión o neutralizante puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo "humanizado", un anticuerpo multivalente u otra construcción adecuada. Una "molécula de inmunoglobulina" es una proteína que contiene las porciones inmunológicamente activas de una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina covalentemente acopladas y capaces de combinarse específicamente con un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina son de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" pueden usarse indistintamente en el presente documento. Una "inmunoglobulina de cadena pesada" es un polipéptido que contiene al menos una parte del dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina y al menos una parte

de una región variable de una inmunoglobulina de cadena pesada. Así, la cadena pesada derivada de inmunoglobulina tiene regiones significativas de homología de secuencia de aminoácidos con un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. Por ejemplo, la cadena pesada de un fragmento Fab es una cadena pesada derivada de inmunoglobulina. Una "cadena ligera de inmunoglobulina" es un polipéptido que contiene al menos una parte del dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina y al menos una parte de la región variable. Así, la cadena ligera derivada de la inmunoglobulina tiene regiones significativas de homología de aminoácidos con un miembro de la superfamilia de genes de la inmunoglobulina. Una "inmunoadhesina" es una molécula quimérica, similar a un anticuerpo, que combina el dominio funcional de una proteína de unión, normalmente un receptor, ligando, molécula de adhesión celular, o 1-2 dominios variables de inmunoglobulina con dominios constantes de inmunoglobulina, incluyendo normalmente la bisagra o enlazador GS y las regiones Fc. Un "fragmento de unión a antígeno" (Fab) es una región de un anticuerpo que se une a antígenos. Se compone de un dominio constante y otro variable de cada una de las cadenas pesada y ligera. Con respecto a las inmunoglobulinas o anticuerpos descritos en el presente documento, cada fragmento de una secuencia de codificación de inmunoglobulina puede derivarse de una o más fuentes, o sintetizarse. Los fragmentos adecuados

pueden incluir la región codificante para una o más de, por ejemplo, una cadena pesada, una cadena ligera, y/o fragmentos de las mismas tales como la región constante o variable de una cadena pesada (CH1, CH2 y/o CH3) y/o o la región constante o variable de una cadena ligera. Alternativamente, pueden usarse regiones variables de una cadena pesada o ligera. Cuando proceda, estas secuencias pueden modificarse a partir de las secuencias "nativas" de las que derivan, como se describe en el presente documento. En el presente documento, el término "construcción de inmunoglobulina" se refiere a cualquiera de las inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina anteriores codificados e incluidos en los casetes de expresión y vectores virales descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, los términos "región variable" o "dominio variable" se usan indistintamente y son comunes en la técnica. La región variable se refiere típicamente a una porción de un anticuerpo, generalmente, una porción de una cadena ligera o pesada, típicamente aproximadamente los 110 a 120 aminoácidos aminoterminales o 110 a 125 aminoácidos en la cadena pesada madura y aproximadamente 90 a 115 aminoácidos en la cadena ligera madura, que difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en las regiones denominadas regiones

determinantes de la complementariedad (CDR), mientras que las regiones más conservadas del dominio variable se denominan regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Sin querer ceñirnos a ningún mecanismo o teoría en particular, se cree que las CDR de las cadenas ligera y pesada son las principales responsables de la interacción y especificidad del anticuerpo con el antígeno. En ciertos aspectos, la región variable es una región variable humana. En ciertos aspectos, la región variable comprende CDR de roedores o murinos y regiones marco (FR) humanas. En ciertos aspectos, la región variable es una región variable de primate (por ejemplo, primate no humano). En ciertos aspectos, la región variable comprende CDR de roedor o murino y regiones marco (FR) de primate (por ejemplo, primate no humano).

Los términos "VL" y "dominio VL" se usan indistintamente para referirse a la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo.

Los términos "VH" y "dominio VH" se usan indistintamente para referirse a la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

Las regiones VH y VL pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de

amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedero, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "numeración de Kabat" y términos similares son reconocidos en la técnica y se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, las CDR pueden determinarse según el sistema de numeración de Kabat (véase, por ejemplo, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 y Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH No. 91-3242). Usando el sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena pesada de anticuerpo están presentes típicamente en las posiciones de aminoácidos 31 a 35, que opcionalmente pueden incluir uno o dos aminoácidos adicionales, a continuación de 35 (denominados en el esquema de numeración de Kabat 35A y 35B) (CDR1), posiciones de aminoácidos 50 a 65 (CDR2), y posiciones de aminoácidos 95 a 102 (CDR3). Usando el

sistema de numeración de Kabat, las CDR dentro de una molécula de cadena ligera de anticuerpo están presentes típicamente en las posiciones de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), las posiciones de aminoácidos 50 a 56 (CDR2), y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 (CDR3). En ciertos aspectos, las CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento se han determinado según el esquema de numeración de Kabat.

Como se usa en el presente documento, los términos "región constante" o "dominio constante" son intercambiables y tienen el significado habitual en la técnica. La región constante es una porción de anticuerpo, por ejemplo, una porción carboxilo terminal de una cadena ligera y/o pesada que no está directamente implicada en la unión de un anticuerpo al antígeno pero que puede exhibir diversas funciones efectoras, como la interacción con el receptor Fc. La región constante de una molécula de inmunoglobulina suele tener una secuencia de aminoácidos más conservada que el dominio variable de una inmunoglobulina. En ciertos aspectos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante o porción de la misma que es suficiente para la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC).

Como se usa en el presente documento, el término "cadena pesada" o "HC" cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, por ejemplo, alfa (α), delta (δ), épsilon (ε), gamma (γ) y mu (μ),

basados en la secuencia de aminoácidos del dominio constante, que dan lugar a las clases de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluidas las subclases de IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada son bien conocidas en la técnica. En ciertos aspectos, la cadena pesada es una cadena pesada humana.

Como se usa en el presente documento, el término "cadena ligera" o "LC" cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, por ejemplo, kappa (κ) o lambda (λ) basado en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera son bien conocidas en la técnica. En ciertos aspectos, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

Una "región Fc" (fragmento de región cristalizable) o "dominio Fc" o "Fc" se refiere a la región terminal C de la cadena pesada de un anticuerpo que media la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedero, incluida la unión a receptores Fc situados en diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) o al primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

Una "región Fc de secuencia nativa" o "Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de

secuencia nativa incluyen una región Fc IgG1 humana de secuencia nativa; una región Fc IgG2 humana de secuencia nativa; una región Fc IgG3 humana de secuencia nativa; y una región Fc IgG4 humana de secuencia nativa, así como sus variantes naturales. La secuencia nativa Fc incluye los diversos alotipos de Fc (véase, por ejemplo, Jefferis *et al*., (2009) mAbs 1:1; Vidarsson G. *et al*. Front Immunol. 5:520 (publicado en línea el 20 de octubre de 2014)).

Un "receptor Fc" o "FcR" es un receptor que se une a la región Fc de una inmunoglobulina. Los FcR que se unen a un anticuerpo IgG comprenden receptores de la familia FcγR, incluidas las variantes alélicas y las formas empalmadas alternativamente de estos receptores. La familia FcγR consta de tres receptores activadores (FcγRI, FcγRIII y FcγRIV en ratones; FcγRIA, FcγRIIA y FcγRIIIA en humanos) y un receptor inhibidor (FcγRIIB). La IgG1 humana se une a la mayoría de los receptores Fc humanos y provoca las funciones efectoras Fc más potentes. Se considera equivalente a la IgG2a murina con respecto a los tipos de receptores Fc activadores a los que se une. Por el contrario, la IgG4 humana provoca las funciones efectoras Fc menos potentes. Vidarsson G. *et al*. Front Immunol. 5:520 (publicado en línea el 20 de octubre de 2014).

La región constante puede manipularse, por ejemplo, mediante tecnología recombinante, para eliminar una o más funciones efectoras. Una "función efectora" se refiere a la

interacción de la región Fc de un anticuerpo con un receptor Fc o ligando, o a un acontecimiento bioquímico resultante. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión a C1q, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la unión al receptor Fc, las funciones efectoras mediadas por FcγR como ADCC y la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés), y la regulación descendente de un receptor de superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B; BCR). Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo). En consecuencia, el término "una región constante sin la función Fc" incluye regiones constantes con funciones efectoras reducidas o sin una o más funciones efectoras mediadas por la región Fc.

Las funciones efectoras de un anticuerpo pueden reducirse o evitarse mediante diferentes enfoques. Las funciones efectoras de un anticuerpo pueden reducirse o evitarse usando fragmentos de anticuerpo que carezcan de la región Fc (por ejemplo, como un Fab, F(ab')2, Fv de cadena simple (scFv) o un sdAb que consista en un dominio VH o VL monomérico). Alternativamente, los llamados anticuerpos aglicosilados pueden generarse eliminando azúcares que están unidos a residuos particulares en la región Fc para reducir las funciones efectoras de un anticuerpo mientras se conservan

otros atributos valiosos de la región Fc (por ejemplo, semivida prolongada y heterodimerización). Los anticuerpos aglicosilados pueden generarse, por ejemplo, suprimiendo o alterando el residuo al que está unido el azúcar, eliminando los azúcares enzimáticamente, produciendo el anticuerpo en células cultivadas en presencia de un inhibidor de la glicosilación, o expresando el anticuerpo en células incapaces de glicosilar proteínas (por ejemplo, células hospederas bacterianas). Véase, por ejemplo, Pub. EE.UU. No. 20120100140. Otro enfoque consiste en emplear regiones Fc de una subclase de IgG que tengan una función efectora reducida. Por ejemplo, los anticuerpos IgG2 e IgG4 se caracterizan por tener niveles más bajos de funciones efectoras Fc que IgG1 e IgG3. Los residuos más proximales a la región bisagra en el dominio CH2 de la parte Fc son responsables de las funciones efectoras de los anticuerpos, ya que contiene un sitio de unión que se solapa en gran medida para C1q (complemento) y los receptores IgG-Fc (FcγR) en las células efectoras del sistema inmunitario innato. Vidarsson G. *et al*. Front Immunol. 5:520 (publicado en línea el 20 de octubre de 2014). En consecuencia, pueden prepararse anticuerpos con funciones efectoras Fc reducidas o sin ellas generando, por ejemplo, una región Fc quimérica que comprenda un dominio CH2 de un anticuerpo IgG del isotipo IgG4 y un dominio CH3 de un anticuerpo IgG del isotipo IgG1, o una región Fc quimérica que comprenda región bisagra de IgG2 y

región CH2 de IgG4 (véase, por ejemplo, Lau C. *et al*. J. Immunol. 191:4769-4777 (2013)), o una región Fc con mutaciones que dan lugar a funciones efectoras Fc alteradas, por ejemplo, funciones Fc reducidas o inexistentes. Tales regiones Fc con mutaciones son conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Pub. EE.UU. No. 20120100140 y las solicitudes de EE.UU. y PCT citadas en la misma y An *et al*., mAbs 1:6, 572-579 (2009); cuyas descripciones se incorporan por referencia en su totalidad.

En ciertos aspectos, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmento de unión a antígeno del mismo puede modificarse para que no se una a la región Fc. Véase, por ejemplo, Saunders K., Front. Immunol., 10:1296 (2019).

Una "bisagra", "dominio bisagra", "región bisagra" o "región bisagra del anticuerpo" se usan indistintamente y se refieren al dominio de una región constante de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2 e incluye los fragmentos superior, medio e inferior de la bisagra (Roux *et al*., J. Immunol. 1998 161:4083). La bisagra proporciona diversos niveles de flexibilidad entre las regiones de unión y efectoras de un anticuerpo y también proporciona sitios para la unión disulfuro intermolecular entre las dos regiones constantes de cadena pesada.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgG1, IgG2,

IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD y anticuerpo IgE) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tengan diferentes antígenos. Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítopo de una proteína puede tener reactividad cruzada con otras proteínas correspondientes de especies diferentes.

El término anticuerpos "quiméricos" o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en los que la secuencia de aminoácidos deriva de dos o más especies. Normalmente, la región variable de las cadenas ligeras y pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno derivados de otra especie (normalmente humana) para evitar provocar una respuesta

inmunitaria en esa especie.

El término anticuerpo "humanizado" o fragmento de unión a antígeno del mismo se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) o fragmentos de unión a antígeno que son cadenas de inmunoglobulina específicas, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos de las mismas que contienen secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, murinas). Normalmente, los anticuerpos humanizados o sus fragmentos de unión a antígeno son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se sustituyen por residuos de las CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas ("CDR injertadas") (Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988)). En ciertos aspectos, un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Ejemplos de métodos usados para generar anticuerpos humanizados se describen en U.S. Pat. 5.225.539; Roguska *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994), y Roguska *et al.*, Protein Eng. 9(10):895-904 (1996). En ciertos aspectos, un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo resurgido.

El término anticuerpo "humano" (HuMAb) o fragmento de unión a antígeno del mismo significa un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo con una secuencia de aminoácidos derivada de un locus genético de inmunoglobulina humana, donde tal anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se fabrica usando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye anticuerpos intactos o de longitud completa y fragmentos de los mismos. En ciertos aspectos, un anticuerpo humano es un anticuerpo totalmente humano, es decir, el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos derivada de un locus genético de inmunoglobulina humana y no contiene secuencia de aminoácidos de un locus genético de inmunoglobulina no humana. En ciertos aspectos, un anticuerpo humano es un anticuerpo parcialmente humano, es decir, el anticuerpo tiene secuencias de aminoácidos que derivan de un locus génico de inmunoglobulina humana y secuencias de aminoácidos que derivan de un locus génico de inmunoglobulina no humana. En ciertos aspectos, un anticuerpo humano es un anticuerpo totalmente humano, parcialmente humano o humanizado. En ciertos aspectos, un anticuerpo humano es un anticuerpo humano quimérico, es decir, el anticuerpo tiene aproximadamente una cantidad similar de secuencias de aminoácidos derivadas de un locus genético de inmunoglobulina humana y secuencias de aminoácidos derivadas de un locus

genético de inmunoglobulina no humana.

Un anticuerpo que es "bloqueante" o que "bloquea" o que es "inhibitorio" de que "inhibe" es un anticuerpo que reduce o inhibe (parcial o completamente) la unión de su proteína objetivo a uno o más ligandos cuando el anticuerpo está unido a la proteína objetivo, y/o que reduce o inhibe (parcial o completamente) una o más actividades o funciones de la proteína objetivo cuando el anticuerpo está unido a la proteína objetivo.

Como se usa en el presente documento, un "epítopo" es un término de la técnica y se refiere a una región localizada de un antígeno a la que puede unirse específicamente un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Un epítopo puede ser, por ejemplo, aminoácidos contiguos de un polipéptido (epítopo lineal o contiguo) o un epítopo puede, por ejemplo, provenir de dos o más regiones no contiguas de un polipéptido o polipéptidos (epítopo conformacional, no lineal, discontinuo o no contiguo. El término "mapeo de epítopos" se refiere al proceso de identificación de los determinantes moleculares para el reconocimiento anticuerpo-antígeno.

La frase "entrar en contacto con una célula" (por ejemplo., entrar en contacto con una célula con un polinucleótido (por ejemplo., un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición de la descripción) como se usa en el presente documento, incluye

entrar en contacto con una célula directa o indirectamente. En ciertos aspectos, el contacto de una célula con un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición incluye el contacto de una célula *in vitro* con un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición o el contacto de una célula *in vivo* con un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición. Así, por ejemplo, el polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula rAAV o la composición pueden ser puestos en contacto físico con la célula por la persona que realiza el método, o alternativamente, el polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula rAAV o la composición pueden ponerse en una situación que permita o haga que posteriormente entren en contacto con la célula.

En ciertos aspectos, el contacto con una célula *in vitro* puede realizarse, por ejemplo, incubando la célula con el polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición. En ciertos aspectos, el contacto con una célula *in vivo* puede realizarse, por ejemplo, inyectando el polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición de la descripción en o cerca del tejido en el que se encuentra la célula (por ejemplo, retrobulbar, periorbital o músculo

ocular), o inyectando el polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula de rAAV o la composición en otra zona, por ejemplo, el torrente sanguíneo o el espacio subcutáneo, de modo que el agente alcance posteriormente el tejido en el que se encuentra la célula que se desea contactar. Por ejemplo, el genoma del vector AAV puede encapsularse y/o acoplarse a un ligando que dirija el genoma del vector AAV a un sitio de interés. También son posibles combinaciones de métodos de contacto *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, una célula puede ponerse en contacto *in vitro* con un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición de la descripción y posteriormente trasplantarse a un sujeto.

En ciertos aspectos, el contacto de una célula con un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición de la descripción incluye "introducir" o "suministrar" (directa o indirectamente) el polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición en la célula facilitando o efectuando la captación o absorción en la célula. La introducción de un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula rAAV o composición en una célula puede realizarse *in vitro* y/o *in vivo*. Por ejemplo, para la introducción *in vivo*, un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula rAAV o

composición puede inyectarse en un sitio tisular específico (por ejemplo, el locus donde se desea un efecto terapéutico) o administrarse sistémicamente (por ejemplo, administrar un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector o partícula rAAV dirigido a un locus donde se desea un efecto terapéutico). La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en la técnica, como la electroporación y la lipofección.

Como se usan en el presente documento, los términos "cantidad eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad suficiente" de, por ejemplo, un polinucleótido, casete de expresión, vector, partícula de rAAV o composición de la descripción se refieren a una cantidad suficiente para, cuando se administra al sujeto, incluido un ser humano, producir resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos, y, como tal, una "cantidad eficaz" o sinónimo de la misma depende del contexto en el que se aplica. En ciertos aspectos, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente (por ejemplo, un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición descrita en el presente documento) es una cantidad que produce un resultado beneficioso o deseado en un sujeto en comparación con un control.

La cantidad de un agente dado (por ejemplo, un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), un

vector, una partícula de rAAV o una composición de la descripción) que corresponderá a esta cantidad variará en función de diversos factores, como el agente dado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto (por ejemplo, edad, sexo y/o peso) u hospedero que se esté tratando, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "terapia génica" se refiere a la inserción de secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos que comprende un promotor enlazado operablemente a un ácido nucleico que codifica una molécula terapéutica, tal como se describe en el presente documento) en las células y/o tejidos de un individuo para tratar, reducir los síntomas o reducir la probabilidad de una enfermedad. La terapia génica también incluye la inserción de transgenes de naturaleza inhibidora, es decir, que inhiben, disminuyen o reducen la expresión, actividad o función de un gen o proteína endógenos, como un gen o proteína indeseables o aberrantes (por ejemplo, patógenos). Tales transgenes pueden ser exógenos. Se entiende por molécula o secuencia exógena aquella que no se encuentra normalmente en la célula, tejido y/o individuo a tratar. Tanto las enfermedades adquiridas como las congénitas son susceptibles de terapia génica.

El término "cantidad profilácticamente eficaz", tal

como se usa en el presente documento, incluye la cantidad de un agente (por ejemplo, un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición descrita en el presente documento) que, cuando se administra a un sujeto que tiene o está predispuesto a tener una enfermedad o trastorno (por ejemplo, orbitopatía de Graves). La mejoría de la enfermedad o trastorno incluye la ralentización del curso de la enfermedad o trastorno o la reducción de la gravedad de la enfermedad o trastorno de desarrollo posterior. La "cantidad profilácticamente eficaz" puede variar en función de las características del agente, por ejemplo, un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición de la descripción, cómo se administra el agente, el grado de riesgo de enfermedad y los antecedentes, edad, peso, antecedentes familiares, composición genética, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si los hubiera, y otras características individuales del paciente que se va a tratar.

Como se usa en el presente documento, "fuera de objetivo" se refiere a cualquier efecto no deseado sobre uno o más objetivos, genes o transcritos celulares.

Como se usa en el presente documento, el término "*in vitro*" se refiere a acontecimientos que tienen lugar en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en un cultivo celular, en una placa de

Petri, etc., en lugar de dentro de un organismo (por ejemplo, animal, vegetal o microbio).

Como se usa en el presente documento, el término "*in vivo*" se refiere a acontecimientos que ocurren dentro de un organismo (por ejemplo, un animal, una planta o un microbio o una célula o tejido del mismo).

Como se usa en el presente documento, el término "transfección" hace referencia a los métodos para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula. Los métodos de transfección incluyen, entre otros, métodos químicos, tratamientos físicos y lípidos catiónicos o mezclas. La lista de agentes que pueden transfectarse en una célula es amplia e incluye, por ejemplo, ARNsi, ARNsh, secuencias sentido y/o antisentido, ADN que codifica uno o más genes y se organiza en un plásmido de expresión, por ejemplo, un vector.

Por "determinar el nivel de una proteína" se entiende la detección de una proteína, o de un ARNm que codifica la proteína, por métodos conocidos en la técnica, ya sea directa o indirectamente. Por "determinación directa" se entiende la elaboración de un proceso (por ejemplo, la elaboración de un ensayo o prueba en una muestra o el "análisis de una muestra", tal como se define este término en el presente documento) para obtener la entidad física o el valor. "Determinar indirectamente" se refiere a recibir la entidad física o el valor de otra parte o fuente (por ejemplo, un laboratorio de

terceros que adquirió directamente la entidad física o el valor). Los métodos para medir el nivel de proteína generalmente incluyen, pero no se limitan a, western blotting, immunoblotting, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés), inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, resonancia de plasmón de superficie, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida (LC)-espectrometría de masas, microcitometría, microscopía, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) y citometría de flujo, así como ensayos basados en una propiedad de una proteína, incluyendo, pero sin limitarse a, la actividad enzimática o la interacción con otras proteínas asociadas. Los métodos para medir los niveles de ARNm son conocidos en la técnica.

El "Porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a una secuencia polinucleotídica o polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de ácidos nucleicos o aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los ácidos nucleicos o aminoácidos de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para alcanzar el máximo

porcentaje de identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos puede lograrse de varias maneras que están dentro de las capacidades de un experto en la materia, por ejemplo, usando software de computadora disponible públicamente como BLAST, BLAST-2 o Megalign. Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, los valores porcentuales de identidad de secuencias pueden generarse usando el programa de computadora de comparación de secuencias BLAST.

Por "nivel" se entiende un nivel o actividad de una proteína, o ARNm que codifica la proteína, opcionalmente en comparación con una referencia. La referencia puede ser cualquier referencia útil, tal como se define en el presente documento. Por "nivel disminuido" o "nivel aumentado" de una proteína se entiende una disminución o aumento del nivel de proteína, en comparación con una referencia. El nivel de una proteína puede expresarse en masa/vol (por ejemplo, g/dl, mg/ml, µg/ml, ng/ml) o porcentaje relativo a la proteína total o ARNm en una muestra.

El término "composición farmacéutica", tal como se usa en el presente documento, representa una composición que comprende un compuesto o molécula descrito en el presente

documento, por ejemplo, un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), vector o partícula de rAAV descrito en el presente documento, formulado con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y puede fabricarse o venderse con la aprobación de una agencia reguladora gubernamental como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento de una enfermedad en un mamífero.

Un "excipiente farmacéuticamente aceptable", tal como se usa aquí, se refiere a cualquier ingrediente distinto de los compuestos descritos aquí (por ejemplo, un vehículo capaz de suspender o disolver el compuesto activo) y que tiene las propiedades de ser sustancialmente no tóxico y no inflamatorio en un paciente.

Por "referencia" se entiende cualquier referencia útil usada para comparar los niveles o la actividad de proteínas o ARNm. La referencia puede ser cualquier muestra, estándar, curva estándar o nivel que se utilice con fines comparativos. La referencia puede ser una muestra de referencia normal o un estándar o nivel de referencia. Una "muestra de referencia" puede ser, por ejemplo, un control, por ejemplo, un valor de control negativo predeterminado como un "control normal" o una muestra previa tomada del mismo sujeto; una muestra de un sujeto sano normal, como una célula normal o un tejido normal; una muestra (por ejemplo, una célula o tejido) de un sujeto que no padece una enfermedad; una muestra de un

sujeto al que se le ha diagnosticado una enfermedad, pero que aún no ha sido tratado con un compuesto descrito en el presente documento; una muestra de un sujeto que ha sido tratado con un compuesto descrito en el presente documento; o una muestra de una proteína purificada (por ejemplo, cualquiera de las descritas en el presente documento) a una concentración normal conocida.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier organismo al que puede administrarse una composición descrita en el presente documento, por ejemplo, un polinucleótido (un casete de expresión de anticuerpos), un vector, una partícula de rAAV o una composición de la presente descripción, por ejemplo, con fines experimentales, diagnósticos, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen cualquier animal (por ejemplo, mamíferos como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y seres humanos). Un sujeto puede buscar o necesitar tratamiento, requerir tratamiento, estar recibiendo tratamiento, recibir tratamiento en el futuro, o ser un humano o animal que está bajo el cuidado de un profesional capacitado para una enfermedad o condición particular.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "tratado" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas cuyo objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir)

una afección fisiológica, trastorno o enfermedad no deseados, u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. En ciertos aspectos, el tratamiento reduce o disminuye los síntomas asociados a una enfermedad o trastorno. En ciertos aspectos, el tratamiento produce un resultado clínico beneficioso o deseado.

En el presente documento, la "orbitopatía de Graves" (GO) se refiere a las fases activas o crónicas de una afección autoinmune orbital inflamatoria asociada al tiroides. La GO "activa" o "dinámica" puede durar aproximadamente 6 meses y hasta 24 meses y puede ir seguida de una GO "inactiva" o "crónica".

Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, el alivio de los síntomas; la disminución de la extensión de una afección, trastorno o enfermedad; la estabilización (es decir, no empeoramiento) de la afección, trastorno o enfermedad; retraso en la aparición o ralentización de la afección, trastorno o progresión de la enfermedad; mejora de la afección, trastorno o enfermedad o remisión (parcial o total), detectable o indetectable; mejora de al menos un parámetro físico medible, no necesariamente perceptible por el paciente; o mejora de la afección, trastorno o enfermedad. En ciertos aspectos, el tratamiento incluye la obtención de una respuesta clínicamente significativa sin niveles excesivos de efectos secundarios. En ciertos aspectos,

el tratamiento incluye la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. En el presente documento, los términos "mejora" o "mejorar" se refieren a la disminución de la gravedad de al menos un indicador de una afección o enfermedad. En el presente documento, los términos "prevenir" o "prevención" se refieren a retrasar o evitar la aparición, el desarrollo o la progresión de una afección o enfermedad durante un periodo de tiempo que puede ser de semanas, meses o años.

II. Anticuerpos terapéuticos

La presente descripción proporciona polinucleótidos (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos), vectores y partículas rAAV para la administración y expresión de anticuerpos terapéuticos anti-IGF-1R a una célula o sujeto. En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende un promotor enlazado operablemente a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un receptor del factor de crecimiento-1 similar a la insulina (también denominado indistintamente en el presente documento "anticuerpo del receptor anti-IGF", "anticuerpo del receptor anti-IGF-1", "anticuerpo anti-IGF-1R" y "anticuerpo anti-IGF-1R" en el presente documento).

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo

seleccionado entre un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, o un anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, la proteína terapéutica es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre un Fab, un Fab', un F(ab')2, un fragmento Fv, un anticuerpo lineal o un anticuerpo de cadena simple (por ejemplo, un nanoanticuerpo).

En ciertos aspectos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un nanocuerpo y un anticuerpo multiespecífico.

En ciertos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos descrito en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada (HC) y/o una cadena ligera (LC). En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos descrito en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada variable (VH) y/o una cadena ligera variable (VL).

En ciertos aspectos, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo quimérico.

En ciertos aspectos, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmento de unión a antígeno del

mismo es un anticuerpo humanizado.

En ciertos aspectos, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano. En ciertos aspectos, un anticuerpo humano es un anticuerpo totalmente humano que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un locus génico de inmunoglobulina humana y no contiene secuencia de aminoácidos de un locus génico de inmunoglobulina no humana. En ciertos aspectos, un anticuerpo humano es un anticuerpo parcialmente humano que comprende las secuencias de aminoácidos que se derivan de un locus génico de inmunoglobulina humana y secuencias de aminoácidos que se derivan de un locus génico de inmunoglobulina no humana. En ciertos aspectos, un anticuerpo humano es un anticuerpo totalmente humano, parcialmente humano o humanizado. En ciertos aspectos, un anticuerpo humano es un anticuerpo humano quimérico, es decir, el anticuerpo tiene aproximadamente una cantidad similar de secuencias de aminoácidos derivadas de un locus genético de inmunoglobulina humana y secuencias de aminoácidos derivadas de un locus genético de inmunoglobulina no humana.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotumumab, VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), ganitumab (AMG 479), figitumumab, CP-751,871, cixutumumab (AMG 655), IMC-A12, dalotuzumab, MK0646, RG1507, robatumumab, SCH 717454, AVE-1642a, MEDI-573, BIIB022, rhuMab

IGFR, L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, o L52H52, o fragmentos, variantes o derivados de los mismos.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es VRDN-01100, o VRDN-02700, o fragmentos, variantes o derivados de los mismos. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR comprende SEC ID NO: 113 (correspondiente a VRDN-01100). En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR comprende SEC ID NO: 116 (correspondiente a VRDN-002700).

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotumumab, o fragmentos, variantes o derivados del mismo.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende un ácido nucleico que codifica un péptido señal unido operablemente a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un receptor del factor de crecimiento-1 similar a la insulina. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal endógeno para HGH y sus variantes; un péptido señal endógeno para interferones y sus variantes, incluyendo el péptido señal de interferones tipo I, II y III y sus variantes;

un péptido señal endógeno para citocinas conocidas y sus variantes, tales como el péptido señal de eritropoyetina (EPO), insulina, TGF-β1, TNF, IL1-α, e IL1-β, y sus variantes. En algunas modalidades, el péptido señal es un péptido señal modificado. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-2. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-10. En ciertos aspectos, el péptido señal comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 119 o 120. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NO: 121 o 122.

En ciertos aspectos, una composición que comprende un vector de administración, por ejemplo, un vector viral, que comprende ácidos nucleicos que codifican una inmunoglobulina descrita en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti-IGF-1R) es adecuada para su administración a un sujeto que la necesite.

En ciertos aspectos, un casete de expresión de anticuerpo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R puede empaquetarse en un vector viral (por ejemplo, un vector AAV) descrito en el

presente documento, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R está operablemente unida con el promotor. En ciertos aspectos, el promotor puede dirigir la expresión del anticuerpo anti-IGF-1R en una célula hospedera (por ejemplo, una célula de fibroblasto, una célula de adipocito, una célula de miofibroblasto, una célula de miocito, una célula muscular, o cualquier combinación de las mismas). En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpo), el vector, la partícula rAAV o la composición que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R puede administrarse a un tejido ocular, retrobulbar, intralinfático, periorbitario y/o muscular (por ejemplo, un músculo elevador y/o un músculo glabelar). En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpo), vector, partícula rAAV, o composición que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R puede administrarse intramuscular, intralinfática, intracutánea, intravenosa, intraocular, retrobulbar, periorbital, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpo), vector, partícula de rAAV o composición que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R puede administrarse por vía intramuscular a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, la administración es a un músculo extraocular. En ciertos

aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración es a un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpo), vector, partícula de rAAV, o composición que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R puede administrarse intralinfáticamente en un ganglio linfático preauricular y/o submandibular.

En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula rAAV o la composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra a un tejido periorbitario. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra al tejido periorbitario. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo., un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra intramuscularmente a un músculo periorbital. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de

expresión de anticuerpos), vector, partícula rAAV o composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra intramuscularmente a un músculo retrobulbar. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula rAAV o composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra intramuscularmente a un músculo facial. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula rAAV o la composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra a un tejido conjuntivo periorbitario o retroorbitario. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula rAAV o composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra intramuscularmente a un músculo elevador y/o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), vector, partícula de rAAV o composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra a un fibroblasto del tejido conjuntivo periorbitario o retroorbitario. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula rAAV o la composición que comprende el ácido nucleico que codifica el

anticuerpo anti-IGF-1R se administra a un miofibroblasto del tejido conjuntivo periorbitario o retroorbitario. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula rAAV o la composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra a un adipocito del tejido conjuntivo periorbitario o retroorbitario. En ciertos aspectos, el polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), el vector, la partícula rAAV o la composición que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R se administra a un miocito del tejido conjuntivo periorbitario o retroorbitario. En ciertos aspectos, el ácido nucleico que codifica una proteína o péptido descrito en el presente documento es adecuado para su administración a un tejido periorbitario y/o retroorbitario. En ciertos aspectos, el ácido nucleico que codifica una proteína o péptido descrito en el presente documento es adecuado para su administración a un tejido periorbitario. En ciertos aspectos, el ácido nucleico que codifica una proteína o péptido descrito en el presente documento es adecuado para la administración intramuscular a un músculo periorbital o retroorbital. En ciertos aspectos, el ácido nucleico que codifica una proteína o péptido descrito en el presente documento es adecuado para la administración intramuscular a un músculo facial. En ciertos aspectos, el ácido nucleico que

codifica una proteína o péptido descrito en el presente documento es adecuado para la administración a un tejido conectivo periorbital o retroorbital. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular.

En ciertos aspectos, los ácidos nucleicos que codifican una proteína o péptido descritos en el presente documento son adecuados para su administración a otros sitios de administración descritos en el presente documento.

II.A.1 Anticuerpos

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen a polinucleótidos (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), vectores, partículas rAAV o composiciones que comprenden el ácido nucleico que codifica anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a un receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R), tal como IGF-1R humano. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R codificado es un anti-receptor del factor-1 de crecimiento 1 similar a la insulina (anti-IGF-1R). En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R codificado comprende la secuencia de aminoácidos de teprotumumab, VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), ganitumab (AMG 479), figitumumab, CP-751,871, cixutumumab (AMG 655), IMC-

A12, dalotuzumab, MK0646, RG1507, robatumumab, SCH 717454, AVE-1642a, MEDI-573, BIIB022, rhuMab IGFR, L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, o L52H52, o fragmentos, variantes o derivados de los mismos.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R codificado comprende la secuencia de aminoácidos de VRDN-01100, o VRDN-02700, o fragmentos, variantes o derivados de los mismos.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R codificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 113 (correspondiente a VRDN-01100). En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR comprende SEC ID NO: 116 (correspondiente a VRDN-002700).

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R codificado comprende la secuencia de aminoácidos de teprotumumab, o fragmentos, variantes o derivados de la misma.

En ciertos aspectos, la descripción se dirige a polinucleótidos (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), vectores, partículas de rAAV o composiciones de la descripción que comprenden un promotor enlazado

operablemente a un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a IGF-1R.

En ciertos aspectos, los polinucleótidos (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpo), vectores, partículas de rAAV o composiciones de la descripción usados en los métodos aquí descritos codifican un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que tienen las secuencias de CDR y/o región variable de teprotumumab o anticuerpos que tienen al menos un 80% de identidad (por ejemplo, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de identidad) con sus secuencias de región variable o CDR de teprotumumab. En ciertos aspectos, la construcción de terapia génica que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo, teprotumumab) es una construcción multicistrónica (por ejemplo, bicistrónica) (por ejemplo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera). En ciertos aspectos, la construcción multicistrónica (por ejemplo, bicistrónica) comprende además un elemento F2A o IRES.

En ciertos aspectos, los polinucleótidos (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos), vectores,

partículas de rAAV o composiciones aquí descritos comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera de teprotumumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, los polinucleótidos (por ejemplo., un casete de expresión de anticuerpo), vectores, partículas de rAAV o composiciones aquí descritos comprenden secuencias de ácido nucleico que están modificadas en relación con secuencias codificantes de teprotumumab de tipo salvaje (no modificadas).

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R comprende una cadena pesada y una cadena ligera. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de las SEC ID NO: 35-37 (o una secuencia de codificación de HC descrita en la Tabla 11). En ciertos aspectos, la HC codificada comprende SEC ID NO: 38 (o la secuencia de aminoácidos de HC de la Tabla 12). En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 39-41 (o una secuencia codificante de LC descrita en la Tabla 13). En ciertos aspectos, la LC codificada comprende SEC ID NO: 42 (o la secuencia de aminoácidos de LC

de la Tabla 14).

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de las SEC ID NO: 25-27 (o una secuencia codificante de VH descrita en la Tabla 5). En ciertos aspectos, la VH codificada comprende SEC ID NO: 28 o SEC ID NO: 91 (o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de VH de la Tabla 6). En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 29-31 (o una secuencia codificante VL descrita en la Tabla 7). En ciertos aspectos, la VL codificada comprende SEC ID NO: 32 o SEC ID NO: 92 (o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de VL de la Tabla 8).

En ciertos aspectos, la cadena pesada comprende una región variable (VH) de cadena pesada que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, una CDR VH2 y una CDR VH3. En ciertos aspectos, las CDR 1-3 de la VH corresponden a las CDR del teprotumumab. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH CDR1 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 7 o 10 (o una secuencia codificante VH CDR1 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5); la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH CDR2 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 8, 11 o 14 (o una secuencia codificante VH CDR2 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5); y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH CDR3 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 9, 12 o 15 (o una secuencia codificante VH CDR3 descrita en la Tabla 3 o Tabla 5).

En ciertos aspectos, la cadena ligera comprende una región variable (VL) de cadena ligera que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, una CDR VL2 y una CDR VL3. En ciertos aspectos, las CDR VL 1-3 corresponden a las CDR de teprotumumab. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL CDR1 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 16 (o una secuencia codificante VL CDR1 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7); la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL CDR2 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 17, 20 o 23 (o una secuencia codificante de VL CDR2 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7); y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL CDR3 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad con SEC ID NO: 18, 21 o 24 (o una secuencia codificante de VL CDR3 descrita en la Tabla 4 o Tabla 7).

En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento codifica un anticuerpo de dominio único (por ejemplo, un nanocuerpo) que comprende (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, una CDR VH2, y/o una CDR VH3 o (ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1, una CDR VL2, y/o una CDR VL3. En ciertos aspectos, las CDR de VH codificadas y/o las CDR de VL se seleccionan a partir de las CDR correspondientes de teprotumumab.

En ciertos aspectos, el polinucleótido aquí descrito codifica la secuencia de aminoácidos de teprotumumab, VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), ganitumab (AMG 479), figitumumab, CP-751,871, cixutumumab (AMG 655), IMC-A12, dalotuzumab, MK0646, RG1507, robatumumab, SCH 717454, AVE-1642a, MEDI-573, BIIB022, rhuMab IGFR, L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13,

L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, o L52H52, o fragmentos, variantes o derivados de los mismos.

En ciertos aspectos, el polinucleótido aquí descrito codifica la secuencia de aminoácidos de VRDN-01100, o VRDN-02700, o fragmentos, variantes o derivados de los mismos.

En ciertos aspectos, el polinucleótido aquí descrito codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 113 (correspondiente a VRDN-01100). En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR comprende SEC ID NO: 116 (correspondiente a VRDN-002700).

En ciertos aspectos, el polinucleótido aquí descrito codifica la secuencia de aminoácidos de teprotumumab, o fragmentos, variantes o derivados de la misma.

En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las seis CDR enumeradas en las Tablas 1 y 2 (es decir, cualquier conjunto de tres CDR VH enumeradas en la Tabla 1 y cualquier conjunto de tres CDR VL enumeradas en la Tabla 2). En ciertos aspectos, el polinucleótido aquí descrito comprende las secuencias nucleotídicas de las seis CDR enumeradas en las Tablas 3 y 4

(es decir, los ácidos nucleicos que codifican las tres CDR VH enumeradas en la Tabla 3 y los ácidos nucleicos que codifican las tres CDR VL enumeradas en la Tabla 4).

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de CDR de la cadena pesada variable (VH CDR)

VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
SYGMH (SEC ID NO: 1)	IIWFDGSSTYYADSVRG (SEC ID NO: 2)	ELGRRYFDL (SEC ID NO: 3)
SYGMH (SEC ID NO: 1)	IIWFDGSSKYYGDSVKG (SEC ID NO: 89)	ELGRRYFDL (SEC ID NO: 3)

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera variable (VL CDR)

VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
RASQSVSSYLA (SEC ID NO: 4)	DASKRAT (SEC ID NO: 5)	QQRSKWPPWT (SEC ID NO: 6)
RASQSVSSYLA (SEC ID NO: 4)	DASNRAT (SEC ID NO: 90)	QQRSKWPPWT (SEC ID NO: 6)

Tabla 3. Secuencias de ácido nucleico de la CDR de cadena pesada variable (VH CDR)

Descripción	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
anti-IGF-1R #1	tcctacgggatgcat (SEC ID NO: 7)	atcatttggttcgacggatcttcaac ttattacgccgatagtgttcgaggg (SEC ID NO: 8)	gagctgggccgccggtatt ttgacctt (SEC ID NO: 9)

anti-IGF-1R # 2	tcctatgggatgcat (SEC ID NO: 10)	atcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttagaggg (SEC ID NO: 11)	gagctgggccgcagatattttgacctt (SEC ID NO: 12)
anti-IGF-1R #3	tcctatgggatgcat (SEC ID NO: 10)	atcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttaggggg (SEC ID NO: 14)	gagctgggcagaaggttattttgacctt (SEC ID NO: 15)

Tabla 4. Secuencias de ácido nucleico CDR de la cadena ligera variable CDR (VL CDR)

Descripción	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
anti-IGF-1R #1	agggcctcccagtctgtttcaagttatctggct (SEC ID NO: 16)	gacgcaagcaaacgagccacc (SEC ID NO:17)	cagcagcggagtaagtggcc accctggaca (SEC ID NO: 18)
anti-IGF-1R # 2	agggcctcccagtctgtttcaagttatctggct (SEC ID NO: 16)	gatgcaagcaaaagggccaca (SEC ID NO: 20)	cagcagcggagtaagtggcc accctggaca SEC ID NO: 21)
anti-IGF-1R #3	agggcctcccagtctgtttcaagttatctggct (SEC ID NO: 16)	gatgcaagcaaaagagccaca (SEC ID NO: 23)	cagcagagaagtaagtggc caccctggaca (SEC ID NO: 24)

En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico enumerada en la Tabla 5. En ciertos aspectos, el polinucleótido aquí descrito codifica una secuencia de cadena pesada variable (VH) de anticuerpo enumerada en la Tabla 6 o un fragmento de unión a antígeno de la misma.

Tabla 5. Secuencias de ácido nucleico de la cadena pesada variable (VH)

	Secuencias de ácido nucleico VH (SEC ID NO)
VH#1 anti-IGF-IR VH	caggttgagttagtggaatctggaggggtgtagtgcaacccggcagatcacagaggctgagttgcgcag cgtcgggattcacatttagctcctacgggatgcattgggtccgccaggcccctggcaagggtctagagtgg gtggctatcatttggttcgacggatcttcaacttattacgccgatagtgttcgagggcgttttacgataagccgg gacaactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagccgtgtacttctgtg ctagggagctgggccgccggtattttgacctttggggcagaggaactctcgtcagcgtatcctca (SEC ID NO: 25)
VH#2 anti-IGF-IR VH	CaggttgagttagtggaatctggaggggtgtagtgcaacctggcagatcacagaggctgagttGcgca gcaagtggattcacatttagctcctatgggatgcattgggtccgccaggcccctggcaagGgtctagagtg ggtggctatcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttagAgggcgctttactataagcagg gacaactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagctgtgtacttctgtgc tagggagctgggccgcagatattttgacctttgg ggcagaggaactcttgtctctgtatcctca (SEC ID NO: 26)
VH#3 anti-IGF-IR VH	caggttgagttagtggaatctggaggggtgtagtgcaacctggcagatcacagaggctgagtt gtgcagcaagtggattcacatttagctcctatgggatgcattgggtcagacaggcccctggcaag ggtctagagtgggtggctatcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttag ggggagatttactataagcagggacaactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttga gagcagaagatacagctgtgtacttctgtgctagggagctgggcagaaggtattttgacctttgg ggcagaggaactcttgtctctgtatcctca (SEC ID NO: 27)

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada variable (VH)

Secuencia de aminoácidos VH (SEC ID NO)
QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAIIWFDGSSTYYAD SVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGRRYFDLWGRGTLVSVSS (SEC ID NO: 28)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWMAIIWFDGSSKYYG DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCARELGRRYFDLWGRGTLVTVVSS (SEC ID NO: 91)

En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico enumerada en la Tabla 7. En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento codifica una cadena ligera variable (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia enumerada en la Tabla 8 o un fragmento de unión a antígeno de la misma.

Tabla 7. Secuencias de ácido nucleico de la cadena ligera variable (VL)

	Secuencia de ácido nucleico VL (SEC ID NO)
VL #1 anti-IGF-1R VL	gagattgtcttaacacaatcacccgcaactctgagtctatcgcctggcgaaagcgacgctcagctgtagggcct cccagtctgtttcaagttatctccttggttaccagcaaaagccaggacgaggccgcgccttgctgatatgacgca agcaaacgagccaccgggatccgctcgcgtttctccggtctcagcggaacagacagatttctcctcctcagcct gaagacttcgcagtgtgtactgccagcagcagcagggttaagtggtccaccctggacggacatttgggcaagg caccaaagtagaga gcaag (SEC ID NO: 29)
VL #2 anti-IGF-1R VL	gagattgtcttaacacaatcacccgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagagcaactctcagctgtagg gcctcccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacgccgcgcttgctgatatgatgatg caagcaagcaagggcagggacggatccgtagctagcagcagcggtcagctagcagcgaaccatttctactc ctcatttcctcctcactcaggagtcagtgtagtgtactgccagcagcagcggagtaagtggccaccaccctgga cggtgggcaaggcaagcaccaaagtagaga gcaag (SEC ID NO: 30)
VL #3	Gagattgtcttaacacaatcacctgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagagcaactctcagctgtagg

Secuencia de ácido nucleico VL (SEC ID NO)	
anti-IGF-1R VL	gcctcccagtctgtttcaagttatctggcttggttaccagcaaaagccaggacaggccccaaggttgctgatatg atgatgcaagcaaaagccacggatccctgtaggctaggttctggaacggtctggaacagggtctctctcctcatt tcctcctcactcacttgagcagtgtactgccagcagcagagaagtaagtggtccaccctggacatttgggcaag gcaagcaccaaagtagagcaag (SEC ID NO: 31)

Tabla 8. Secuencias de aminoácidos de la cadena ligera variable (VL)

Secuencia de aminoácidos de VL (SEC ID NO)	
	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRAT GIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQRSKWPPWTFG QGTKVESK (SEC ID NO: 32)
	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSKWPPWTFGQGTKVEIK (SEC ID NO: 92)

En ciertos aspectos, el polinucleótido aquí descrito comprende un ácido nucleico seleccionado de la Tabla 5 (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un VH de la Tabla 6) y un ácido nucleico de la Tabla 7 (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un VL de la Tabla 8).

En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico mostrada en la Tabla 9.

Tabla 9. Secuencias de ácido nucleico de la región constante de la cadena ligera

Descripción (SEC ID NO)	Secuencia de ácido nucleico de la región constante de la cadena ligera
Constante LC # 1 (SEC ID NO: 33)	agaactgtggccgcgccttctgtcttcatctttccaccctccgatgaacagctgaaatcgggtacggcttc agtggtgtctgctcaataacttctacccgaggggaggccaaggtgcagtgaaggtcgccaatgcattg cagcggaaacagttcaagtgtaacagaacaggtctccaaagcaccacctcttcactcactccagtac tgacctttcactaaggccgattacggagaaacacaaggtgtacgcttgcgaagttactcacatcaggg gctgctgagctcccctgctgtgactgtgaccaaccaaaagctttaatcgcggcggagtgt
Constante LC # 2 (SEC ID NO: 85)	agaactgtggccgcgccttctgtcttcatctttccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttc agtggtgtctgctcaataacttctacccaagggaggccaaggtgtcagtgaaggttgacaatgcattgc agcggaaactagtcaagtctgtaacagaacaggattccaaagcaccaccttcactcactccagtctg acctgacctttatcactaaggctgatagaaacacaaggtgtatgctgtgaagtgaagttaccatcaggg gctgctgagctcccctgctgtgactgtgaccaaggaaagctttaatagggggggagtgtt
Constante LC # 3 (SEC ID NO: 86)	agaactgtggctgcaccttctgtcttcatctttccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttca gtggtgtctgctcaataacttctacccaagggaggccaaggttgagtgaaggttgacaatgcattgcag tctggaaaccagtcaagtctgtaacagaacaggattccaaagaccacctcactcactccagtccagc tgacctttatccaggctgagaaacacaaggtgtatgctgtgtgaagttacacatcaggggctgagctg ctcccctgctgtgaccctgtgaccaaaagttaatagggggggagtgtt

En ciertos aspectos, el polinucleótido aquí descrito comprende una secuencia de ácido nucleico mostrada en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencias de ácido nucleico de la región constante de la cadena pesada

Descripción (SEC ID NO)	Secuencia de ácido nucleico de la región constante de la cadena pesada
HC Constante # 1 (SEC ID NO: 34)	gcaagtaccaaggggccaagcgtgttcccgctggccccctcttccaaatcgacatcaggtggcaccg cggctctgggatgcctcgttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtggggcctt gacgtctggcgtgcacacattccccgcagtccttcagtccagcggtctgtattcattatccagtgtggtta ccgtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaacgtaaatcataaaccaagcaacaca

Descripción (SEC ID NO)	Secuencia de ácido nucleico de la región constante de la cadena pesada
	aaggtggacaagaaagtcgagcccaagtcttgcgataaaacccacacttgtccgccttgcccagcc cccgagctactcgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgatgattagta ggacgcccgaagtgacctgtgtcgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaagttcaattggt acgtggatggcgtcgaggtgcacaacgctaagactaaaccgcgcgaagagcagtataatagcaca taccgagtcgtgtcggttctgaccgtgcttcaccaagactggctcaacggaaaggagtataaatgcaa ggtatctaataaggccctgcccgcacctatcgaaaaaactatttcaaaggctaaagggcagccacgt gagccccaggtctacaccctgcctccatcccgggacgaattaacaaagaaccaggtgagtctcacgt gcctggttaaaggtttttatcccagcgatatcgccgtggagtgggagtctaacggccaaccggaaaat aactacaagaccacacctccagtcttggactccgatggaagcttctttctttactcaaagctgactgtgg acaaaagtagatggcagcaggggaatgtgttcagctgttccgttatgcatgaggcgctacacaaccat atacccagaagtctctctcgctgtcacccggcaaa
HC Constante # 2 (SEC ID NO: 87)	gcaagtaccaaggggccatctgtgttcccgctggccccctcttccaaaagtacatcaggtggcaccgc ggctctgggatgcttggttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtggggccttga cttctggggtgcacacattccccgcagtccttcagtccagcggtctgtattcattatccagtgtggttacag tgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaatgtaaatcataaaccaagcaacacaaag gtggacaagaaagttgagcccaagtcttgtgataaaacccacacttgtccgccttgcccagccctga gctacttgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgatgattagtaggactc ctgaagtgacctgtgttgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaagttcaattggtatgtggat ggagttgaggtgcacaatgctaagactaaaccgagggaagagcagtataatagcacatacagagtt gtgtcagttctgacagtgcttcaccaagactggctcaatggaaaggagtataaatgcaaggtatctaat aaggccctgcccgcacctattgaaaaaactatttcaaaggctaaagggcagccaagggagcccca ggtctacaccctgcctccatccagagatgaattaacaaagaaccaggtgagtctcacttgcctggttaa aggtttttatccctctgatattgctgtggagtgggagtctaatggccaaccagaaaataactacaagacc acacctccagtcttggactctgatggaagcttctttctttactcaaagctgactgtggacaaaagtagatg gcagcaggggaatgtgttcagctgttctgttatgcatgaggcgctacacaaccattatacccagaagtc tctcagtctgtcacctggcaaa
HC Constante # 3 (SEC ID NO: 88)	gcaagtaccaaggggccatctgtgttcccactggccccctcttccaaaagtacatcaggtggcacagc agctctgggatgcttggttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtggggccttga

Descripción (SEC ID NO)	Secuencia de ácido nucleico de la región constante de la cadena pesada
	cttctggggtgcacacattccctgcagtccttcagtcctctggtctgtattcattatccagtgtggttacagtg ccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaatgtaaatcataaaccaagcaacacaaaggt ggacaagaaagttgagcccaagtcttgtgataaaacccacacttgtccaccttgcccagcccctgag ctacttgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgatgattagtaggactcct gaagtgacctgtgttgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaagttcaattggtatgtggatg gagttgaggtgcacaatgctaagactaaaccaagagaagagcagtataatagcacatacagggttg tgtcagttctgacagtgcttcaccaagactggctcaatggaaaggagtataaatgcaaggtatctaata aggccctgcctgcacctattgaaaaaactatttcaaaggctaaagggcagccaagagagccccagg tctacaccctgcctccatccagggatgaattaacaaagaaccaggtgagtctcacttgcctggttaaag gtttttatccctctgatattgctgtggagtgggagtctaatggccaaccagaaaataactacaagaccac acctccagtcttggactctgatggaagcttctttctttactcaaagctgactgtggacaaaagtagatggc agcaggggaatgtgttcagctgttctgttatgcatgaggcactacacaaccattatacccagaagtctct cagtctgtcacctggcaaa

En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento comprende las secuencias de ácido nucleico enumeradas en la Tabla 11. En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento codifica un anticuerpo que comprende la cadena pesada (HC) de un anticuerpo enumerado en la Tabla 12 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento codifica un péptido señal enumerado en la Tabla 12.

Tabla 11. Secuencias de ácidos nucleicos de la cadena pesada (HC)

Descripción (SEC ID NO)	**Secuencia del ácido nucleico HC**
Péptido señal de IL-10 - HC # 1 (SEC ID NO: 35) Completo: 1398 Péptido señal de IL-10: 1-54 (SEC ID NO: 121) HC: 55-1398	atgcacagctccgccctgctctgctgtttggtgcttctgaccggcgtccgggctcaggttgagttagtgg aatctggaggggtgtagtgcaacccggcagatcacagaggctgagttgcgcagcgtcgggattc acatttagctcctacgggatgcattgggtccgccaggcccctggcaagggtctagagtgggtggcta tcatttggttcgacggatcttcaacttattacgccgatagtgttcgagggcgttttacgataagccggga caactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagccgtgtacttct gtgctagggagctgggccgccggtattttgacctttggggcagaggaactctcgtcagcgtatcctca gcaagtaccaaggggccaagcgtgttcccgctggccccctcttccaaatcgacatcaggtggcac cgcggctctgggatgcctcgttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtgggg ccttgacgtctggcgtgcacacattccccgcagtccttcagtccagcggtctgtattcattatccagtgt ggttaccgtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaacgtaaatcataaaccaagca acacaaaggtggacaagaaagtcgagcccaagtcttgcgataaaacccacacttgtccgccttgc ccagcccccgagctactcgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgat gattagtaggacgcccgaagtgacctgtgtcgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaa gttcaattggtacgtggatggcgtcgaggtgcacaacgctaagactaaaccgcgcgaagagcagt ataatagcacataccgagtcgtgtcggttctgaccgtgcttcaccaagactggctcaacggaaagg agtataaatgcaagg
Péptido señal de IL-10 - HC # 2 (SEC ID NO: 36) Completo: 1398 Péptido señal de IL-10: 1-54 HC: 55-1398	atgcacagctccgccctgctctgctgtttggtgcttctgacaggagtcagggctcaggttgagttagtg gaatctggaggggtgtagtgcaacctggcagatcacagaggctgagttgcgcagcaagtggatt cacatttagctcctatgggatgcattgggtccgccaggcccctggcaagggtctagagtgggtggct atcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttagagggcgctttactataagcagggac aactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagctgtgtacttctgt gctagggagctgggccgcagatattttgacctttggggcagaggaactcttgtctctgtatcctcagca agtaccaaggggccatctgtgttcccgctggccccctcttccaaaagtacatcaggtggcaccgcg gctctgggatgcttggttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtggggccttg acttctggggtgcacacattccccgcagtccttcagtccagcggtctgtattcattatccagtgtggttac agtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaatgtaaatcataaaccaagcaacaca aaggtggacaagaaagttgagcccaagtcttgtgataaaacccacacttgtccgccttgcccagcc cctgagctacttgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgatgattagta ggactcctgaagtgacctgtgttgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaagttcaattggt atgtggatggagttgaggtgcacaatgctaagactaaaccgagggaagagcagtataatagcac atacagagttgtgtcagttctgacagtgcttcaccaagactggctcaatggaaaggagtataaatgc aagg
Péptido señal de IL-10 - HC #3 (SEC ID NO: 37)	atgcacagctctgccctgctctgctgtttggtgcttctgacaggagtcagggctcaggttgagttagtgg aatctggaggggtgtagtgcaacctggcagatcacagaggctgagttgtgcagcaagtggattca catttagctcctatgggatgcattgggtcagacaggcccctggcaagggtctagagtgggtggctatc atttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttagggggagatttactataagcagggacaa

Descripción (SEC ID NO)	**Secuencia del ácido nucleico HC**
Completo: 1398 Péptido señal de IL-10: 1-54 HC: 55-1398	ctccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagctgtgtacttctgtgc tagggagctgggcagaaggtattttgacctttggggcagaggaactcttgtctctgtatcctcagcaa gtaccaaggggccatctgtgttcccactggccccctcttccaaaagtacatcaggtggcacagcag ctctgggatgcttggttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtggggccttga cttctggggtgcacacattccctgcagtccttcagtcctctggtctgtattcattatccagtgtggttacagt gccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaatgtaaatcataaaccaagcaacacaaa ggtggacaagaaagttgagcccaagtcttgtgataaaacccacacttgtccaccttgcccagcccct gagctacttgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgatgattagtagg actcctgaagtgacctgtgttgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaagttcaattggtat gtggatggagttgaggtgcacaatgctaagactaaaccaagagaagagcagtataatagcacat acagggttgtgtcagttctgacagtgcttcaccaagactggctcaatggaaaggagtataaatgcaa gg

Tabla 12. Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (HC)

Descripción (SEC ID NO)	**Secuencia**
HC (SEC ID NO: 38)	QVELVESGGGVVQPGRSQRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAII WFDGSSTYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARELGR RYFDLWGRGTLVSVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Péptido señal de IL-10 (SEC ID NO: 120)	MHSSALLCCLVLLTGVRA

En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico

enumerada en la Tabla 13. En ciertos aspectos, un anticuerpo que el polinucleótido descrito en el presente documento codifica comprende la cadena ligera (CL) de un anticuerpo enumerado en la Tabla 14 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento codifica un péptido señal enumerado en la Tabla 14.

Tabla 13. Secuencias de ácido nucleico de la cadena ligera (LC)

Descripción (SEC ID NO)	**Secuencia de ácido nucleico LC**
HC: 61-705	atgtaccggatgcagctgctcagctgcatcgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtctta acacaatcacccgcaactctgagtctatcgcctggcgaaagagcgacgctcagctgtagggcctccc agtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccgcgcttgctgatatatg acgcaagcaaacgagccaccgggatccccgctcgtttctccggttctggcagcggaacagattttact cttaccatttcctcactcgagcctgaagacttcgcagtgtactattgccagcagcggagtaagtggcca ccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggccgcgccttctgtcttcat ctttccaccctccgatgaacagctgaaatcgggtacggcttcagtggtttgtctgctcaataacttctacc cgagggaggccaaggtgcagtggaaggtcgacaatgcattgcagagcggaaacagtcaagagtc tgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatctaaggccgat tacgagaaacacaaggtgtacgcttgcgaagttacacatcaggggctgagctcccctgtgaccaaa agctttaatcgcggcgagtgt
Péptido señal IL-2 - LC #2 (SEC ID NO: 40) Completo: 705 Péptido señal de IL-	atgtacagaatgcagctgctcagctgcattgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtctta acacaatcacccgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagcaactctcagctgtagggcctccc agtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccgcgcttgctgatatatg atgcaagcaaaagggccacagggatccccgctagattcagcggttctggcagcggaacagatttta ctcttaccatttcctcacttgagcctgaagactttgcagtgtactattgccagcagcggagtaagtggcca ccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggccgcgccttctgtcttcat ctttccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttcagtggtttgtctgctcaataacttctaccc

Descripción (SEC ID NO)	**Secuencia de ácido nucleico LC**
2: 1-60 HC: 61-705	aagggaggccaaggtgcagtggaaggttgacaatgcattgcagagcggaaacagtcaagagtctg taacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatctaaggctgattat gagaaacacaaggtgtatgcttgtgaagttacacatcaggggctgagctcccctgtgaccaaaagctt taatagggggggagtgt
Péptido señal IL-2 - LC #3 (SEC ID NO: 41) Completo: 705 Péptido señal de IL-2: 1-60 HC: 61-705	atgtacagaatgcagctgctcagctgcattgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtctta acacaatcacctgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagcaactctcagctgtagggcctccc agtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccaaggttgctgatatatg atgcaagcaaaagagccacagggatccctgctaggttctctggttctggctctggaacagattttactct taccatttcctcacttgagcctgaagactttgcagtgtactattgccagcagagaagtaagtggccaccc tggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggctgcaccttctgtcttcatcttt ccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttcagtggtttgtctgctcaataacttctacccaag ggaggccaaggtgcagtggaaggttgacaatgcattgcagtctggaaacagtcaagagtctgtaac agaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatctaaggctgattatgag aaacacaaggtgtatgcttgtgaagttacacatcaggggctgagctcccctgtgaccaaaagctttaat agggggggagtgt

Tabla 14. Secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (LC)

(SEC ID NO)	**Secuencia**
LC (SEC ID NO. 42)	EIVL TQSP ATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLI YDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSKWPP WTFGQGTKVESKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKII [LMF1]VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Péptido de señal IL-2 (SEC ID NO. 119)	MYRMQLLSCIALSLALVTNS

En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento comprende un ácido nucleico enumerado en las Tablas 11 y 13. En ciertos aspectos, el polinucleótido descrito en el presente documento codifica un anticuerpo que comprende un HC y un LC de un anticuerpo enumerado en las Tablas 12 y 14 (es decir, el HC del anticuerpo enumerado en la Tabla 12 y el LC del mismo anticuerpo enumerado en la Tabla 14).

En ciertos aspectos, las proteínas terapéuticas usadas en los métodos descritos en el presente documento son anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que tienen las secuencias VH, VL, HC y/o LC de teprotumumab, así como anticuerpos que tienen al menos un 80% de identidad, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o aproximadamente un 100% de identidad con las secuencias VH, VL, HC y/o LC correspondientes.

En ciertos aspectos, el polinucleótido comprende también una secuencia enlazadora unida operablemente a la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o a la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera. En ciertos aspectos, el polinucleótido también comprende una secuencia de elemento de pausa unida de forma operable a la

secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera. En ciertos aspectos, la secuencia de elemento de pausa tiene una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 54.

En ciertos aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, o un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.).

II.A.2. Fragmentos de unión a antígenos

En ciertos aspectos, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo descrito en el presente documento, como por ejemplo, teprotumumab, está codificado por un polinucleótido descrito en el presente documento. Los fragmentos de unión a antígeno ejemplares incluyen pero no se limitan a Fab, Fab',

F(ab')2, y scFv, en los que el Fab, Fab', F(ab')2, o scFv comprende una secuencia de región variable de cadena pesada y una secuencia de región variable de cadena ligera de teprotumumab como se describe en el presente documento. Un Fab, Fab', F(ab')2, o scFv puede producirse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. En ciertos aspectos, un fragmento de unión a antígeno, como un Fab, Fab', F(ab')2, o scFv, comprende además una fracción que prolonga la semivida del anticuerpo *in vivo*. La fracción también se denomina "fracción prolongadora de la semivida". Puede usarse cualquier fracción conocida por los expertos en la materia para prolongar la semivida de un fragmento de unión a antígeno, como un Fab, Fab', F(ab')2 o scFv, *in vivo*. Por ejemplo, la fracción que prolonga la semivida puede incluir una región Fc, un polímero, una albúmina o una proteína o compuesto de unión a albúmina. El polímero puede incluir un polialquileno de cadena recta o ramificada, natural o sintético, opcionalmente sustituido, polialquileno, polioxialquileno, polisacárido, polietilenglicol, polipropilenglicol, alcohol polivinílico, metoxipolietilenglicol, lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos. Los sustituyentes pueden incluir uno o más grupos hidroxi, metilo o metoxi. En ciertos aspectos, un fragmento de unión a antígeno, como un Fab, Fab', F(ab')2, o scFv, puede modificarse mediante la adición de uno o más aminoácidos C-terminales para la unión de la fracción de

extensión de la semivida. En ciertos aspectos, la fracción prolongadora de la semivida es polietilenglicol o seroalbúmina humana. En ciertos aspectos, un fragmento de unión a antígeno, como un Fab, Fab', F(ab')2, o scFv, se fusiona a una región Fc.

En ciertos aspectos, el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se unen específicamente a un receptor del factor de crecimiento-1 similar a la insulina (IGF-1R), como el IGF-1R humano.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R codificado comprende la secuencia de aminoácidos de teprotumumab, VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), ganitumab (AMG 479), figitumumab, CP-751,871, cixutumumab (AMG 655), IMC-A12, dalotuzumab, MK0646, RG1507, robatumumab, SCH 717454, AVE-1642a, MEDI-573, BIIB022, rhuMab IGFR, L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, o L52H52, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R codificado comprende la secuencia de aminoácidos de VRDN-01100

(SEC ID NO: 113), o VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R codificado comprende la secuencia de aminoácidos de teprotumumab, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento se modifica para que tenga una semivida mejorada y/o una toxicidad reducida.

En ciertos aspectos, el anticuerpo codificado o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es biespecífico o multiespecífico.

II.A.3. Casetes de expresión de anticuerpos

En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento casetes de expresión de anticuerpos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento o un dominio del mismo (por ejemplo, una cadena ligera, una cadena pesada, una región de cadena ligera variable

y/o una región de cadena pesada variable) que se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR) fragmentos de unión a antígeno del mismo, o cualquier combinación de los mismos, y vectores, por ejemplo, vectores que comprenden tales casetes de expresión de anticuerpos para expresión en una célula, por ejemplo, un fibroblasto.

En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento casetes de expresión de anticuerpos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a un receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1R) fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o cualquier combinación de los mismos y comprenden una secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento, así como anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que compiten con tales anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno por unirse a un IGF-1R fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, de manera dependiente de la dosis), o que se unen al mismo epítopo que el de tales anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que compite por unirse al mismo epítopo

que teprotumumab, VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), ganitumab (AMG 479), figitumumab, CP-751,871, cixutumumab (AMG 655), IMC-A12, dalotuzumab, MK0646, RG1507, robatumumab, SCH 717454, AVE-1642a, MEDI-573, BIIB022, rhuMab IGFR, L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, o L52H52, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que compite por unirse al mismo epítopo que VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), o VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que compite por unirse al mismo epítopo que el teprotumumab, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

También se proporciona en el presente documento un casete de expresión de anticuerpos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una

secuencia de cualquiera de las SEC ID NOs: 7-24, 25-27, 29-31, 33-37, 39-41, o 43-76. En ciertos aspectos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el polipéptido se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR) fragmentos de unión a antígeno del mismo, o cualquier combinación de los mismos.

También se proporcionan en el presente documento kits, vectores o células hospederas que comprenden (i) un primer casete de expresión de anticuerpos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76 y (ii) un vector de administración.

En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento casetes de expresión de anticuerpos que comprenden una secuencia de nucleótidos que comprende tres CDR de dominio VH, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que contiene VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, véase la Tabla 3), por ejemplo, en la que las tres CDR de dominio VH están en el contexto de un VH. En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que comprende tres CDR de dominio VL, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que contiene VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, véase la Tabla 4), por ejemplo, en la que las tres CDR de dominio VL están en el

contexto de un VL. En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento casetes de expresión de anticuerpos (o combinaciones de polinucleótidos) que comprenden una secuencia de nucleótidos que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (i) tres CDR de dominio VH, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que contiene VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, (ii) tres CDR de dominio VL, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que contenga VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, véase la Tabla 4), por ejemplo, en la que los tres CDR de dominio VL estén en el contexto de un VL.

En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento casetes de expresión de anticuerpos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica tres CDR de dominio VH, por ejemplo, un polipéptido que contiene VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, véase la Tabla 1), por ejemplo, en el que las tres CDR de dominio VH están en el contexto de un VH. En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento casetes de expresión de anticuerpos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica tres CDR de dominio VL, por ejemplo, un polipéptido que contiene VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de cualquiera de los anticuerpos

descritos en el presente documento (por ejemplo, véase la Tabla 2), por ejemplo, en el que los tres CDR de dominio VL están en el contexto de un VL. En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento casetes de expresión de anticuerpos (o combinaciones de polinucleótidos) que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (i) tres CDR de dominio VH, por ejemplo, un polipéptido que contiene VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, (ii) tres CDR de dominio VL, por ejemplo, un polipéptido que contiene VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, véase la Tabla 2), por ejemplo, en el que las tres CDR de dominio VL están en el contexto de un VL.

En ciertos aspectos, la cadena pesada comprende una región variable (VH) de cadena pesada que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, una CDR VH2 y una CDR VH3. En ciertos aspectos, las CDR 1-3 de la VH modificada corresponden a las CDR del teprotumumab. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH CDR1 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 7 o 10; la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH CDR2 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 8, 11 o 14; y la secuencia de ácido nucleico que codifica la VH CDR3 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 9, 12 o 15.

En ciertos aspectos, la cadena ligera comprende una región variable (VL) de cadena ligera que comprende una región determinante de la complementariedad (CDR) 1, una CDR VL2 y una CDR VL3. En ciertos aspectos, las CDR VL 1-3 corresponden a las CDR de teprotumumab. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica la VL CDR1 comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 16; la secuencia de ácido nucleico que codifica la CDR2 de VL comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 17, 21 o 23; y la secuencia de ácido nucleico que codifica la CDR3 de VL comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 18, 21 o 24.

También se proporcionan en el presente documento casetes de expresión de anticuerpos que codifican un anticuerpo

o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento o un dominio del mismo que están optimizados, por ejemplo, mediante la optimización de codones/ARN, la sustitución con secuencias señal heterólogas y la eliminación de elementos de inestabilidad del ARNm. Métodos para generar ácidos nucleicos optimizados que codifican un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento o un dominio del mismo (por ejemplo, cadena pesada, cadena ligera, dominio VH o dominio VL) para la expresión recombinante mediante la introducción de cambios de codón (por ejemplo, un cambio de codón que codifica el mismo aminoácido debido a la degeneración del código genético) y/o eliminando regiones inhibidoras en el ARNm puede llevarse a cabo adaptando los métodos de optimización descritos en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nos. 5,965,726; 6,174,66; 6,291,664; 6,414,132; y 6,794,498, en consecuencia, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

Los casetes de expresión de anticuerpos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento o un dominio del mismo pueden generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, PCR y otros métodos de clonación molecular). Por ejemplo, la amplificación por PCR usando cebadores sintéticos

sujetos a hibridación a los extremos 3' y 5' de una secuencia conocida puede realizarse usando ADN genómico obtenido a partir de células de hibridoma que producen el anticuerpo de interés. En ciertos aspectos, la línea celular de hibridoma tiene el número de acceso DSM ACC 2587 (depositado el 4 de octubre de 2003). En ciertos aspectos, la línea celular de hibridoma tiene el número de acceso DSM ACC 2594 (depositado el 5 de septiembre de 2003). Tales métodos de amplificación PCR pueden usarse para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los ácidos nucleicos amplificados pueden clonarse en vectores para su expresión en células hospederas y para su posterior clonación, por ejemplo, para generar anticuerpos quiméricos y humanizados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Los casetes de expresión de anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden estar, por ejemplo, en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético, y el ADN puede ser bicatenario o monocatenario. Si es monocatenario, el ADN puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido). En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos es un ADNc o un ADN que carece de uno o más intrones endógenos. En ciertos aspectos, un casete de expresión de anticuerpos es un casete de expresión de anticuerpos no

natural. En ciertos aspectos, un casete de expresión de anticuerpos se produce recombinantemente. En ciertos aspectos, los casetes de expresión de anticuerpos se aíslan. En ciertos aspectos, los casetes de expresión de anticuerpos son sustancialmente puros. En ciertos aspectos, un casete de expresión de anticuerpos se purifica a partir de componentes naturales.

En ciertos aspectos, un vector viral descrito en el presente documento comprende un casete de expresión de anticuerpos que comprende regiones codificantes para dos o más polipéptidos, por ejemplo, una cadena pesada y una cadena ligera.

Cuando se desea que el casete de expresión de anticuerpos incluya regiones codificantes para dos o más cadenas polipeptídicas individuales, cada región codificante adicional más allá de la primera está preferiblemente unida a un elemento que facilita la co-expresión de las proteínas en las células hospederas, tal como un elemento de secuencia de entrada ribosómica interna (IRES) (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 4,937,190), un sitio de escisión de furina, un elemento 2A, o promotor(es). En ciertos aspectos, pueden usarse sitios de escisión de furina IRES o elementos 2A cuando un único vector comprende secuencias que codifican cada subunidad de una proteína multisubunidad. En el caso de que la proteína de interés sea inmunoglobulina con una especificidad

deseada, por ejemplo, la primera región codificante (que codifica la cadena pesada o ligera de la inmunoglobulina) se sitúa corriente abajo del promotor. La segunda región codificante (que codifica la cadena restante de la inmunoglobulina) puede situarse corriente abajo de la primera región codificante, y puede disponerse un IRES, un sitio de escisión de furina o un elemento 2A entre las dos regiones codificantes, por ejemplo, inmediatamente antes de la segunda región codificante. En ciertos aspectos, la incorporación de un IRES, un sitio de escisión de furina o un elemento 2A entre las secuencias de un primer y un segundo gen (que codifican las cadenas pesada y ligera, respectivamente) puede permitir que ambas cadenas se expresen a partir del mismo promotor aproximadamente al mismo nivel en la célula.

En ciertos aspectos, la proteína de interés comprende dos o más subunidades, por ejemplo una inmunoglobulina (Ig). En ciertos aspectos, un vector de administración de la descripción puede incluir una región codificante para cada una de las subunidades. Por ejemplo, el vector viral puede incluir tanto la región codificante para la cadena pesada de Ig (o la región variable de la cadena pesada de Ig) como la región codificante para la cadena ligera de Ig (o la región variable de la cadena ligera de Ig). En ciertos aspectos, los vectores incluyen una primera región codificante para la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, y una segunda región

codificante para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo. En ciertos aspectos, las dos regiones codificantes pueden estar separadas, por ejemplo, por una secuencia de autoprocesamiento 2A para permitir la transcripción multicistrónica de las dos regiones codificantes.

El vector viral puede incluir regiones codificantes para dos o más proteínas de interés. Por ejemplo, el vector viral puede incluir la región codificante para una primera proteína de interés y la región codificante para una segunda proteína de interés. La primera proteína de interés y la segunda proteína de interés pueden ser iguales o diferentes.

La secuencia consenso de Kozak, consenso de Kozak o secuencia de Kozak, se conoce como una secuencia que aparece en el ARNm eucariota y tiene el consenso (gcc)gccRccAUGG, donde R es una purina (adenina o guanina) tres bases en corriente arriba del codón de inicio (AUG), que va seguida de otra "G". En ciertos aspectos, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, o más con la secuencia consenso de Kozak. En ciertos aspectos, el vector comprende una secuencia consenso de Kozak. En ciertos aspectos, el vector incluye una secuencia consenso de Kozak después de que el polinucleótido que codifica una o más proteínas de interés se inserta en el vector, por ejemplo, en el sitio de restricción corriente abajo del

promotor. Por ejemplo, el vector puede incluir una secuencia de nucleótidos de GCCGCCATG (SEC ID NO: 77), donde el ATG es el codón de inicio de la proteína de interés. En ciertos aspectos, el vector comprende una secuencia de nucleótidos de GCGGCCGCCATG (SEC ID NO: 78), donde el ATG es el codón de inicio de la proteína de interés.

En ciertos aspectos, se proporciona en el presente documento una composición que comprende un vector de administración, por ejemplo, un vector viral, que comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno.

En ciertos aspectos, el vector de administración, por ejemplo, un vector viral, comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento se secreta a partir de la glándula salival y se ingiere. En ciertos aspectos, el efecto terapéutico del anticuerpo anti-IGF-1R secretado o del fragmento de unión a antígeno del mismo es local, sistémico o ambos.

En ciertos aspectos, el vector de administración (por ejemplo, un vector de administración que comprende un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), tal como IGF-1R humano es

adecuado para la administración a o cerca de un ojo (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro- o peri-orbital, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo, al tejido conectivo cerca del ojo, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, la administración es a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, la entrega o administración es a células fibroblásticas retro o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la entrega o administración es por inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpo comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (i) CDR 1-3 de VH (por ejemplo,

SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24) de teprotumumab modificado; (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31) de teprotumumab modificado; (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41) de teprotumumab modificado; o (iv) una secuencia que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la secuencia comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, o un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.). En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos comprende además una secuencia que codifica un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de IL-2 o IL-10). En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-2 o un péptido señal de IL-10. En ciertos aspectos, el péptido señal codificado comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NO: 119 o 120. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de las SEC ID NOs: 121 o 122.

III. Construcciones vectoriales

Algunos aspectos de la descripción se dirigen a una construcción vectorial o una construcción de expresión (por

ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) que tiene un promotor eucariota operativamente unido a un ADN de interés que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento. En ciertos aspectos, las construcciones vectoriales o construcciones de expresión que contienen la secuencia de ADN (o la secuencia de ARN correspondiente) que pueden usarse de acuerdo con la descripción pueden ser cualquier construcción de expresión eucariota que contenga el ADN o la secuencia de ARN de interés. Por ejemplo, un plásmido o una construcción viral (por ejemplo., un vector AAV) puede escindirse para proporcionar ADN lineal con terminales sujetos a ligación. Estas terminaciones se unen a ADN exógeno con terminaciones complementarias similares sujetos a ligación para proporcionar una molécula de ADN recombinante biológicamente funcional con un replicón intacto y una propiedad fenotípica deseada. En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión es capaz de replicarse tanto en hospederos eucariotas como procariotas, cuyas construcciones son conocidas en la técnica y están disponibles comercialmente.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o construcción de expresión de la descripción que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo, teprotumumab) es una construcción multicistrónica (por ejemplo, bicistrónica) (por

ejemplo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera). En ciertos aspectos, la construcción multicistrónica (por ejemplo, bicistrónica) comprende además un elemento F2A o IRES.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotumumab, VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), ganitumab (AMG 479), figitumumab, CP-751,871, cixutumumab (AMG 655), IMC-A12, dalotuzumab, MK0646, RG1507, robatumumab, SCH 717454, AVE-1642a, MEDI-573, BIIB022, rhuMab IGFR, L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, o L52H52, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), o VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotumumab, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

El ADN exógeno (es decir, donante) usado en la descripción se obtiene a partir de células adecuadas, y las construcciones vectoriales o de expresión se preparan usando técnicas bien conocidas en la técnica. Asimismo, las técnicas

para obtener la expresión de secuencias exógenas de ADN o ARN en una célula hospedera genéticamente alterada son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo., Kormal *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 84:2150-2154 (1987); Sambrook *et al*. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2ª. Ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; cada uno de los cuales se incorpora por referencia con respecto a métodos y composiciones para la expresión eucariota de un ADN de interés).

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión contiene un promotor para facilitar la expresión del ADN de interés dentro de una célula secretora. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor eucariota fuerte, como un promotor de citomegalovirus humano (CMV, por sus siglas en inglés), promotor de CMV de ratón, virus de tumor mamario de ratón (MMTV, por sus siglas en inglés), virus de sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés) o adenovirus. Los promotores ejemplares incluyen, entre otros, el promotor del gen temprano inmediato del CMV humano (Boshart *et al*., *Cell* 41:521-530 (1985) y el promotor de la repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés) del RSV (Gorman *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777-6781 (1982)). En ciertos aspectos, el promotor es un potenciador temprano de CMV/promotor de β actina de pollo (CBA, por sus siglas en inglés), promotor de CAG, CMV, EF1α, EF1α con un potenciador de CMV, un promotor de

CMV con un potenciador de CMV (CMVe/p), un promotor de CBA con un potenciador de CMV, un promotor CMV con un intrón SV40, un promotor CBA con un potenciador CMV y un intrón CAG, un promotor EF1α con un 5' LTR truncado y un intrón quimérico HBG e IgHC, o un promotor específico de tejido. En ciertos aspectos, el promotor específico de tejido es un promotor específico de músculo. En ciertos aspectos, el promotor específico de músculo es un promotor DES, un promotor HSA, un promotor MCK, un promotor HMCK7, un promotor dMCK, un promotor tMCK, un promotor CK8e, un promotor SPc5-12, un promotor SP-301, un promotor MH, un promotor Sk-CRM o un promotor Sk-CRM4.

En ciertos aspectos, el promotor comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 34-38. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que comprende el promotor puede comprender un intrón. En ciertos aspectos, el intrón se selecciona del grupo que consiste en un intrón de SV40, un intrón de MVM o un intrón de betaglobina humana. En ciertos aspectos, un promotor CMVp está fusionado a un intrón SV40. En ciertos aspectos, el intrón SV40 comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 46.

Alternativamente, el promotor usado puede ser un

promotor específico de tejido. Por ejemplo, cuando la célula es un fibroblasto, el promotor específico del tejido puede ser un promotor de la proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP2, por sus siglas en inglés), un promotor de la proteína de activación de fibroblastos (FAP, por sus siglas en inglés) o un promotor de la proteína 1 específica de fibroblastos (FSP1, por sus siglas en inglés). Cuando la célula es un miocito, el promotor específico del tejido puede ser un promotor de la creatina cinasa muscular (MCK), un promotor de la troponina I (TNNI2), un promotor de la alfa-actina esquelética (ASKA), un promotor de la DES un promotor HSA, un promotor MCK, un promotor HMCK7, un promotor dMCK, un promotor tMCK, un promotor CK8e, un promotor SPc5-12, un promotor SP-301, un promotor MH, un promotor Sk-CRM o un promotor Sk-CRM4. Cuando la célula es un adipocito, el promotor específico del tejido puede ser un promotor de la adiponectina o un promotor de la proteína de unión a ácidos grasos (AP2) del adipocito.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión contiene un primer promotor y un segundo promotor. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor son diferentes. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor son iguales. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor inician la transcripción en la misma dirección. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor

inician la transcripción en direcciones diferentes. En ciertos aspectos, el primer o segundo promotor en un promotor CMV. En ciertos aspectos, el primer o segundo promotor es un promotor EF-1α.

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer promotor y la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo promotor están unidas de forma operable. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer promotor y la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo promotor están unidas de forma operable por un elemento de pausa. En ciertos aspectos, el elemento de pausa comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 54. La secuencia de ácido nucleico que codifica el primer promotor y la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo promotor están unidas operablemente por un elemento de pausa.

Dadas las limitaciones del tamaño del genoma del AAV, la expresión de vectores multicistrónicos (múltiples genes o múltiples marcos abiertos de lectura) de grandes proteínas bajo el control de un único promotor puede suponer un reto.

En ciertos aspectos, los vectores multicistrónicos descritos en el presente documento comprenden secuencias o péptidos 2A de un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). En ciertos aspectos, las construcciones de la descripción

también pueden incluir sitios de escisión proteolítica. En ciertos aspectos, los sitios de escisión proteolítica son sitios de escisión furina y/o sitios de escisión 2A.

En ciertos aspectos, las construcciones vectoriales o las construcciones de expresión de la descripción también pueden incluir otros componentes tales como un marcador (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos (tal como un gen de resistencia a ampicilina) o β-galactosidasa) para ayudar en la selección de células que contienen y/o expresan la construcción, un origen de replicación para la replicación estable de la construcción en una célula bacteriana (preferiblemente, un origen de replicación de alto número de copias), una señal de localización nuclear, u otros elementos que facilitan la producción de la construcción de ADN, la proteína codificada por la misma, o ambos. En ciertos aspectos, las construcciones vectoriales de la descripción pueden comprender un gen de resistencia a antibióticos, incluyendo, entre otros, neomicina, kanamicina, puromicina y/o zeocina. En ciertos aspectos, las construcciones vectoriales de la descripción pueden comprender un origen de replicación ColE1, f1, pUC, p15A o pMB1.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial de la descripción contiene un esqueleto que comprende un origen de replicación ColE1 y/o un gen de resistencia a la kanamicina de SEC ID NO: 84.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial puede comprender un origen de replicación ColE1 y resistencia a la kanamicina tal como 5'-gccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttccatag gctccgccccccctgacggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgac cctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcat agctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgc acgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaa cccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcg aggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaa gaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtag ctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcag attacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacg ctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatctt cacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaagcccaatctgaataatgtta caaccaattaaccaattctgattagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaattta ttcatatcaggattatcaataccatatttttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaa actcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctggtatcggtctgcgattccgactcg tccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaa tcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagtttatgcatttctttccaga cttgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcat3' (SEC ID NO: 84)

Para la expresión eucariota, la construcción vectorial o de expresión puede comprender como mínimo un promotor eucariota enlazado operablemente a un ADN de interés,

que a su vez está enlazado operablemente a una secuencia de poliadenilación. La secuencia señal de poliadenilación puede seleccionarse de entre una variedad de secuencias señal de poliadenilación conocidas en la técnica. En ciertos aspectos, la secuencia señal de poliadenilación es la secuencia señal de poliadenilación temprana de SV40. En ciertos aspectos, la secuencia señal de poliadenilación es la secuencia señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGHpA). En ciertos aspectos, la secuencia señal de poliadenilación es la secuencia señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (hGHpA). En ciertos aspectos, la secuencia señal de poliadenilación es la secuencia señal de poliadenilación de SV40 (SV40pA). La construcción también puede incluir uno o más intrones, que pueden aumentar los niveles de expresión del ADN de interés, en particular cuando el ADN de interés es un ADNc (por ejemplo, no contiene intrones de la secuencia natural). Puede usarse cualquiera de una variedad de intrones conocidos en la técnica (por ejemplo, el intrón de β-globina humana, que se inserta en la construcción vectorial o de expresión en una posición 5′ al ADN de interés). En ciertos aspectos, el intrón es un intrón SV40. En ciertos aspectos, el intrón es de una cadena pesada de inmunoglobulina. En ciertos aspectos, el intrón es una quimera entre el gen de la β-globina humana y el de la cadena pesada de inmunoglobina. En ciertos aspectos, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al

menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 46, 56, u 82.

En ciertos aspectos, el polinucleótido comprende un poli(A). En ciertos aspectos, el poli(A) es un poli(A) sintético o un poli(A) de hormona de crecimiento bovina (BGH, por sus siglas en inglés). En ciertos aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de poli(A) que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 52-53.

Cuando se desea incluir regiones codificantes para dos o más cadenas polipeptídicas individuales, o dos o más subunidades de una proteína de interés en un vector viral, cada región codificante adicional más allá de la primera está preferiblemente unida a un elemento que facilita la co-expresión de las proteínas en las células hospederas, tal como un elemento de secuencia de entrada ribosómica interna (IRES) (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 4.937.190), o un elemento 2A. En ciertos aspectos, pueden usarse elementos IRES, de sitio de escisión de furina o 2A cuando un único vector comprende secuencias que codifican cada subunidad de una proteína multisubunidad. En el caso de que la proteína de interés sea inmunoglobulina con una especificidad deseada, por ejemplo, la primera región codificante (que codifica la cadena

pesada o ligera de la inmunoglobulina) se sitúa corriente abajo del promotor. La segunda región codificante (que codifica la cadena restante de la inmunoglobulina) puede situarse corriente abajo de la primera región codificante, y puede disponerse un IRES, un sitio de escisión de furina o un elemento 2A entre las dos regiones codificantes, por ejemplo, inmediatamente antes de la segunda región codificante. En ciertos aspectos, la incorporación de un IRES, un sitio de escisión de furina o un elemento 2A entre las secuencias de un primer y un segundo gen (que codifican las cadenas pesada y ligera, respectivamente) puede permitir que ambas cadenas se expresen a partir del mismo promotor aproximadamente al mismo nivel en la célula.

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico de la construcción vectorial o construcción de expresión comprende un promotor, cadena pesada, IRES, y secuencias de cadena ligera en orientación 5'-3'. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico de la construcción comprende un promotor, una variable ligera, un IRES y secuencias de cadena pesada en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión de secuencia de ácido nucleico comprende sitios de escisión proteolítica. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede comprender una secuencia que se incorpora a una construcción vectorial o construcción de expresión de la

descripción adyacente a un sitio de escisión de autoprocesamiento, tal como una secuencia 2A o similar a 2A, y proporciona un medio para eliminar aminoácidos adicionales que permanecen tras la escisión por la secuencia de escisión de autoprocesamiento. Los sitios de escisión proteolítica ejemplares se describen en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, sitios de escisión de furina con la secuencia consenso RXK(R)R (SEC ID NO: 79). Tales sitios de escisión de furina pueden ser escindidos por proteasas endógenas similares a la subtilisina, tales como furina y otras proteasas de serina dentro de la vía de secreción de proteínas. En ciertos aspectos, pueden usarse otros "sitios de escisión proteolítica adicionales" ejemplares, como se describe en, por ejemplo, Lie *et al.*, *Sci Rep* 7, 2193 (2017).

En ciertos aspectos, la construcción de vector de secuencia de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un ácido nucleico que codifica un péptido señal unido operablemente a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un receptor del factor de crecimiento-1 similar a la insulina. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal endógeno para HGH y sus variantes; un péptido señal endógeno para interferones y sus variantes, incluyendo el péptido señal de interferones tipo I, II y III y sus variantes; un péptido señal endógeno para citocinas conocidas y sus variantes, tales como

el péptido señal de eritropoyetina (EPO), insulina, TGF-β1, TNF, IL1-α, e IL1-β, y sus variantes. En algunas modalidades, el péptido señal es un péptido señal modificado. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-2. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-10. En ciertos aspectos, el péptido señal comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 119 o 120. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NO: 121 o 122.

En ciertos aspectos, el constructo vectorial de secuencia de ácido nucleico o constructo de expresión comprende un promotor, una cadena pesada, un sitio de escisión de furina, un sitio de escisión 2A y secuencias de cadena ligera en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial de secuencia de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un promotor, un primer péptido señal, una cadena pesada, un sitio de escisión de furina, un sitio de escisión 2A, un segundo péptido y secuencias de cadena ligera en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el constructo vectorial de

secuencia de ácido nucleico o constructo de expresión comprende un promotor, una cadena ligera, un sitio de escisión de furina, un sitio de escisión 2A y secuencias de cadena pesada en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial de secuencia de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un promotor, un primer péptido señal, una cadena ligera, un sitio de escisión de furina, un sitio de escisión 2A, un segundo péptido señal y secuencias de cadena pesada en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial de secuencia de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un promotor, secuencias de cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, IRES, y secuencia de cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo s en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial de secuencia de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un promotor, un primer péptido señal, secuencias de cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, IRES, un segundo péptido señal, y secuencia de cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo s en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial de secuencia de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un promotor, secuencias de cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, IRES, y secuencias de cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial de secuencia de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un promotor, un primer péptido señal, secuencias de cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, IRES, un segundo péptido señal, y secuencias de cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, un segundo promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, un segundo promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal y una secuencia de ácido nucleico que

codifica una cadena pesada en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada, un segundo promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada, un segundo promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada, una primera secuencia promotora, una segunda secuencia promotora y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada, una primera secuencia promotora, una segunda secuencia promotora, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera en

orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, una primera secuencia promotora, una segunda secuencia promotora y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, una primera secuencia promotora, una segunda secuencia promotora, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal y una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada en orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, el promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor CAG, un promotor CBA, un promotor CMV, un promotor EF1α, un promotor EF1α con un potenciador CMV, un promotor CMV con un potenciador CMV (CMVe/p), un promotor CMV con un intrón SV40 o un promotor específico de tejido. En ciertos aspectos, el promotor específico de tejido se selecciona entre un promotor de DES, un promotor de HSA, un promotor de MCK, un promotor de HMCK7, un promotor de dMCK, un promotor de tMCK, un promotor de CK8e, un promotor de SPc5-12, un promotor de SP-301, un promotor de MH, un promotor de Sk-CRM y un promotor de Sk-CRM4.

En ciertos aspectos, el promotor comprende una secuencia nucleotídica al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 47-51, 83, o 93. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que comprende el promotor puede comprender un intrón. En ciertos aspectos, el intrón se selecciona del grupo que consiste en un intrón de SV40, un intrón de MVM o un intrón de betaglobina humana. En ciertos aspectos, un CMVp está fusionado a un intrón SV40. En ciertos aspectos, un intrón CAG comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 82. En ciertos aspectos, un intrón de SV40 comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 46.

En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor son diferentes. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor son iguales. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor inician la transcripción en la misma dirección. En ciertos aspectos, el primer y el segundo promotor inician la transcripción en direcciones diferentes.

En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer promotor y la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo promotor están unidas de forma

operable. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el primer promotor y la secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo promotor están unidas de forma operable por un elemento de pausa. En ciertos aspectos, el elemento de pausa comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 54.

En ciertos aspectos, la señal se selecciona del grupo que consiste en un péptido señal endógeno para HGH y sus variantes; un péptido señal endógeno para interferones y sus variantes, incluyendo el péptido señal de interferones tipo I, II y III y sus variantes; un péptido señal endógeno para citocinas conocidas y sus variantes, como el péptido señal de eritropoyetina (EPO), insulina, TGF-β1, TNF, IL1-α, e IL1-β, y sus variantes. En algunas modalidades, el péptido señal es un péptido señal modificado. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-2. En ciertos aspectos, el péptido señal es un péptido señal de IL-10. En ciertos aspectos, el péptido señal comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con SEC ID NO: 119 o 120. En ciertos aspectos, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a cualquiera de

los SEC ID NO: 121 o 122.

Los vectores para la administración del ADN de interés pueden ser víricos o no víricos, o pueden estar compuestos de ADN desnudo mezclado con un adyuvante como partículas víricas (por ejemplo, partículas AAV) o lípidos catiónicos o liposomas. Un "adyuvante" es una sustancia que no produce por sí misma el efecto deseado, sino que actúa para potenciar o mejorar de otro modo la acción del compuesto activo. El vector preciso y la formulación del vector usada dependerán de varios factores, como la glándula secretora objetivo de la transferencia genética.

En ciertos aspectos, una composición que comprende un vector de administración, por ejemplo, un vector viral, que comprende una construcción de ácido nucleico o una construcción de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento. En ciertos aspectos, el vector de administración es adecuado para la administración a un tejido periorbital o retroorbital. En ciertos aspectos, el tejido es un tejido conectivo, un tejido muscular o un tejido adiposo.

En ciertos aspectos, la construcción vectorial o de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende:

(i) CDR 1-3 de VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y CDR 1-3 de VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, o un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.).

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un sitio F2A, una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, un sitio F2A, un segundo péptido señal, una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, y un poli(A) en la orientación 5'-

3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor CBA, un intrón CAG, un exón CBA, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un sitio de escisión de furina, un enlazador, un péptido 2A, un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un BGHpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor CBA, un intrón CAG, un exón CBA, un ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un sitio de escisión de furina, un enlazador, un péptido 2A, un ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un BGHpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, una secuencia

de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un IRES2, una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, un IRES2, un segundo péptido señal, una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor CBA, un intrón CAG, un exón CBA, un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un elemento IRES2, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un SynpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor

CBA, un intrón CAG, un exón CBA, un ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un elemento IRES2, un ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un SynpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, un intrón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, un poli(A), un elemento de pausa, un segundo promotor, un 5' LTR, un intrón quimérico, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, un intrón, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un poli(A), un elemento de pausa, un segundo promotor, un 5' LTR, un intrón quimérico, una secuencia de ácido nucleico que codifica un

segundo péptido señal, una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor CMV, un intrón SV40, un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un BGHpA, un elemento de pausa, un promotor EF1α, un 5' LTR, un intrón quimérico de betaglobina humana y cadena pesada de inmunoglobulina, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, y un SynpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor CMV, un intrón SV40, un ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena ligera de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un BGHpA, un elemento de pausa, un promotor EF1α, un 5' LTR, un intrón quimérico de betaglobina humana y cadena pesada de inmunoglobulina, un ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena pesada de un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo, y un SynpA en la

orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada, un poli(A), un elemento de pausa, un segundo promotor, un 5' LTR, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena pesada, un poli(A), un elemento de pausa, un segundo promotor, un 5' LTR, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena ligera y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor CMV, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada, un BGHpA, un elemento de pausa, un promotor EF1α, un 5' LTR, un ácido nucleico que codifica una cadena ligera, y un SynpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un

polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor CMV, un ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena pesada, un BGHpA, un elemento de pausa, un promotor EF1α, un LTR 5', un ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena ligera y un SynpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, un poli(A), un elemento de pausa, un segundo promotor, un 5' LTR, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un primer promotor, una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena ligera, un poli(A), un elemento de pausa, un segundo promotor, un 5' LTR, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena pesada y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor CMV, un ácido nucleico que codifica una cadena ligera, un

BGHpA, un elemento de pausa, un promotor EF1α, un 5' LTR, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada, y un SynpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o la construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un potenciador CMV, un promotor CMV, un ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena ligera, un BGHpA, un elemento de pausa, un promotor EF1α, un LTR 5', un ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena pesada y un SynpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un poli(A), una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, un intrón, un 5' LTR, un primer promotor, un segundo promotor, un intrón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada, y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un poli(A), una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena ligera, un intrón, un 5' LTR, un primer promotor, un segundo promotor, un intrón, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena pesada, y un

poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un SYNpA, un ácido nucleico que codifica una cadena ligera, una quimera de un intrón de betaglobina y un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina, un 5'LTR, un promotor EF1α fusionado a un potenciador CMV, un promotor CMV fusionado a un intrón SV40, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada, y un BGHpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un SYNpA, un ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena ligera, una quimera de un intrón de betaglobina y un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina, una 5'LTR, un promotor EF1α fusionado a un potenciador CMV, un promotor CMV fusionado a un intrón SV40, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena pesada y una BGHpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un poli(A), una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada, un intrón, un 5' LTR, un primer promotor, un segundo promotor, un intrón, una

secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un poli(A), una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena pesada, un intrón, un 5' LTR, un primer promotor, un segundo promotor, un intrón, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena ligera, y un poli(A) en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un SYNpA, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada, una quimera de un intrón de betaglobina y un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina, un 5'LTR, un promotor EF1α fusionado a un potenciador CMV, un promotor CMV fusionado a un intrón SV40, una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, y un BGHpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, la construcción de ácido nucleico o construcción de expresión comprende un polinucleótido que comprende un SYNpA, un ácido nucleico que codifica un primer péptido señal, una cadena pesada, una quimera de un intrón de betaglobina y un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina, una 5'LTR, un promotor EF1α

fusionado a un potenciador CMV, un promotor CMV fusionado a un intrón SV40, una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo péptido señal, una cadena ligera y una BGHpA en la orientación 5'-3'.

En ciertos aspectos, las construcciones vectoriales o construcciones de expresión (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos) descritas en el presente documento comprenden uno o más de los elementos enumerados en la Tabla 15.

Tabla 15. Secuencias de ácido nucleico de elementos constructivos ejemplares.

SEC ID NOs	Nombre	Secuencia de ácido nucleico
SEC ID NO: 43	IRES	GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGC CGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTT TCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAA ACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTT CCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTG AAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAAC GTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCT GGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAG ATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTG AGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAG CGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCC ATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCTTT ACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCC GAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGAT AATATGGCCACA

SEC ID NOs	Nombre	Secuencia de ácido nucleico
SEC ID NO: 44	Sitio de escisión de la furina + Enlazador	AGAAAGAGAAGGAGTGGCTCAGGA
SEC ID NO: 45	Sitio F2A	GCCCCTGTGAAACAGACCCTGAACTTTGACCTTGAAGCTTG CTGGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCA
SEC ID NO: 46	Intrón SV40	GTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCC GGTGGTGGTGCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTT GCCTTTACTTCTAG
SEC ID NO: 47	Núcleo promotor de EF-1α	GCTCCGGTGCCCGTCAGTTGGGCAGCGCACATCGCCCACA GTCCGAGAAGTTGGGGGGGAGGGTCGGCAATTGAACCGGT GCCTAGAGAAGGTGGCGCGGTAAACTGGGAAAGTGATGTG TGTCGTGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGA GAACCGTTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTTTTTC GCAACGGGTTGTGCCGAGAACACAG
SEC ID NO: 48	Potenciador CMV	GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG GTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATA ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGAC CCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTA TTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT GGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGAC TTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA CCATG
SEC ID NO: 49	Promotor CMV	GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCG GTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACG TCAATGGGAGTTTTTTGGCACCAATCAACGGGACTTTCCAAA ATGTGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGG

SEC ID NOs	Nombre	Secuencia de ácido nucleico
		TAGGCGTGTGTGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
SEC ID NO: 50	Potenciador y promotor del CMV (CMVe/p)	GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
SEC ID NO: 51	potenciador CMV - promotor CBA - intrón CAG	GTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTA

SEC ID NOs	Nombre	Secuencia de ácido nucleico
		TTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGG GGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAG GGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGC CAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGA GGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGC GGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGC CCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCT GACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG CCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGAC GGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGG CTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGG GGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGC GGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGAGGA GCGCGGCCGGGGGC
SEC ID NO: 52	Poli(A) sintético	AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTTTTTTTTT TTGTG
SEC ID NO: 53	BGH poli(A)	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGTGCCCCTC CCCGTGCCTTCCTTGTGACCCTGGAAGGTGTGACTCCCACT GTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTGCT GAGTAGGTGTCATTCTGGGGGGTGGTGGTGGTGGCAGGAC AGGGTGGTGGTGGCAGGATTGGAAGACAATAGCAGGCATG CTGGGGATGCGGTGGGCTATG
SEC ID NO: 54	Elemento de pausa	AACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAACAAACTAG CAAAATAGGCTGTCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATT TCTCT
SEC ID NO: 55	5' LTR (truncado)	GGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCGCCGCCCTACCTG AGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGCGCTGCTGCCG

SEC ID NOs	Nombre	Secuencia de ácido nucleico
		CCTCCTCCTGCCTGCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGGTCCG TCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGGCCTGACCGGGCCT TTGTCCGTCCGTGGTCCCTAGTAGTAGCAGCCGGCTCTCCC CGCTGCTGCCTGACCCTGCTGCTGCTTGCTCAACTCTACGT CTGTTGTTTCGTTTTCTGTTGCTGCGCGCCGTTACAGATC
SEC ID NO: 56	Intrón (quimera de intrón de betaglobina humana e intrón de cadena pesada de inmunoglobulina)	GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATA GAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTTGCGTTTCTGA TAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTC CACAG
SEC ID NO: 82	Intrón CAG	ggagtcgctgcgcgctgccttcgccccgtgccccgctccgccgccgcctcgcgccgccc gccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctc ctccgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaag ccttgaggggctccgggagggccctttgtgcgggggagcggctcgggggtgcgtgc gtgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggctccgcgctgcccggcggctgtgagcg ctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcagtgtgcgcgagaggagcgcggc cgggggcggtgccacgcggtgcgggggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtg cggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggggtgtgggcgcggcggtcgggctgta acccccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcggg gctccgtgcggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgggggtggcggcgggt gggggtgccgggcggggcggggccgcctcgggccggggagggctcgggggaggg gcgcggcggcccccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccatt gccttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctgtgcgga gccgaaatctgggaggcgccgccgcacccccctctagcgggcgcggggcgaagcggt gcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgc cgtcccttctccctctccagcctcggggctgtccgcgggggggacggctgccttcggggg

25

SEC ID NOs	Nombre	Secuencia de ácido nucleico
		ggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggtctagactctgctaaccatgttcatgccttcttctctttcctacagctcctggg
SEC ID NO: 83	Promotor de la CBA # 1	tcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccccccccctccccccacccccaattttgttatttatttttttttaatttttgtgcagcgatgggggggggggggggggggcgcgggggggggcgggggcgagggggcgggggcgggggcaggcggaggtgtgtgcggcggcagcagccaatcagcggcgcggctccgaaagctttccttttttatggcggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcg
SEC ID NO: 93	Promotor de la CBA # 2	tcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccccccccccctccccccccacccaattttgtatttatttttttttttgtgcagcgatgggggggggggggggggggggggcgcgcgcagggggggggggggcggcggcgcagggggggggggcggcggcggcggcaggcggcggcaggcggcaggcggcagcgcagccaatcagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgggcagcggcggcggcggcctataaaaagcgaagcgcggcggcggcggcggcggcggcgggcggcggcgggcggcggcggcg

III.A. Vectores de entrega

En ciertos aspectos, el vector de administración es un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido o un lisosoma. En ciertos aspectos, el efecto terapéutico del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es local, sistémico o ambos.

En ciertos aspectos, una composición que comprende un vector de administración (por ejemplo, un vector viral, vector no viral, plásmido, lípido, partícula proteica, vector bacteriano o lisosoma) que comprende un ácido nucleico que codifica o comprende un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo

descrito en el presente documento.

En ciertos aspectos, el vector de administración es adecuado para la administración en o cerca de un ojo (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro o periorbital, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo, al tejido conectivo cerca del ojo, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, la administración se realiza a células fibroblásticas retro o periobitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la entrega o administración es por inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones.

En ciertos aspectos, la composición que comprende un vector de administración (por ejemplo, un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido, una partícula proteica, un vector bacteriano o un lisosoma) comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento se produce en una célula. En ciertos aspectos, la célula es una célula de fibroblasto, una célula de adipocito, una célula de

miofibroblasto, una célula de miocito o cualquier combinación de las mismas.

En ciertos aspectos, una composición que comprende el vector de administración (por ejemplo, un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido, una partícula proteica, un vector bacteriano o un lisosoma) que comprende un ácido nucleico que codifica o comprende un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento es adecuada para la administración a tejido conjuntivo, tejido muscular y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, la administración es a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular.

En ciertos aspectos, el vector de administración comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs:

30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.), o un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de IL-2 o IL-10).

III.A. 1Vectores no virales

El ADN de interés puede administrarse usando un vector no viral. Por "vector no vírico" se entiende el ADN desnudo, las formulaciones químicas que contienen ADN desnudo (por ejemplo., una formulación de ADN y compuestos catiónicos (por ejemplo., sulfato de dextrano)) y el ADN desnudo mezclado con un adyuvante como una partícula vírica (es decir, el ADN de interés no está contenido dentro de la partícula vírica, sino que la formulación transformante se compone tanto de ADN desnudo como de partículas víricas (por ejemplo, partículas AAV) (véase, por ejemplo, Curiel *et al.*, *Am. J. Respir.* Cell Mol. Biol. 6:247-52 (1992)). Así, el "vector no viral" puede incluir vectores compuestos de ADN más partículas virales en los que las partículas virales no contienen el ADN de interés dentro del genoma viral.

En ciertos aspectos, el vector no viral es un vector bacteriano. Véase, por ejemplo, Baban *et al.*, *Bioeng Bugs*, 1(6):385-394 (2010).

En ciertos aspectos, el ADN de interés puede formarse en forma de complejo con sustancias policatiónicas como poli-L-lisina o DEAC-dextrano, ligandos objetivo y/o proteínas de unión al ADN (por ejemplo, histonas). Las formulaciones de complejos de ADN o ARN-liposomas comprenden una mezcla de lípidos que se unen al material genético (ADN o ARN) y facilitan la entrada del ácido nucleico en la célula. Los liposomas que pueden usarse de acuerdo con la descripción incluyen DOPE (dioleil fosfatidil etanol amina), CUDMEDA (N-(5-colestrum-3-β-ol 3-uretanil)-N′,N′-dimetiletileno diamina).

Los lípidos que pueden usarse de acuerdo con la descripción incluyen, entre otros, DOPE (fosfatidiletanolamina de dioleoilo), colesterol y CUDMEDA (N-(5-colestrum-3-ol 3 uretanil)-N′,N′-dimetiletilenodiamina). A modo de ejemplo, el ADN puede administrarse en una solución que contenga una de las siguientes formulaciones de liposomas catiónicos: Lipofectin™ (LTI/BRL), Transfast™ (Promega Corp), Tfx50™ (Promega Corp), Tfx10™ (Promega Corp) o Tfx20™ (Promega Corp). La concentración de las soluciones de liposomas oscila entre aproximadamente 2.5% y 15% volumen:volumen, preferentemente entre aproximadamente 6% y 12% volumen:volumen. Otros métodos y composiciones ejemplares para la formulación de ácido

nucleico (por ejemplo, ADN, incluyendo ADN o ARN no contenido dentro de una partícula viral) para la administración según el método de la descripción se describen en las Pat. de EE.UU. Nos. 5,892,071; 5,744,625; 5,925,623; 5,527,928; 5,824,812; 5,869,715.

Las partículas poliméricas pueden usarse de acuerdo con la descripción para la administración de genes basada en polímeros. Véase, por ejemplo, Putnam *et al.*, *PNAS* 98 (3): 1200-1205 (2001).

El ADN de interés también puede administrarse como una formulación química de ADN o ARN acoplada a una molécula portadora (por ejemplo, un anticuerpo o un ligando receptor) que facilite la administración a las células hospederas con el fin de alterar sus propiedades biológicas. El término "formulaciones químicas" se refiere a las modificaciones de los ácidos nucleicos para permitir el acoplamiento de los compuestos de ácido nucleico a una molécula portadora, como una proteína o un lípido, o un derivado de los mismos. Las moléculas portadoras de proteínas ejemplares incluyen anticuerpos específicos de las células objetivo o ligandos de receptores, es decir, moléculas capaces de interactuar con receptores asociados a una célula objetivo.

En ciertos aspectos, una composición que comprende un vector de administración no viral que comprende un ácido nucleico que codifica o comprende un anticuerpo (por ejemplo,

un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento adecuado para la administración a o cerca de un ojo (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro o periorbital, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo, al tejido conectivo cerca del ojo, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el tejido periorbital o retroorbital se selecciona entre músculo, tejido conjuntivo y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, la administración se realiza a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, la entrega o administración es a células fibroblásticas retro o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la entrega o administración es por inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones.

En ciertos aspectos, la composición que comprende un vector de administración no viral comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, o un péptido terapéutico que se produce en las células objetivo. En ciertos aspectos, el efecto terapéutico del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es local, sistémico, o ambos.

En ciertos aspectos, el vector no viral comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.), o un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de IL-2 o IL-10).

III.A.2 Vectores virales

En general, los vectores víricos usados de acuerdo con la descripción se componen de una partícula vírica derivada de un virus natural que se ha alterado genéticamente para que el virus sea de replicación defectuosa y exprese un gen recombinante de interés de acuerdo con la descripción. Una vez que el virus entrega su material genético a una célula, no genera virus infecciosos adicionales, pero introduce genes recombinantes exógenos en la célula, preferiblemente en el genoma de la célula.

Numerosos vectores virales son bien conocidos en el arte, incluyendo, por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociado (AAV, por sus siglas en inglés), virus del herpes simple (HSV, por sus siglas en inglés), citomegalovirus (CMV), vacuna y vectores poliovirus. Los vectores retrovirales son menos preferidos, ya que los retrovirus requieren células replicantes y las glándulas secretoras están compuestas en su mayoría por células de replicación lenta y/o diferenciadas en fase terminal. Los adenovirus y AAV son los vectores víricos preferidos, ya que estos virus infectan eficazmente células de replicación lenta y/o diferenciadas terminalmente. En ciertos aspectos, el vector de administración (por ejemplo, vector viral) se selecciona del grupo que consiste en un vector viral adeno-asociado (AAV), un vector adenoviral, un vector lentiviral o un vector retroviral.

Cuando se usa un virus de replicación deficiente como vector viral, la producción de partículas virales infectivas que contengan ADN o ARN correspondiente al ADN de interés puede producirse introduciendo la construcción viral en una línea celular recombinante que proporcione los componentes faltantes esenciales para la replicación viral. En ciertos aspectos, la transformación de la línea celular recombinante con el vector viral recombinante no dará lugar a la producción de virus competentes para la replicación, por ejemplo, por recombinación homóloga de las secuencias virales de la línea celular recombinante en el vector viral introducido. Los métodos para la producción de partículas virales deficientes en replicación que contienen un ácido nucleico de interés son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Rosenfeld *et al*., *Science* 252:431-434 (1991) y Rosenfeld *et al*., *Cell* 68:143-155 (1992) (adenovirus); Patente de EE.UU. No. 5,139,941 (virus adeno-asociado); Patente de EE.UU. No. 4,861,719 (retrovirus); y Patente de EE.UU. No. 5,356,806 (virus vacuna).

En ciertos aspectos, el vector de administración viral que comprende un ácido nucleico que codifica o comprende un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento es adecuado para la administración a un ojo o cerca de él (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro o periorbital, retrobulbar, intramuscular

cerca del ojo, a tejido conjuntivo cerca del ojo, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el tejido periorbital o retroorbital se selecciona entre músculo, tejido conjuntivo y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, la administración se realiza a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, la entrega o administración es a células fibroblásticas retro o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones.

En ciertos aspectos, el vector de administración viral comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del

mismo descrito en el presente documento se produce en una célula objetivo. En ciertos aspectos, el efecto terapéutico del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo es local, sistémico, o ambos.

En ciertos aspectos, el vector viral comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.), o un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de IL-2 o IL-10).

IV. Terapia génica mediada por virus adeno-asociados (AAV)

El AAV, un parvovirus perteneciente al género *Dependovirus*, tiene varias características atractivas que no

se encuentran en otros virus. Por ejemplo, el AAV puede infectar una amplia gama de células hospederas, incluidas células que no se dividen. Además, el AAV puede infectar células de diferentes especies. Y lo que es más importante, el AAV no se ha asociado a ninguna enfermedad humana o animal, y no parece alterar las propiedades fisiológicas de la célula hospedera tras su integración. Por último, el AAV es estable en una amplia gama de condiciones físicas y químicas, lo que se presta a los requisitos de producción, almacenamiento y transporte.

El genoma del AAV, una molécula lineal de ADN monocatenario que contiene aproximadamente 4700 nucleótidos (el genoma del AAV-2 consta de 4681 nucleótidos), generalmente comprende un segmento interno no repetitivo flanqueado en cada extremo por repeticiones terminales invertidas (ITR). Las ITR tienen aproximadamente 145 nucleótidos de longitud (AAV-1 tiene ITR de 143 nucleótidos) y tienen múltiples funciones, incluyendo servir como orígenes de replicación, y como señales de empaquetamiento para el genoma viral.

La porción interna no repetida del genoma incluye dos grandes marcos abiertos de lectura (ORF), conocidos como las regiones de replicación (rep) y de cápside (cap) del AAV. Estos ORF codifican los productos génicos de la replicación y de la cápside, respectivamente: los productos génicos de la replicación y de la cápside (es decir, las proteínas) permiten

la replicación, el ensamblaje y el empaquetamiento de un virión AAV completo. Más concretamente, una familia de al menos cuatro proteínas virales se expresan a partir de la región rep del AAV: Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40, todas ellas denominadas así por su peso molecular aparente. La región cap del AAV codifica al menos tres proteínas: VP1, VP2 y VP3.

El AAV es un virus ayudante dependiente, que requiere la coinfección con un virus ayudante (por ejemplo, adenovirus, herpesvirus o virus vacuna) para formar viriones AAV funcionalmente completos. En ausencia de co-infección con un virus ayudante, el AAV establece un estado latente en el que el genoma viral se inserta en el cromosoma de una célula hospedera o existe en forma episomal, pero no se producen viriones infecciosos. La infección posterior por un virus ayudante "rescata" el genoma integrado, permitiendo que se replique y empaquete en cápsides virales, reconstituyendo así el virión infeccioso. Aunque el AAV puede infectar células de diferentes especies, el virus ayudante debe ser de la misma especie que la célula hospedera. Así, por ejemplo, el AAV humano se replicará en células caninas que hayan sido coinfectadas con un adenovirus canino.

Para producir viriones AAV recombinantes (rAAV) que contengan el ADN, se transfecta una línea celular hospedera adecuada con un vector AAV que contenga el ADN, pero que carezca de rep y cap. A continuación, la célula hospedera se infecta

con AAV de tipo salvaje (wt, por sus siglas en inglés) y un virus auxiliar adecuado para formar viriones rAAV. Alternativamente, los genes AAV wt (conocidos como genes de función auxiliar, que comprenden rep y cap) y los genes de función del virus auxiliar (conocidos como genes de función accesoria) pueden proporcionarse en uno o más plásmidos, eliminando así la necesidad de AAV wt y virus auxiliar en la producción de viriones rAAV. Los productos génicos de la función auxiliar y accesoria se expresan en la célula hospedera, donde actúan en trans sobre el vector rAAV que contiene el gen heterólogo. A continuación, el gen heterólogo se replica y empaqueta como si fuera un genoma AAV wt, formando un virión AAV recombinante. Cuando se transducen las células de un paciente con el virión rAAV resultante, el ADN entra y se expresa en las células del paciente. Dado que las células del paciente carecen de los genes rep y cap, así como de los genes de la función accesoria, el virión rAAV no puede seguir replicándose y empaquetando sus genomas. Además, sin una fuente de genes rep y cap, los viriones AAV wt no pueden formarse en las células del paciente. Véase, por ejemplo, Publ. De Sol. de EE.UU. # 2003/0147853.

En ciertos aspectos, los vectores AAV de la presente descripción pueden comprender o derivarse de cualquier serotipo AAV natural o recombinante. De acuerdo con la presente descripción, el serotipo AAV puede ser, pero no se limita a,

AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11 y AAV12. En ciertos aspectos, el serotipo AAV es AAV1, AAV2, AAV6, AAV8 o AAV9. En ciertos aspectos, el vector AAV se modifica en relación con la secuencia de serotipo AAV de tipo salvaje. En ciertos aspectos, el vector AAV se modifica en relación con AAV1, AAV2, AAV6, AAV8 o AAV9 de tipo salvaje. En ciertos aspectos, el serotipo del vector AAV es AAV1 o un vector AAV modificado derivado del mismo. En ciertos aspectos, el serotipo del vector AAV es AAV2 o un vector AAV modificado derivado del mismo. En ciertos aspectos, el serotipo del vector AAV es AAV6 o un vector AAV modificado derivado del mismo. En ciertos aspectos, el serotipo del vector AAV es AAV8 o un vector AAV modificado derivado del mismo. En ciertos aspectos, el serotipo del vector AAV es AAV9 o un vector AAV modificado derivado del mismo. En ciertos aspectos, el serotipo del vector AAV es AAVMYO (véase Weinmann *et al*. Nat. Comm. 11: 5432, 2020).

En ciertos aspectos, una composición que comprende un vector de administración AAV que comprende un ácido nucleico que codifica o comprende un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento. En ciertos aspectos, el vector de administración de AAV que comprende un ácido nucleico que codifica o comprende un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno

del mismo descrito en el presente documento es adecuado para la administración en o cerca de un ojo (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro o periorbital, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo, al tejido conjuntivo cerca del ojo, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el tejido periorbital o retroorbital se selecciona entre músculo, tejido conjuntivo y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, la administración se realiza a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, la entrega o administración es a células fibroblásticas retro o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la entrega o administración es por inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones.

En ciertos aspectos, el vector de administración AAV

comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo., un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento se produce en un fibroblasto, miofibroblasto, miocito y/o adipocito. En ciertos aspectos, el efecto terapéutico del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es local, sistémico, o ambos.

En ciertos aspectos, el vector de administración AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.), o un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de IL-2 o IL-10).

IV.A. Componentes del vector AAV

IV.A. 1Repeticiones terminales invertidas (ITR)

Los vectores AAV de la presente descripción comprenden un genoma viral con al menos una región ITR y una región de carga útil, por ejemplo, un polinucleótido (por ejemplo, un casete de expresión de anticuerpos) que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión Fc) descrita en el presente documento, o un péptido terapéutico. En ciertos aspectos, el vector AAV tiene dos ITR. Estas dos ITR flanquean la región de carga útil en los extremos 5' y 3'. Las ITR funcionan como orígenes de replicación que comprenden sitios de reconocimiento para la replicación. Las ITR comprenden regiones de secuencia, que pueden ser complementarias y estar dispuestas simétricamente. Las ITR incorporadas en los vectores AAV de la descripción pueden estar compuestas de secuencias polinucleotídicas de origen natural o de secuencias polinucleotídicas derivadas recombinantemente.

Las ITR pueden derivarse del mismo serotipo que la cápside, seleccionarse de cualquiera de los serotipos enumerados en el presente documento, o de un derivado de los mismos. Las ITR pueden ser de un serotipo diferente al de la cápside. En ciertos aspectos, el vector AAV tiene más de una

ITR. En un ejemplo no limitante, el vector AAV tiene un genoma viral que comprende dos ITR. En ciertos aspectos, las ITR son del mismo serotipo. En ciertos aspectos, las ITR son de serotipos diferentes. Ejemplos no limitantes incluyen cero, una o ambas de las ITR que tienen el mismo serotipo que la cápside. En ciertos aspectos, ambas ITR del vector AAV son ITR AAV2.

Independientemente, cada ITR puede tener entre 75 y 175 nucleótidos de longitud. Una ITR puede tener una longitud de aproximadamente 100-105 nucleótidos, aproximadamente 106-110 nucleótidos, aproximadamente 111-115 nucleótidos, aproximadamente 116-120 nucleótidos, aproximadamente 121-125 nucleótidos, aproximadamente 126-130 nucleótidos, aproximadamente 131-135 nucleótidos, aproximadamente 136-140 nucleótidos, aproximadamente 141-145 nucleótidos o aproximadamente 146-150 nucleótidos. En ciertos aspectos, las ITR tienen una longitud de aproximadamente 140-142 nucleótidos. Ejemplos no limitantes de longitud de ITR son aproximadamente 102, aproximadamente 140, aproximadamente 141, aproximadamente 142, aproximadamente 145 nucleótidos de longitud, y aquellos que tienen al menos un 95% de identidad con los mismos.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una repetición terminal invertida que tiene una longitud tal como, pero sin limitarse a, aproximadamente 75-80, aproximadamente 75-85, aproximadamente 75-100, aproximadamente

80-85, aproximadamente 80-90, aproximadamente 80-105, aproximadamente 85-90, aproximadamente 85-95, aproximadamente 85-110, aproximadamente 90-95, aproximadamente 90-100, aproximadamente 90-115, aproximadamente 95-100, aproximadamente 95-105, aproximadamente 95-120, aproximadamente 100-105, aproximadamente 100-110, aproximadamente 100-125, aproximadamente 105-110, aproximadamente 105-115, aproximadamente 105-130, aproximadamente 110-115, aproximadamente 110-120, aproximadamente 110-135, aproximadamente 115-120, aproximadamente 115-125, aproximadamente 115-140, aproximadamente 120-125, aproximadamente 120-130, aproximadamente 120-145, aproximadamente 125-130, aproximadamente 125-135, aproximadamente 125-150, aproximadamente 130-135, aproximadamente 130-140, aproximadamente 130-155, aproximadamente 135-140, aproximadamente 135-145, aproximadamente 135-160, aproximadamente 140-145, aproximadamente 140-150, aproximadamente 140-165, aproximadamente 145-150, aproximadamente 145-155, aproximadamente 145-170, aproximadamente 150-155, aproximadamente 150-160, aproximadamente 150-175, aproximadamente 155-160, aproximadamente 155-165, aproximadamente 160-165, aproximadamente 160-170, aproximadamente 165-170, aproximadamente 165-175, o aproximadamente 170-175

nucleótidos.

En ciertos aspectos, la longitud de una primera y/o una segunda región ITR para el vector AAV puede ser de aproximadamente 75-80, aproximadamente 75-85, aproximadamente 75-100, aproximadamente 80-85, aproximadamente 80-90, aproximadamente 80-105, aproximadamente 85-90, aproximadamente 85-95, aproximadamente 85-110, aproximadamente 90-95, aproximadamente 90-100, aproximadamente 90-115, aproximadamente 95-100, aproximadamente 95-105, aproximadamente 95-120, aproximadamente 100-105, aproximadamente 100-110, aproximadamente 100-125, aproximadamente 105-110, aproximadamente 105-115, aproximadamente 105-130, aproximadamente 110-115, aproximadamente 110-120, aproximadamente 110-135, aproximadamente 115-120, aproximadamente 115-125, aproximadamente 115-140, aproximadamente 120-125, aproximadamente 120-130, aproximadamente 120-145, aproximadamente 125-130, aproximadamente 125-135, aproximadamente 125-150, aproximadamente 130-135, aproximadamente 130-140, aproximadamente 130-155, aproximadamente 135-140, aproximadamente 135-145, aproximadamente 135-160, aproximadamente 140-145, aproximadamente 140-150, aproximadamente 140-165, aproximadamente 145-150, aproximadamente 145-155, aproximadamente 145-170, aproximadamente 150-155,

aproximadamente 150-160, aproximadamente 150-175, aproximadamente 155-160, aproximadamente 155-165, aproximadamente 160-165, aproximadamente 160-170, aproximadamente 165-170, aproximadamente 165-175 y aproximadamente 170-175 nucleótidos.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede localizarse cerca del extremo 5' del ITR de volteo en el vector. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede estar situado cerca del extremo 3' de la ITR de volteo en el vector. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede estar situado cerca del extremo 5' de la ITR de volteo en el vector. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede estar situado cerca del extremo 3' de la ITR de volteo en el

vector. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede estar situado entre el extremo 5' de la ITR de volteo y el extremo 3' de la ITR de volteo en el vector. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede estar situado entre (por ejemplo, a medio camino entre el extremo 5' de la ITR de volteo y el extremo 3' de la ITR de fracaso o el extremo 3' de la ITR de volteo y el extremo 5' de la ITR de fracaso), el extremo 3' de la ITR de volteo y el extremo 5' de la ITR de volteo en el vector.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo., un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede estar localizado dentro de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17,

aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30 o más de aproximadamente 30 nucleótidos corriente abajo o corriente arriba del extremo 5' o 3' de una ITR (por ejemplo, ITR de fracaso o volteo) en el vector.

Como otro ejemplo no limitante, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo., un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede estar situado dentro de aproximadamente 1-5, aproximadamente 1-10, aproximadamente 1-15, aproximadamente 1-20, aproximadamente 1-25, aproximadamente 1-30, aproximadamente 5-10, aproximadamente 5-15, aproximadamente 5-20, aproximadamente 5-25, aproximadamente 5-30, aproximadamente 10-15, aproximadamente 10-20, aproximadamente 10-25, aproximadamente 10-30, aproximadamente 15-20, aproximadamente 15-25, aproximadamente 15-30, aproximadamente 20-25, aproximadamente 20-30 o aproximadamente 25-30 nucleótidos corriente abajo o corriente arriba del extremo 5' o 3' de una ITR (por ejemplo., la ITR de volteo o fracaso) en el vector.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por

ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede localizarse dentro del primer aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25% o más de aproximadamente 25% de los nucleótidos corriente arriba del extremo 5' o 3' de una ITR (por ejemplo, ITR de volteo o de fracaso) en el vector.

Como otro ejemplo no limitante, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede localizarse con el primer aproximadamente 1-5%, aproximadamente 1-10%, aproximadamente 1-15%, aproximadamente 1-20%, aproximadamente 1-25%, aproximadamente 5-10%, aproximadamente 5-15%, aproximadamente 5-20%, aproximadamente 5-25%, aproximadamente 10-15%, aproximadamente 10-20%, aproximadamente 10-25%, aproximadamente 15-20%, aproximadamente 15-25%, o aproximadamente 20-25% corriente abajo del extremo 5' o 3' de una ITR (por ejemplo, ITR de volteo o de fracaso) en el vector.

IV.A.2 Promotores

En ciertos aspectos, la región de carga útil del

vector AAV comprende al menos un elemento para mejorar la especificidad del ácido nucleico y/o la expresión. Ejemplos no limitantes de elementos para mejorar la especificidad del ácido nucleico y la expresión incluyen, por ejemplo, promotores, ARNmi endógenos, elementos reguladores postranscripcionales (PRE, por sus siglas en inglés), secuencias de señalización de poliadenilación (Poly A) y potenciadores corriente arriba (USE), potenciadores de CMV e intrones. En ciertos aspectos, el potenciador es un potenciador CMV. En ciertos aspectos, el potenciador CMV comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 35.

La expresión del ácido nucleico de la presente descripción tras su administración o integración en el ADN genómico de una célula objetivo puede requerir un promotor específico, incluyendo, entre otros, un promotor específico de especie, inducible, específico de tejido o específico de ciclo celular (Parr *et al*., Nat. Med.3: 1145-9 (1997); cuyo contenido se incorpora aquí por referencia en su totalidad).

En ciertos aspectos, el promotor se considera eficaz cuando impulsa la expresión de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento transportado en la región de carga útil del vector AAV. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor considerado eficiente cuando impulsa

la expresión de la molécula terapéutica de la presente descripción en la célula objetivo (por ejemplo, fibroblasto, miocito, adipocito).

Los promotores pueden ser naturales o no naturales. Ejemplos no limitantes de promotores incluyen promotores virales y promotores de mamíferos. En ciertos aspectos, los promotores pueden ser promotores humanos. En ciertos aspectos, el promotor puede estar truncado. Los promotores que impulsan o promueven la expresión en la mayoría de los tejidos incluyen, entre otros, la subunidad la del factor de elongación humano (EF1a), el potenciador y/o promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV), la β-actina de pollo (CBA) y su derivado CAG, la β glucuronidasa (GUSB) o la ubiquitina C (UBC). En ciertos aspectos, el promotor es un potenciador temprano de CMV/promotor de β-actina de pollo (CAG), CAG, CBA, CMV, EF1α, EF1α con un potenciador de CMV, un promotor de CMV con un potenciador de CMV (CMVe/p), un promotor de CMV con un intrón SV40, o un promotor específico de tejido.

En ciertos aspectos, pueden usarse elementos de expresión específicos de tejido para restringir la expresión a ciertos tipos celulares, como, entre otros, promotores específicos de músculo, promotores de células B, promotores de monocitos, promotores de leucocitos, promotores de macrófagos, promotores de células acinares pancreáticas, promotores de células endoteliales, promotores de tejido pulmonar,

promotores de astrocitos o promotores del sistema nervioso que pueden usarse para restringir la expresión a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos.

Ejemplos no limitantes de promotores específicos de músculo incluyen el promotor de la creatina cinasa muscular de mamífero (MCK), el promotor de la desmina de mamífero (DES), el promotor de la HSA, el promotor de la HMCK7, el promotor de la dMCK, el promotor de la tMCK, promotor de CK8e, promotor de SPc5-12, promotor de SP-301, promotor de MH, promotor de Sk-CRM, o promotor de Sk-CRM4, promotor de troponina I de mamífero (TNNI2), y promotor de alfa-actina esquelética de mamífero (ASKA) (véase, por ejemplo., la Publicación de Patente de EE.UU. US 20110212529, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia en su totalidad). Ejemplos no limitantes de elementos de expresión específicos de tejido para neuronas incluyen enolasa específica de neurona (NSE, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena B (PDGF-β), sinapsina (Syn), proteína de unión a metil-CpG 2 (MeCP2), proteína cinasa II dependiente de Ca2+/calmodulina (CaMKII), receptor metabotrópico de glutamato 2 (mGluR2), neurofilamento ligero (NFL, por sus siglas en inglés) o pesado (NFH, por sus siglas en inglés), minigén β-globina ηβ2, preproencefalina (PPE, por sus siglas en inglés), encefalina (Enk, por sus siglas en inglés) y promotores del

transportador de aminoácidos excitatorios 2 (EAAT2, por sus siglas en inglés). Ejemplos no limitantes de elementos de expresión específicos de tejido para astrocitos incluyen promotores de proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés) y EAAT2. Un ejemplo no limitativo de elemento de expresión específico de tejido para oligodendrocitos incluye el promotor de la proteína básica de mielina (MBP, por sus siglas en inglés). Ejemplos no limitantes de elementos de expresión específicos de tejido para fibroblastos incluyen un promotor de la proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP2, por sus siglas en inglés), un promotor de la proteína de activación de fibroblastos (FAP, por sus siglas en inglés) y un promotor de la proteína 1 específica de fibroblastos (FSP1, por sus siglas en inglés).

Ejemplos no limitantes de elementos de expresión específicos de tejido para adipocitos incluyen un promotor de adiponectina y un promotor de proteína de unión a ácidos grasos de adipocitos (AP2).

En ciertos aspectos, el promotor puede tener menos de 1 kb. En ciertos aspectos, el promotor puede tener una longitud entre aproximadamente 15-20, aproximadamente 10-50, aproximadamente 20-30, aproximadamente 30-40, aproximadamente 40-50, aproximadamente 50-60, aproximadamente 50-100, aproximadamente 60-70, aproximadamente 70-80, aproximadamente 80-90, aproximadamente 90-100, aproximadamente 100-110,

aproximadamente 100-150, aproximadamente 110-120, aproximadamente 120-130, aproximadamente 130-140, aproximadamente 140-150, aproximadamente 150-160, aproximadamente 150-200, aproximadamente 160-170, aproximadamente 170-180, aproximadamente 180-190, aproximadamente 190-200, aproximadamente 200-210, aproximadamente 200-250, aproximadamente 210-220, aproximadamente 220-230, aproximadamente 230-240, aproximadamente 240-250, aproximadamente 250-260, aproximadamente 250-300, aproximadamente 260-270, aproximadamente 270-280, aproximadamente 280-290, aproximadamente 290-300, aproximadamente 200-300, aproximadamente 200-400, aproximadamente 200-500, aproximadamente 200-600, aproximadamente 200-700, aproximadamente 200-800, aproximadamente 300-400, aproximadamente 300-500, aproximadamente 300-600, aproximadamente 300-700, aproximadamente 300-800, aproximadamente 400-500, aproximadamente 400-600, aproximadamente 400-700, aproximadamente 400-800, aproximadamente 500-600, aproximadamente 500-700, aproximadamente 500-800, aproximadamente 600-700, aproximadamente 600-800 o aproximadamente 700-800 nucleótidos.

En ciertos aspectos, el promotor puede ser una combinación de dos o más componentes de los mismos o diferentes promotores de partida o parentales tales como, pero no

limitados a, CMV, CAG, EF1a, y CBA. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de CMV con potenciador temprano/pollo β actina (CAG), un promotor de CAG, un promotor de CBA, un promotor de CMV humano, un promotor de CMV de ratón, un promotor de EF1α, un promotor de EF1α con un potenciador de CMV, un promotor de CMV con un potenciador de CMV (CMVe/p), un promotor de CMV con un intrón de SV40. En ciertos aspectos, el promotor comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 47-51, 83, o 93.

En ciertos aspectos, cada componente del promotor puede tener una longitud de entre aproximadamente 200-300, aproximadamente 200-400, aproximadamente 200-500, aproximadamente 200-600, aproximadamente 200-700, aproximadamente 200-800, aproximadamente 300-400, aproximadamente 300-500, aproximadamente 300-600, aproximadamente 300-700, aproximadamente 300-800, aproximadamente 400-500, aproximadamente 400-600, aproximadamente 400-700, aproximadamente 400-800, aproximadamente 500-600, aproximadamente 500-700, aproximadamente 500-800, aproximadamente 600-700, aproximadamente 600-800 o aproximadamente 700-800 nucleótidos. En ciertos aspectos, el promotor es una combinación de una secuencia potenciadora CMV de 382 nucleótidos y una secuencia promotora CBA de 260 nucleótidos.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un promotor ubicuo. Ejemplos no limitantes de promotores ubicuos incluyen, por ejemplo, un promotor CMV humano, un promotor CMV de ratón, un promotor CBA (incluyendo derivados CAG, CBh, etc.), un promotor EF-la, un promotor PGK, un promotor UBC, un promotor GUSB (hGBp), y un promotor UCOE (promotor de HNRPA2B1-CBX3).

En ciertos aspectos, el promotor no es específico de la célula. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de ubiquitina c (UBC). El promotor UBC puede tener un tamaño de 300-350 nucleótidos. En ciertos aspectos, el promotor UBC tiene 332 nucleótidos. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de β-glucuronidasa (GUSB). El promotor GUSB puede tener un tamaño de 350-400 nucleótidos. En ciertos aspectos, el promotor de GUSB tiene 378 nucleótidos. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de luz de neurofilamento (NFL). El promotor NFL puede tener un tamaño de 600-700 nucleótidos. En ciertos aspectos, el promotor NFL tiene 650 nucleótidos. En ciertos aspectos, la construcción puede ser AAV-promotor-CMV/polinucleótido modulador de intrones de globina-RBG, donde el AAV puede ser auto complementario y el AAV puede ser el serotipo DJ.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un promotor Pol III. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un promotor PI. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende

un promotor FXN. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de fosfoglicerato cinasa 1 (PGK, por sus siglas en inglés). En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de β-actina de pollo (CBA). En ciertos aspectos, el promotor es un promotor CAG que es una construcción que comprende el potenciador de citomegalovirus (CMV) fusionado al promotor de beta-actina de pollo (CBA) con un intrón quimérico. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV). En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de citomegalovirus humano (CMV). En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de citomegalovirus de ratón (CMV). En ciertos aspectos, el promotor es un promotor CBA. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor EF1α. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor EF1α fusionado a un potenciador CMV. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor CMV fusionado a un potenciador CMV. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor CMV fusionado a un intrón SV40. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un promotor HI. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un promotor U6. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un promotor SP6. En ciertos aspectos, el promotor comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 34-38.

En ciertos aspectos, el promotor es un promotor

hepático o muscular. Ejemplos no limitantes de promotores hepáticos son la a-1-antitripsina humana (hAAT) y la globulina fijadora de tiroxina (TBG, por sus siglas en inglés). Ejemplos no limitantes de promotores del músculo esquelético incluyen Desmina, MCK o C5-12 sintético. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de ARN pol III. En ciertos aspectos, el promotor de ARN pol III es U6. En ciertos aspectos, el promotor de ARN pol III es HI. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende dos promotores. En ciertos aspectos, los promotores son un promotor EF1a y un promotor CMV. Ejemplos no limitantes de promotores de fibroblastos incluyen la proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP2), una proteína de activación de fibroblastos (FAP) y la proteína 1 específica de fibroblastos (FSP1).

Ejemplos no limitantes de promotores de adipocitos incluyen una adiponectina y una proteína de unión a ácidos grasos de adipocitos (AP2).

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un elemento potenciador, un promotor y/o un intrón 5'UTR. El elemento potenciador, también denominado en el presente documento "potenciador", puede ser, pero no se limita a, un potenciador de CMV, el promotor puede ser, pero no se limita a, un promotor de EF1α, CMV, CBA, UBC, GUSB, NSE, Sinapsina, MeCP2, y GFAP y el 5'UTR/intrón puede ser, pero no se limita a, SV40, CBA-MVM (virus de la minuta del ratón), β-globina

humana, cadena pesada de inmunoglobulina, una quimera entre el gen de la β-globina humana y la cadena pesada de inmunoglobina. En ciertos aspectos, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 46, 56, u 82. En ciertos aspectos, el potenciador es un potenciador de CMV. En ciertos aspectos, el potenciador CMV comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a SEC ID NO: 48. En ciertos aspectos, el potenciador, promotor y/o intrón usados en combinación pueden ser: (1) potenciador CMV, promotor CMV, intrón SV40 5'UTR; (2) potenciador CMV, promotor CBA, intrón SV 40 5'UTR; (3) potenciador CMV, promotor CBA, intrón CBA-MVM 5'UTR; (4) promotor UBC; (5) promotor GUSB; (6) promotor NSE; (7) promotor de Sinapsina; (8) promotor MeCP2, (9) promotor GFAP, (10) promotor HI; (11) promotor de U6; (12) promotor de CMV, potenciador de CMV; (13) promotor de EF1α, potenciador de CMV; o (14) promotor de CMV, intrón de SV40; (15) quimera de β-globina humana y cadena pesada de inmunoglobulina, promotor de EF1α, potenciador de CMV, promotor de CMV, intrón de SV40. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV). En ciertos aspectos, el intrón es un intrón de SV40, un intrón de MVM o un intrón de betaglobina humana en el vector. En ciertos aspectos, el promotor es un

promotor CBA. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor EF1α. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor CMV fusionado a un potenciador CMV. En ciertos aspectos, el promotor es un potenciador CMV fusionado a un promotor EF1α. En ciertos aspectos, el promotor es un promotor CMV fusionado a un intrón SV40. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un promotor de ingeniería. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un potenciador temprano CMV/promotor de β actina de pollo (CAG). En ciertos aspectos, el vector AAV comprende un promotor de una proteína expresada naturalmente.

IV.A.3 Regiones sin traducción (UTR, por sus siglas en inglés)

Por definición, las regiones no traducidas (UTR) de un gen se transcriben pero no se traducen. Por lo general, la 5' UTR comienza en el sitio de inicio de la transcripción y termina en el codón de inicio, y la 3' UTR comienza inmediatamente después del codón de detención y continúa hasta la señal de terminación de la transcripción.

Las características típicas de los genes expresados abundantemente en órganos objetivo específicos pueden modificarse en las UTR para mejorar la estabilidad y la producción del producto transcrito. En ciertos aspectos, una UTR 5' de ARNm normalmente expresado en el hígado (por ejemplo., albúmina, amiloide sérico A, apolipoproteína A/B/E, transferrina, alfa fetoproteína, eritropoyetina o factor VIII)

puede usarse en el vector AAV de la descripción para mejorar la expresión, por ejemplo., en tejido cerebral, y específicamente en células neuronales.

Las regiones 5' no traducidas (UTR) de tipo salvaje incluyen características que desempeñan un papel en la iniciación de la traducción. Las secuencias Kozak, que se sabe que intervienen en el proceso por el que el ribosoma inicia la traducción de muchos genes, suelen estar incluidas en las 5' UTR. Las secuencias Kozak tienen el consenso CCR(A/G)CCAUGG, donde R es una purina (adenina o guanina) tres bases corriente arriba del codón de inicio (ATG), que va seguido de otra 'G. En ciertos aspectos, la 5' UTR en un vector AAV de la presente descripción incluye una secuencia Kozak. En ciertos aspectos, la 5' UTR en un vector AAV de la presente descripción no incluye una secuencia Kozak.

Se sabe que las UTR 3' de tipo salvaje contienen tramos de adenosinas y uridinas. Estas firmas ricas en AU son particularmente frecuentes en genes con altas tasas de recambio. Basándose en sus características de secuencia y propiedades funcionales, los elementos ricos en AU (ARE, por sus siglas en inglés) pueden separarse en tres clases (Chen *et al*, 1995, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia en su totalidad). Los ARE de clase I, como c-Myc y MyoD entre otros, contienen varias copias dispersas de un motivo AUUUA, como, entre otros, GM-CSF e IGFR-α poseen dos o más nonámeros

UUAUUUA(U/A)(U/A) superpuestos. Los ARES de clase III, como c-Jun y miogenina, entre otros, están menos definidos. Estas regiones ricas en U no contienen un motivo AUUUA. Se sabe que la mayoría de las proteínas que se unen a los ARE desestabilizan el mensajero, mientras que se ha documentado que los miembros de la familia ELAV, sobre todo HuR, aumentan la estabilidad del ARNm. HuR se une a ARE de las tres clases. La ingeniería de los sitios de unión específicos de HuR en la UTR 3' de las moléculas de ácido nucleico conducirá a la unión de HuR y, por tanto, a la estabilización del mensaje *in vivo*.

La introducción, eliminación o modificación de elementos ricos en AU (ARE) 3' UTR puede usarse para modular la estabilidad de los polinucleótidos. Cuando se diseñan polinucleótidos específicos, por ejemplo, regiones de carga útil de genomas virales, se pueden introducir una o más copias de un ARE para que los polinucleótidos sean menos estables y, por tanto, se reduzca la traducción y disminuya la producción de la proteína resultante. Del mismo modo, los ARE pueden identificarse y eliminarse o mutarse para aumentar la estabilidad intracelular y aumentar así la traducción y la producción de la proteína resultante.

En ciertos aspectos, la UTR 3' de un vector AAV de la presente descripción puede incluir una secuencia oligo(dT) para la adición de una cola poli-A.

En ciertos aspectos, un vector AAV de la presente

descripción puede modificarse para incluir, alterar o eliminar al menos un sitio, secuencia o región semilla de unión a ARNmi.

Cualquier UTR de cualquier gen conocido en la técnica puede incorporarse a un vector AAV de la presente descripción. Estas UTR, o porciones de las mismas, pueden colocarse en la misma orientación que en el gen del que se seleccionaron o pueden alterarse en orientación o ubicación. En ciertos aspectos, la UTR usada en un vector AAV de la presente descripción puede invertirse, acortarse, alargarse, hacerse con otra u otras UTR 5' o UTR 3' conocidas en la técnica. Como se usa en el presente documento, el término "alterado" en relación con una UTR, significa que la UTR se ha cambiado de alguna manera en relación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, una UTR 3' o 5' puede alterarse en relación con una UTR de tipo salvaje o nativa mediante el cambio de orientación o ubicación como se ha enseñado anteriormente o puede alterarse mediante la inclusión de nucleótidos adicionales, deleción de nucleótidos, intercambio o transposición de nucleótidos. En ciertos aspectos, un vector AAV de la presente descripción comprende al menos una UTR artificial, que no es una variante de una UTR de tipo salvaje. En ciertos aspectos, un vector AAV de la presente descripción comprende UTR, que se han seleccionado de una familia de transcritos cuyas proteínas comparten una función, estructura, característica o propiedad común.

IV.A.4 Secuencia de poliadenilación

En ciertos aspectos, los vectores AAV de la presente descripción comprenden al menos una secuencia de poliadenilación. Los vectores AAV de la presente descripción pueden comprender una secuencia de poliadenilación entre el extremo 3' de la secuencia de codificación de la carga útil y el extremo 5' de la ITR 3'.

En ciertos aspectos, la secuencia de poliadenilación o "secuencia poliA" puede oscilar entre ausente y aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

En ciertos aspectos, la secuencia de poliadenilación es de aproximadamente 10-100, aproximadamente 10-90, aproximadamente 10-80, aproximadamente 10-70, aproximadamente 10-60, aproximadamente 10-55, aproximadamente 10-50, aproximadamente 20-100, aproximadamente 20-90, aproximadamente 20-80, aproximadamente 20-70, aproximadamente 20-60, aproximadamente 20-55, aproximadamente 20-50, aproximadamente 30-100, aproximadamente 30-90, aproximadamente 30-80, aproximadamente 30-70, aproximadamente 30-60, aproximadamente 30-55, aproximadamente 30-50, aproximadamente 40-100, aproximadamente 40-90, aproximadamente 40-80, aproximadamente 40-70, aproximadamente 40-60, aproximadamente 40-55, aproximadamente 40-50, aproximadamente 45-100, aproximadamente 45-90, aproximadamente 45-80, o aproximadamente 45-70, aproximadamente 45-60, aproximadamente 45-55, aproximadamente

45-50 nucleótidos de longitud. En ciertos aspectos, la secuencia de poliadenilación tiene aproximadamente 49 nucleótidos de longitud.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede situarse corriente arriba de la secuencia de poliadenilación en el vector. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede estar situado corriente abajo de un promotor tal como, pero no limitado a, EF1α, CMV, U6, CAG, CBA EF1α con un potenciador CMV, promotor CMV con un intrón SV40, promotor CMV con un potenciador CMV, o un promotor CBA con un intrón SV40, intrón MVM un intrón de betaglobina humana, intrón de cadena pesada de inmunoglobulina, o una quimera de un intrón de betaglobina humana y un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina en el vector.

En ciertos aspectos, el vector AAV de la presente descripción comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, que puede estar situado dentro de

aproximadamente 1-5, aproximadamente 1-10, aproximadamente 1-15, aproximadamente 1-20, aproximadamente 1-25, aproximadamente 1-30, aproximadamente 5-10, aproximadamente 5-15, aproximadamente 5-20, aproximadamente 5-25, aproximadamente 5-30, aproximadamente 10-15, aproximadamente 10-20, aproximadamente 10-25, aproximadamente 10-30, aproximadamente 15-20, aproximadamente 15-25, aproximadamente 15-30, aproximadamente 20-25, aproximadamente 20-30 o aproximadamente 25-30 nucleótidos corriente abajo del promotor y/o corriente arriba de la secuencia de poliadenilación en el vector.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia señal de poliadenilación (poli A) de globina de conejo. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia señal de poliadenilación (poli A) de la hormona de crecimiento humana. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia señal de poliadenilación (poli A) de la hormona de crecimiento bovina. En ciertos aspectos, la secuencia señal poli A tiene una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 52 o 53.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia señal de poliadenilación de SV40 (SV40 pA), una secuencia señal de poliadenilación de hormona de crecimiento

bovina (bGHpA), o una secuencia señal de poliadenilación de hormona de crecimiento humana (hGHpA).

IV.A.5 Intrones

En ciertos aspectos, la región de carga útil de un vector AAV de la presente descripción comprende al menos un elemento para mejorar la expresión, como uno o más intrones o porciones de los mismos. Entre los ejemplos no limitantes de intrones se incluyen MVM (67-97 pb), intrón 1 truncado F.IX (300 pb), aceptor de empalme de cadena pesada de β-globina SD/inmunoglobulina (250 pb), donante de empalme de adenovirus/aceptante de empalme de inmunoglobina (500 pb), donante de empalme tardío de SV40/aceptante de empalme (19S/16S) (180 pb) y donante de empalme de adenovirus híbrido/aceptante de empalme de IgG (230 pb).

En ciertos aspectos, el intrón o la porción de intrón puede tener una longitud de entre 100 y 500 nucleótidos. En ciertos aspectos, el intrón puede tener una longitud entre aproximadamente 80-100, aproximadamente 80-120, aproximadamente 80-140, aproximadamente 80-160, aproximadamente 80-180, aproximadamente 80-200, aproximadamente 80-250, aproximadamente 80-300, aproximadamente 80-350, aproximadamente 80-400, aproximadamente 80-450, aproximadamente 80-500, aproximadamente 200-300, aproximadamente 200-400, aproximadamente 200-500, aproximadamente 300-400,

aproximadamente 300-500, o aproximadamente 400-500 nucleótidos.

En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender un promotor tal como, pero no limitado a, CMV o U6. En ciertos aspectos, el promotor para un vector AAV de la presente descripción es un promotor CMV. En ciertos aspectos, el promotor para un vector AAV de la presente descripción es un promotor de CMV potenciador temprano/pollo β actina (CAG). Como otro ejemplo no limitante, el promotor para un vector AAV de la presente descripción es un promotor U6. En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender un CMV y un promotor U6. En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender un promotor HI. En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender un promotor CBA. En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender un intrón quimérico. En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender un intrón SV40. En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina. En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender un intrón de betaglobina humana. En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender una quimera de un intrón de betaglobina humana y un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina.

En ciertos aspectos, el promotor es un potenciador temprano de CMV/promotor de β actina de pollo (CAG), EF1α, CMV humano, CMV de ratón, promotor de EF1α fusionado a un

potenciador de CMV, promotor de CMV fusionado a un intrón de SV40, promotor de CMV fusionado a un potenciador de CMV, o un promotor específico de tejido. En ciertos aspectos, el promotor comprende una secuencia de nucleótidos al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de las SEC ID NOs:47-51.

En ciertos aspectos, el anticuerpo codificado (por ejemplo., un anticuerpo monoclonal) o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento puede situarse corriente abajo de un promotor en un vector de expresión tal como, pero no limitado a, CMV, U6, HI, CBA, CAG, o un promotor CBA con un intrón tal como SV40, intrón MVM, un intrón de betaglobina humana, intrón de cadena pesada de inmunoglobulina humana, una quimera de un intrón de betaglobina humana y un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina humana, u otros conocidos en la técnica. En ciertos aspectos, el intrón se selecciona del grupo que consiste en un intrón de SV40, un intrón de MVM, un intrón de betaglobina humana, un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina humana, o una quimera de un intrón de cadena pesada de inmunoglobulina humana y un intrón de betaglobina humana. En ciertos aspectos, el intrón comprende una secuencia nucleotídica al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a cualquiera de los SEC ID NOs: 46, 56, u 82.

Además, el anticuerpo codificado o el fragmento de

unión a antígeno del mismo también puede situarse corriente arriba de la secuencia de poliadenilación en un vector de expresión. En ciertos aspectos, la proteína terapéutica codificada, por ejemplo, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o fragmento de unión a antígeno del mismo o la proteína de fusión (por ejemplo, La proteína de fusión (por ejemplo, la proteína de fusión Fc) descrita en el presente documento, o el péptido terapéutico puede localizarse en un intervalo de aproximadamente 1-5, aproximadamente 1-10, aproximadamente 1-15, aproximadamente 1-20, aproximadamente 1-25, aproximadamente 1-30, aproximadamente 5-10, aproximadamente 5-15, aproximadamente 5-20, aproximadamente 5-25, aproximadamente 5-30, aproximadamente 10-15, aproximadamente 10-20, aproximadamente 10-25, aproximadamente 10-30, aproximadamente 15-20, aproximadamente 15-25, aproximadamente 15-30, aproximadamente 20-25, aproximadamente 20-30 o aproximadamente 25-30 nucleótidos corriente abajo del promotor y/o corriente arriba de la secuencia de poliadenilación en el vector.

IV.A.6 Secuencias de relleno

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una o más secuencias de relleno (también denominadas "secuencias de relleno"). En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una o más secuencias de relleno para que la longitud del vector AAV sea del tamaño óptimo para el empaquetado. En ciertos aspectos,

el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno para que la longitud del vector AAV sea de aproximadamente 2.0-2.5 kb, por ejemplo, aproximadamente 2. kb. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno para que la longitud del vector AAV sea de aproximadamente 4.6 kb. En ciertos aspectos, la columna vertebral del vector comprende una secuencia de relleno.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una o más secuencias de relleno para reducir la probabilidad de que una estructura de horquilla del genoma del vector (por ejemplo, un polinucleótido modulador descrito en el presente documento) pueda leerse como una repetición terminal invertida (ITR) durante la expresión y/o empaquetado. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno para que la longitud del vector AAV sea de aproximadamente 2.0-2.5 kb, por ejemplo, aproximadamente 2.3 kb. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno para que la longitud del vector AAV sea de aproximadamente 4.6 kb.

En ciertos aspectos, el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ss, por sus siglas en inglés) y comprende una o más secuencias de relleno que tienen una longitud de aproximadamente entre 0.1 kb y aproximadamente 3.8 kb, tales como, pero no limitadas a, aproximadamente 0.1 kb, aproximadamente 0.2 kb, aproximadamente 0.3 kb, aproximadamente 0.4 kb, aproximadamente 0.5 kb,

aproximadamente 0.6 kb, aproximadamente 0.7 kb, aproximadamente 0.8 kb, aproximadamente 0,9 kb, aproximadamente 1 kb, aproximadamente 1.1 kb, aproximadamente 1.2 kb, aproximadamente 1.3 kb, aproximadamente 1.4 kb, aproximadamente 1.6 kb, aproximadamente 1.7 kb, aproximadamente 1.8 kb, aproximadamente 1.9 kb, aproximadamente 2 kb, aproximadamente 2.1 kb, aproximadamente 2.2 kb, aproximadamente 2.3 kb, aproximadamente 2.4 kb, aproximadamente 2.5 kb, aproximadamente 2.6 kb, aproximadamente 2.7 kb, aproximadamente 2.8 kb, aproximadamente 2.9 kb, aproximadamente 3 kb, aproximadamente 3.1 kb, aproximadamente 3.2 kb, aproximadamente 3.3 kb, aproximadamente 3.4 kb, aproximadamente 3.5 kb, aproximadamente 3.6 kb, aproximadamente 3.7 kb o aproximadamente 3.8 kb.

En ciertos aspectos, el vector AAV es un vector AAV autocomplementario (sc, por sus siglas en inglés) y comprende una o más secuencias de relleno que tienen una longitud de aproximadamente entre aproximadamente 0.1 kb y aproximadamente 1.5 kb, tales como, pero no limitadas a, aproximadamente 0.1 kb.1 kb, aproximadamente 0.2 kb, aproximadamente 0.3 kb, aproximadamente 0.4 kb, aproximadamente 0.5 kb, aproximadamente 0.6 kb, aproximadamente 0.7 kb, aproximadamente 0.8 kb, aproximadamente 0.9 kb, aproximadamente 1 kb, aproximadamente 1.1 kb, aproximadamente

1.2 kb, aproximadamente 1.3 kb, aproximadamente 1.4 kb, o aproximadamente 1.5 kb.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende cualquier porción de una secuencia de relleno. El vector puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95% o aproximadamente 99% de una secuencia de relleno.

En ciertos aspectos, el vector AAV es un vector AAV monocatenario (ss) y comprende una o más secuencias de relleno para que la longitud del vector AAV sea de aproximadamente 4,6 kb. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno y la secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia 5' ITR. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno y la secuencia de relleno está situada 5' a una secuencia promotora. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno y la secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia

de señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno y la secuencia de relleno está situada 5' a la secuencia 3' ITR. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno, y la secuencia de relleno está situada entre dos secuencias intrón. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno, y la secuencia de relleno está situada dentro de una secuencia intrón. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende dos secuencias de relleno, y la primera secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia 5' ITR y la segunda secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia de señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende dos secuencias de relleno, y la primera secuencia de relleno está situada 5' a una secuencia promotora y la segunda secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende dos secuencias de relleno, y la primera secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia 5' ITR y la segunda secuencia de relleno está situada 5' a la secuencia 5' ITR.

En ciertos aspectos, el vector AAV es un vector AAV autocomplementario (sc) y comprende una o más secuencias de relleno para que la longitud del vector AAV sea de aproximadamente 2.3 kb. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno y la secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia 5' ITR. En ciertos

aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno y la secuencia de relleno está situada 5' a una secuencia promotora. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno y la secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia de señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno y la secuencia de relleno está situada 5' a la secuencia 3' ITR.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno, y la secuencia de relleno está situada entre dos secuencias intrón. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende al menos una secuencia de relleno, y la secuencia de relleno está situada dentro de una secuencia intrón. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende dos secuencias de relleno, y la primera secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia 5' ITR y la segunda secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia de señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende dos secuencias de relleno, y la primera secuencia de relleno está situada 5' a una secuencia promotora y la segunda secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende dos secuencias de relleno, y la primera secuencia de relleno está situada 3' a la secuencia 5' ITR y la segunda secuencia de relleno está situada 5' a la secuencia 5' ITR.

En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender una o más secuencias de relleno entre una o más regiones del vector AAV. En ciertos aspectos, la región de relleno puede situarse antes de una región tal como, pero no limitada a, una región de carga útil, una ITR, una región promotora, una región de intrón, una región potenciadora, y/o una región de secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, la región de relleno puede situarse después de una región tal como, pero no limitada a, una región de carga útil, una ITR, una región promotora, una región intrón, una región potenciadora y/o una región de secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, la región de relleno puede situarse antes y después de una región como, por ejemplo, una región de carga útil, una ITR, una región promotora, una región intrónica, una región potenciadora y/o una región de secuencia señal de poliadenilación.

En ciertos aspectos, el vector AAV puede comprender una o más secuencias de relleno que bifurcan al menos una región del vector AAV. La región bifurcada del vector AAV puede comprender aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%,

aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% de la región al 5' de la región de la secuencia de relleno.

En ciertos aspectos, la secuencia de relleno puede bifurcar al menos una región de modo que aproximadamente el 10% de la región esté situada a 5' de la secuencia de relleno y aproximadamente el 90% de la región esté situada a 3' de la secuencia de relleno. En ciertos aspectos, la secuencia de relleno puede bifurcar al menos una región de modo que aproximadamente el 20% de la región esté situada a 5' de la secuencia de relleno y aproximadamente el 80% de la región esté situada a 3' de la secuencia de relleno. En ciertos aspectos, la secuencia de relleno puede bifurcar al menos una región de manera que aproximadamente el 30% de la región esté situada a 5' de la secuencia de relleno y aproximadamente el 70% de la región esté situada a 3' de la secuencia de relleno. En ciertos aspectos, la secuencia de relleno puede bifurcar al menos una región de modo que aproximadamente el 40% de la región esté situada a 5' de la secuencia de relleno y aproximadamente el 60% de la región esté situada a 3' de la secuencia de relleno. En ciertos aspectos, la secuencia de relleno puede bifurcar al menos una región de modo que aproximadamente el 50% de la región esté situada a 5' de la secuencia de relleno y

aproximadamente el 50% de la región esté situada a 3' de la secuencia de relleno. En ciertos aspectos, la secuencia de relleno puede bifurcar al menos una región de modo que aproximadamente el 60% de la región esté situada a 5' de la secuencia de relleno y aproximadamente el 40% de la región esté situada a 3' de la secuencia de relleno. En ciertos aspectos, la secuencia de relleno puede bifurcar al menos una región de modo que aproximadamente el 70% de la región esté situada a 5' de la secuencia de relleno y aproximadamente el 30% de la región esté situada a 3' de la secuencia de relleno. En ciertos aspectos, la secuencia de relleno puede bifurcar al menos una región de modo que aproximadamente el 80% de la región esté situada a 5' de la secuencia de relleno y aproximadamente el 20% de la región esté situada a 3' de la secuencia de relleno. En ciertos aspectos, la secuencia de relleno puede bifurcar al menos una región de modo que aproximadamente el 90% de la región esté situada a 5' de la secuencia de relleno y aproximadamente el 10% de la región esté situada a 3' de la secuencia de relleno.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno después de la 5' ITR. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno después de la región promotora. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno después de la región de carga útil. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de

relleno después de la región intrón. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno después de la región potenciadora. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno después de la región de la secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno antes de la región promotora. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno antes de la región de carga útil. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno antes de la región intrón.

En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno antes de la región potenciadora. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno antes de la región de la secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, el vector AAV comprende una secuencia de relleno antes de la 3' ITR. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la 5' ITR y la región promotora. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la 5' ITR y la región de carga útil.

En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la 5' ITR y la región intrón. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones,

tales como, pero no limitadas a, la 5' ITR y la región potenciadora. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar localizada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la 5' ITR y la región de la secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede situarse entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región promotora y la región de carga útil.

En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región promotora y la región intrónica. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región promotora y la región potenciadora. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región promotora y la región de la secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región promotora y la 3' ITR.

En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región de carga útil y la región intrónica. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región de carga útil y la región potenciadora. En ciertos aspectos, una

secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región de carga útil y la región de la secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región de carga útil y la 3' ITR.

En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región del intrón y la región potenciadora. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región del intrón y la región de la secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región del intrón y la 3' ITR. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región potenciadora y la región de la secuencia señal de poliadenilación. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región potenciadora y la 3' ITR. En ciertos aspectos, una secuencia de relleno puede estar situada entre dos regiones, tales como, pero no limitadas a, la región de la secuencia señal de poliadenilación y la 3' ITR.

En ciertos aspectos, un vector AAV puede comprender

dos secuencias de relleno. Las dos secuencias de relleno pueden estar situadas entre dos regiones como se describe en el presente documento.

IV.A.7 Método de producción de AAV recombinantes

La presente descripción proporciona también métodos para la generación de partículas AAV, por replicación del genoma viral en una célula de replicación viral que comprende el contacto de la célula de replicación viral con un polinucleótido AAV o genoma AAV (por ejemplo, un vector AAV de la presente descripción). En el contexto de la presente descripción, los vectores AAV descritos en el presente documento, por ejemplo, los vectores AAV que comprenden al menos un polinucleótido que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento se consideran vectores de construcción de carga útil AAV.

En ciertos aspectos, una partícula AAV se produce mediante un método que comprende los pasos de: (1) co-transfectar células bacterianas competentes con un vector bacmídico y un vector de construcción viral y/o un vector de construcción de carga útil de AAV, (2) aislar el vector de expresión de construcción viral y el vector de expresión de carga útil de AAV resultantes y transfectar por separado células de replicación viral, (3) aislar y purificar la carga

útil resultante y las partículas de construcción viral que comprenden el vector de expresión de construcción viral o el vector de expresión de construcción de carga útil AAV, (4) co-infectar una célula de replicación viral con la carga útil AAV y las partículas de construcción viral que comprenden el vector de expresión de construcción viral o el vector de expresión de construcción de carga útil AAV, y (5) cosechar y purificar la partícula viral que comprende un genoma parvoviral.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir una partícula AAV que comprende los pasos de (1) co-transfectar simultáneamente células de mamífero, tales como, pero no limitadas a células HEK293, con una región de carga útil (por ejemplo, polinucleótido que codifica una proteína terapéutica o péptido terapéutico de la descripción), una construcción que expresa genes rep y cap y una construcción auxiliar, y (2) cosechar y purificar la partícula AAV que comprende un genoma viral.

En ciertos aspectos, las partículas AAV pueden producirse en una célula de replicación viral que comprende una célula de insecto. Las condiciones de crecimiento de células de insecto en cultivo y la producción de productos heterólogos en células de insecto en cultivo son bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 6,204,059.

La célula de replicación viral puede seleccionarse

de cualquier organismo biológico, incluyendo células procariotas (por ejemplo, bacterianas) y células eucariotas, incluyendo células de insecto, células de levadura y células de mamífero. Las células de replicación viral pueden comprender células de mamífero como A549, WEH1, 3T3, 10T1/2, BHK, MDCK, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO. W138, HeLa, HEK293, Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2 y células primarias de fibroblastos, hepatocitos y mioblastos derivadas de mamíferos. Las células de replicación viral comprenden células derivadas de especies de mamíferos, incluyendo, pero sin limitarse a, humanos, monos, ratones, ratas, conejos y hámsteres o tipos de células, incluyendo pero sin limitarse a fibroblastos, hepatocitos, células tumorales, células transformadas de líneas celulares, etc.

La producción viral descrita en el presente documento describe procesos y métodos para producir partículas AAV que entran en contacto con una célula objetivo para entregar una carga útil, por ejemplo, una construcción viral recombinante, que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una carga útil tal como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento.

En ciertos aspectos, las partículas AAV pueden producirse en una célula de replicación viral que comprende una célula de mamífero. Las células de replicación viral

comúnmente usadas para la producción de partículas AAV recombinantes incluyen, entre otras, células 293, células COS, células HeLa y células KB.

En ciertos aspectos, las partículas AAV se producen en células de mamífero en las que las tres proteínas VP se expresan en una estequiometría cercana a 1:1:10 (VP1:VP2:VP3). Los mecanismos reguladores que permiten este nivel controlado de expresión incluyen la producción de dos ARNm, uno para VP1, y el otro para VP2 y VP3, producidos por empalme diferencial.

En ciertos aspectos, las partículas AAV se producen en células de mamífero usando un método de transfección triple en el que un constructo de carga útil, parvoviral Rep y parvoviral Cap y un constructo auxiliar están comprendidos en tres constructos diferentes. El método de transfección triple de los tres componentes de la producción de partículas AAV puede usarse para producir pequeños lotes de virus para ensayos que incluyen la eficacia de transducción, la evaluación del tejido objetivo (tropismo) y la estabilidad.

En ciertos aspectos, el vector de construcción viral y el vector de construcción de carga útil AAV pueden incorporarse cada uno mediante un sistema donante/aceptor de transposón en un bacmido, también conocido como plásmido de baculovirus, mediante técnicas de biología molecular estándar conocidas y realizadas por un experto en la materia. La transfección de poblaciones celulares de replicación viral

separadas produce dos baculovirus, uno que comprende el vector de expresión de la construcción viral y otro que comprende el vector de expresión de la carga útil AAV. Los dos baculovirus pueden usarse para infectar una única población de células de replicación viral para la producción de partículas AAV.

Los vectores de expresión de baculovirus para producir partículas virales en células de insecto, incluidas, entre otras, las células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9), proporcionan títulos elevados de producto de partículas virales. El baculovirus recombinante que codifica el vector de expresión del constructo viral y el vector de expresión del constructo de carga útil AAV inicia una infección productiva de células replicantes virales. Las partículas infecciosas de baculovirus liberadas de la infección primaria infectan secundariamente células adicionales del cultivo, infectando exponencialmente toda la población del cultivo celular en un número de ciclos de infección que es función de la multiplicidad inicial de la infección, véase, por ejemplo, Urabe, M. *et al*., *J Virol*. 2006 Feb; 80 (4): 1874-85, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

La producción de partículas AAV con baculovirus en un sistema de células de insecto puede resolver la conocida inestabilidad genética y física de los baculovirus. Las células productoras de virus infectadas por baculovirus se recogen en alícuotas que pueden crio conservarse en nitrógeno líquido;

las alícuotas conservan la viabilidad y la infectividad para la infección de cultivos celulares productores de virus a gran escala (Wasilko DJ *et al*., Protein Expr Purif. 2009 Jun; 65(2): 122-32).

En ciertos aspectos, las células de replicación vírica estable permisivas para la infección por baculovirus se diseñan con al menos una copia integrada estable de cualquiera de los elementos necesarios para la replicación de AAV y la producción de partículas víricas, incluidos, entre otros, el genoma completo de AAV, los genes Rep y Cap, los genes Rep, los genes Cap, cada proteína Rep como un casete de transcripción independiente, cada proteína VP como un casete de transcripción independiente, la AAP (proteína de activación del ensamblaje) o al menos uno de los genes ayudantes de baculovirus con promotores nativos o no nativos.

En ciertos aspectos, la producción de partículas de AAV puede modificarse para aumentar la escala de producción. La transfección de células de replicación en formatos de cultivo a gran escala puede llevarse a cabo según cualquier método conocido en la técnica.

En ciertos aspectos, los biorreactores de cultivo celular pueden usarse para la producción viral a gran escala. En algunos casos, los biorreactores comprenden reactores de tanque agitado.

IV.A.8 Lisis celular

Las células de la descripción, incluidas, entre otras, las células de producción viral, pueden someterse a lisis celular según cualquier método conocido en la técnica. La lisis celular puede llevarse a cabo para obtener uno o más agentes (por ejemplo, partículas virales) presentes dentro de cualquier célula de la descripción.

Los métodos de lisis celular pueden ser químicos o mecánicos. La lisis celular química comprende normalmente el contacto de una o más células con uno o más agentes de lisis. La lisis mecánica comprende típicamente someter una o más células a una o más condiciones de lisis y/o una o más fuerzas de lisis. En ciertos aspectos, la lisis química puede usarse para lisar células. Como se usa en el presente documento, el término "agente de lisis" se refiere a cualquier agente que pueda ayudar en la disrupción de una célula. En algunos casos, los agentes de lisis se introducen en soluciones, denominadas soluciones de lisis o amortiguadores de lisis. Como se usa en el presente documento, el término "solución de lisis" se refiere a una solución (típicamente acuosa) que comprende uno o más agentes de lisis. Además de los agentes de lisis, las soluciones de lisis pueden incluir uno o más agentes amortiguadores, agentes solubilizantes, agentes tensioactivos, conservadores, crioprotectores, enzimas, inhibidores enzimáticos y/o quelantes.

Las concentraciones de sales pueden aumentarse o

disminuirse para obtener una concentración eficaz para la ruptura de las membranas celulares. Los agentes de lisis que comprenden detergentes pueden incluir detergentes iónicos o detergentes no iónicos. Los detergentes pueden funcionar para romper o disolver estructuras celulares incluyendo, pero sin limitarse a, membranas celulares, paredes celulares, lípidos, carbohidratos, lipoproteínas y glicoproteínas.

En ciertos aspectos, se lleva a cabo la lisis celular mecánica. Los métodos de lisis celular mecánica pueden incluir el uso de una o más condiciones de lisis y/o una o más fuerzas de lisis. Como se usa en el presente documento, el término "condición de lisis" se refiere a un estado o circunstancia que promueve la disrupción celular. Las condiciones de lisis pueden comprender ciertas temperaturas, presiones, pureza osmótica, salinidad y similares. En ciertos aspectos, las condiciones de lisis comprenden temperaturas aumentadas o disminuidas. En ciertos aspectos, las condiciones de lisis comprenden cambios de temperatura para promover la disrupción celular. La lisis celular llevada a cabo según tales aspectos puede incluir lisis por congelación-descongelación.

Como se usa en el presente documento, el término "fuerza de lisis" se refiere a una actividad física usada para desorganizar una célula. Las fuerzas de lisis pueden incluir, entre otras, fuerzas mecánicas, sónicas, gravitacionales, ópticas, eléctricas y similares. La lisis celular llevada a

cabo por fuerza mecánica se denomina en el presente documento "lisis mecánica". Las fuerzas mecánicas que pueden usarse según la lisis mecánica pueden incluir fuerzas de fluido de alto cizallamiento.

En ciertos aspectos, puede usarse un método para cosechar partículas AAV sin lisis para la producción eficiente y escalable de partículas AAV. En un ejemplo no limitante, las partículas AAV pueden producirse cultivando una partícula AAV que carece de un sitio de unión a heparina, permitiendo así que la partícula AAV pase al sobrenadante, en un cultivo celular, recogiendo sobrenadante del cultivo; y aislando la partícula AAV del sobrenadante, como se describe en la solicitud de patente estadounidense 20090275107.

IV.A.9 Purificación de AAV

Los lisados celulares que contienen partículas víricas pueden someterse a clarificación. La clarificación se refiere a los pasos iniciales que se dan en la purificación de partículas víricas a partir de lisados celulares. La clarificación sirve para preparar los lisados para su posterior purificación mediante la eliminación de los restos insolubles de mayor tamaño. Los pasos de clarificación pueden incluir, entre otros, la centrifugación y la filtración.

En ciertos aspectos, las partículas AAV pueden purificarse a partir de lisados celulares clarificados mediante uno o más métodos de cromatografía. La cromatografía se refiere

a cualquier número de métodos conocidos en la técnica para separar uno o más elementos de una mezcla. Tales métodos pueden incluir, entre otros, cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico), cromatografía de inmunoafinidad y cromatografía de exclusión por tamaño.

V. Métodos de tratamiento y uso

Ciertos aspectos de la descripción se dirigen al uso de polinucleótidos (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos), vectores y rAAV para tratar a un sujeto que los necesite. Algunos aspectos de la presente descripción se dirigen a un método de administración de una terapia génica que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto que lo necesita. En ciertos aspectos, el método comprende administrar al sujeto un vector de administración (por ejemplo, un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido, una partícula proteica, un vector bacteriano o un lisosoma). En ciertos aspectos, los métodos para descritos aquí comprenden la entrega o administración de un polinucleótido (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos), vector, rAAV, o composición descrita aquí a o cerca de un ojo (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro o periorbital, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo (por ejemplo, a un músculo elevador y/o un músculo glabelar), a tejido conectivo cerca del ojo, o

cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el tejido periorbital o retroorbital se selecciona entre músculo, tejido conjuntivo y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, la administración se realiza a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, la entrega o administración es a células fibroblásticas retro o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la entrega o administración es por inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo se expresa en el músculo, tejido conjuntivo o tejido adiposo. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R o el fragmento de unión a antígeno del mismo se produce en el músculo, el tejido

conjuntivo y el tejido adiposo.

En ciertos aspectos, los métodos que comprenden la administración de una terapia génica que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.), o un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de IL-2 o IL-10).

En ciertos aspectos, los métodos comprenden administrar una construcción de terapia génica que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo, teprotumumab) es una construcción multicistrónica (por ejemplo, bicistrónica) (por ejemplo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera).

En ciertos aspectos, la construcción multicistrónica (por ejemplo, bicistrónica) comprende además un elemento F2A o IRES.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotumumab, VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), ganitumab (AMG 479), figitumumab, CP-751,871, cixutumumab (AMG 655), IMC-A12, dalotuzumab, MK0646, RG1507, robatumumab, SCH 717454, AVE-1642a, MEDI-573, BIIB022, rhuMab IGFR, L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, o L52H52, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es VRDN-01100, o VRDN-02700, o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR comprende SEC ID NO: 113 (correspondiente a VRDN-01100). En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR comprende SEC ID NO: 116 (correspondiente a VRDN-002700).

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotumumab, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, la descripción se dirige a un método de administración de una terapia génica a un tejido

conectivo (por ejemplo, peritorbital, retroorbital). En ciertos aspectos, la terapia génica se administra periorbitalmente o retrobulbarmente (por ejemplo, por inyección) y a partir de entonces se produce un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo en un fibroblasto, miocito o adipocito. En ciertos aspectos, el efecto terapéutico del anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo es local, sistémico, o ambos.

En ciertos aspectos, la descripción se dirige a un método de administración de una terapia génica a un sujeto que la necesita, que comprende la administración mediante inyección a un tejido muscular, intralinfático, peritorbital o retrobulbar o a otro sitio de administración descrito en el presente documento. En ciertos aspectos, la administración es a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular.

Algunos aspectos de la presente descripción se dirigen a un método de administración de un ácido nucleico a una célula de un sujeto, que comprende administrar a un fibroblasto, célula muscular o adipocito del sujeto una cápside

de virus adeno-asociado (AAV) que comprende un ácido nucleico que comprende un promotor enlazado de forma operable a un polinucleótido que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, entregando así el ácido nucleico al fibroblasto, célula muscular o adipocito del sujeto.

En ciertos aspectos, los métodos aquí descritos pueden practicarse mediante la administración de la composición de terapia génica que comprende el polinucleótido (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo), vector, partícula rAAV, o composición de la presente descripción, una célula que comprende el polinucleótido (por ejemplo, (por ejemplo., casete de expresión de anticuerpo), vector o partícula de rAAV de la presente descripción, una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R alfa o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente descripción integrado en su ADN genómico, o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anteriores. Así, los métodos aquí descritos que recitan la administración del polinucleótido (por ejemplo., casete de expresión de anticuerpo), vector o partícula de rAAV de la presente descripción también pueden practicarse administrando cualquiera de estas composiciones.

En ciertos aspectos, los métodos aquí descritos

pueden practicarse mediante la administración de una composición de terapia génica que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R) o fragmentos de unión a antígeno del mismo.

En ciertos aspectos, los métodos aquí descritos pueden practicarse mediante la administración de una composición de terapia génica que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1, una CDR VH2, y una CDR VH3 y (ii) una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1, una CDR VL2, y una CDR VL3. En ciertos aspectos, las CDR 1-3 de VH y las CDR 1-3 de VL son de las CDR correspondientes de teprotumumab.

En ciertos aspectos, los métodos aquí descritos pueden practicarse mediante la administración de una composición de terapia génica que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que teprotumumab, VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), ganitumab (AMG 479), figitumumab, CP-751,871, cixutumumab (AMG 655), IMC-A12, dalotuzumab, MK0646, RG1507,

robatumumab, SCH 717454, AVE-1642a, MEDI-573, BIIB022, rhuMab IGFR, L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, o L52H52, o sus variantes.

En ciertos aspectos, los métodos aquí descritos pueden practicarse mediante la administración de una composición de terapia génica que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene la misma secuencia de aminoácidos que VRDN-01100, o VRDN-02700, o variante de la misma. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 113 (correspondiente a VRDN-01100). En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 116 (correspondiente a VRDN-002700).

En ciertos aspectos, los métodos aquí descritos pueden practicarse mediante la administración de una composición de terapia génica que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene la misma secuencia de

aminoácidos que el teprotumumab o una variante del mismo.

La señalización del factor de crecimiento insulínico (IGF) está mediada por los ligandos IGF1 e IGF2 y los receptores IGF-1R, IGF-2R y Receptor de Insulina (IR, por sus siglas en inglés). La señalización descendente del IGF-1R o del IR se produce a través de la proteína adaptadora sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1) que se une al receptor del factor de crecimiento activado para activar la vía de señalización de la fosfoinositida-3 cinasa. Se cree que el teprotumumab conduce a la activación del IGF-1R por el IGF e impide la fosforilación corriente abajo. En ciertos aspectos, la administración de la composición de terapia génica que comprende un casete de expresión de anticuerpos, un genoma de vector AAV o una partícula rAAV de la presente descripción puede conducir a la activación por IGF del IGF-1R y previene la fosforilación corriente abajo.

Basándose en los métodos aquí descritos, se contempla la composición de terapia génica que comprende un casete de expresión de anticuerpos, un genoma de vector AAV, o una partícula rAAV de la presente descripción para su uso en terapia, o para su uso como medicamento, o para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno de un sujeto que lo necesite. En algún aspecto, la enfermedad o trastorno a tratar es la Orbitopatía de Graves.

Se sabe que las células aisladas de la sangre

periférica en pacientes con Grave expresan varias citocinas proinflamatorias, como IL-1β, antagonista del receptor de IL-1, IL-6, IL-8 y TNFα y parece que se infiltran y adhieren al tejido orbital por la estimulación de la TSH (Chen, H., *et al*., (2014). El teprotumumab, un anticuerpo monoclonal bloqueante del IGF-1R inhibe la acción de la TSH y el IGF-1 en los fibrocitos. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 99(9),* E1635-E1640). Los estudios han informado de que los fibrocitos aislados de pacientes con Grave y tratados con teprotumumab *in vitro* atenúan los niveles de expresión y las vías de señalización de los receptores de IGF-1 y TSH (Pritchard, J., *et al*., (2003). Immunoglobulin activation of T cell chemoattractant expression in fibroblasts from patients with Graves' disease is mediated through the insulin-like growth factor I receptor pathway. *The Journal of Immunology,* 170(12), 6348-6354; Smith, T. J., *et al*., (2008). Unique attributes of orbital fibroblasts and global alterations in IGF-1 receptor signaling could explain thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid*, 18(9), 983-988; Chen, H., *et al*., (2014). Teprotumumab, an IGF-1R blocking monoclonal antibody inhibits TSH and IGF-1 action in fibrocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 99(9)*, E1635-E1640).

En ciertos aspectos, la administración de la composición de terapia génica que comprende un casete de expresión de anticuerpos, un genoma de vector AAV o una

partícula rAAV de la presente descripción puede inhibir la acción de TSH e IGF-1 en fibrocitos.

En ciertos aspectos, un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo, un vector vírico, un vector no vírico, un plásmido, un lípido o un lisosoma) que comprende un promotor enlazado de forma operable a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento puede administrarse a o cerca de un ojo (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro o periorbital, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo, al tejido conjuntivo cerca del ojo, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el tejido periorbital o retroorbital se selecciona entre músculo, tejido conjuntivo y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, la administración se realiza a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, la entrega o administración es a células fibroblásticas retro o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias, o cualquier

combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la entrega o administración es por inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones. En ciertos aspectos, el sujeto padece una enfermedad ocular tiroidea (TED) seleccionada del grupo que consiste en Orbitopatía de Graves activa y Orbitopatía de Graves crónica.

El teprotumumab no presenta reacción cruzada con el IFG-1R de roedores (tanto ratón como rata). El teprotumumab recombinante se ha probado usando el modelo de ratón xenoinjertado portador de una línea celular de carcinoma pulmonar humano, por ejemplo, sin mostrar diferencias significativas en el volumen tumoral, pero sí una reducción significativa en la expresión de la proteína IGF-1R. Así pues, los modelos de xenoinjertos de ratón pueden usarse para evaluar el volumen tumoral y/o la expresión de la proteína IGF-1R tras el tratamiento con terapias anti-IGF-1R (por ejemplo, la composición de terapia génica que comprende un casete de expresión de anticuerpos, un genoma vectorial AAV o una partícula rAAV de la presente descripción).

Ciertos aspectos de la presente descripción, los casetes de expresión de anticuerpos que codifican anti-IGF-1R

se administran mediante transducción AAV. Esto permite la administración del anti-IGF-1R vectorizado mediante inyección intratumoral, a diferencia de las terapias existentes con anticuerpos monoclonales anti-IGF-1R, que normalmente se administran por vía sistémica.

En ciertos aspectos, la administración local y la expresión de anti-IGF-R mediante la administración de un casete de expresión de anticuerpo, un genoma de vector AAV o una partícula rAAV de la presente descripción reduce los niveles de IGFR en el tumor. En ciertos aspectos, la administración local de teprotumumab mediante el vector AAV puede dar lugar a un retraso del crecimiento tumoral en el que no lo hace la administración sistémica del anticuerpo. En ciertos aspectos, esto puede evaluarse mediante la medición del tumor en los diferentes grupos de tratamiento.

En ciertos aspectos, el casete de expresión de anticuerpos, un genoma de vector AAV o una partícula rAAV de la presente descripción pueden administrarse a un sujeto que padece un tumor o cáncer. En ciertos aspectos, la administración es intratumoral. En ciertos aspectos, el tumor o cáncer es un tumor o cáncer de colon. En ciertos aspectos, el serotipo AAV es AAV9.

En ciertos aspectos, el vector de administración comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del

mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, o un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.).

En ciertos aspectos, el efecto terapéutico del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o péptido es local, sistémico, o ambos.

En ciertos aspectos, una composición o vector de administración descrito en el presente documento que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo es adecuado para su administración a un tejido para tratar la orbitopatía de Graves.

En ciertos aspectos, la composición de terapia génica o cápside de AAV aquí descrita se administra mediante inyección periorbital, inyección retrobulbar, inyección intramuscular,

inyección intralinfática, o una combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular.

En ciertos aspectos, la composición de terapia génica o cápside de AAV aquí descrita se administra por vía intraocular, mediante inyección directa en el ojo.

VI. Composiciones farmacéuticas

En ciertos aspectos, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo., un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido o un lisosoma) que comprende un promotor enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo., un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. Los excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular usado para administrar la composición.

En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas que comprenden un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo, un vector AAV) o una pluralidad de los mismos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18ª ed. (1990)). Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente estériles y en pleno cumplimiento de todas las normas de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, por sus siglas en inglés) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. En ciertos aspectos, la composición farmacéutica comprende más de un vector AAV de la presente descripción, en el que cada vector comprende al menos un polinucleótido que codifica al menos una molécula terapéutica descrita en el presente documento.

En ciertos aspectos, una composición farmacéutica comprende (i) uno o más vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, vectores AAV o cápsides AAV), y (ii) uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno. En ciertos aspectos, el uno o más vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, vectores AAV o cápsides AAV) y el uno o más agentes terapéuticos para una enfermedad o trastorno (por ejemplo, orbitopatía de Graves o enfermedad de Graves) se administran conjuntamente en una única composición farmacéutica.

En ciertos aspectos, la composición farmacéutica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.), o un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de IL-2 o IL-10).

En ciertos aspectos, el uno o más vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) y el uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, orbitopatía de Graves o enfermedad de Graves) se coadministran como composiciones farmacéuticas separadas.

En ciertos aspectos, una composición farmacéutica que

comprende uno o más vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) se administra antes de la administración de una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, orbitopatía de Graves o enfermedad de Graves).

En ciertos aspectos, una composición farmacéutica que comprende uno o más vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) se administra tras la administración de una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, orbitopatía de Graves o enfermedad de Graves).

En ciertos aspectos, una composición farmacéutica que comprende uno o más vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) se administra simultáneamente con una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, orbitopatía de Graves o enfermedad de Graves).

En ciertos aspectos, la composición farmacéutica de la descripción está formulada para su administración a o cerca

de un ojo (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro o periorbital, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo, al tejido conectivo cerca del ojo, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el tejido periorbital o retroorbital se selecciona entre músculo, tejido conjuntivo y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, la entrega o administración es a células fibroblásticas retro o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la composición está formulada para ser administrada por inyección. En ciertos aspectos, la composición está formulada para ser administrada por infusión. En ciertos aspectos, la composición está formulada para ser administrada por inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración en dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones periorbitarias o retrobulbares. En ciertos aspectos, la composición farmacéutica de la descripción está formulada para inyección muscular, intralinfática, periorbitaria y/o retrobulbar. En ciertos aspectos, la administración es a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos

aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular.

También se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) con el grado de pureza deseado, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en una forma adecuada para su administración a un sujeto. Los excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables pueden estar determinados en parte por la composición concreta que se administre, así como por el método concreto usado para administrar la composición. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas que comprenden una pluralidad de vectores, por ejemplo, los vectores AAV descritos en el presente documento. (Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 21ª. ed. (2005)). Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente estériles y en pleno cumplimiento de todas las normas de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores (por ejemplo, animales o seres humanos) en las dosis y concentraciones

empleadas.

Los ejemplos de portadores o diluyentes incluyen, entre otros, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. Excepto en la medida en que cualquier medio o compuesto convencional sea incompatible con los vectores de administración aquí descritos (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV), se contempla su uso en las composiciones. En ciertos aspectos, una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con la vía de administración prevista. Los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) pueden administrarse a un ojo o cerca de él (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro o periorbital, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo, al tejido conjuntivo cerca del ojo, o cualquier combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el tejido periorbital o retroorbital se selecciona entre músculo, tejido conjuntivo y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, la administración se realiza a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio

preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, la entrega o administración es a células fibroblásticas retro o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones.

En ciertos aspectos, la composición farmacéutica que comprende los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) se administra por vía intravenosa, por ejemplo, mediante inyección. En ciertos aspectos, la composición farmacéutica que comprende los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) se administra por vía intramuscular. En ciertos aspectos, la composición farmacéutica que comprende los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) se administra por vía intravítrea (intraocular). En ciertos aspectos, la composición farmacéutica que comprende

los vectores de administración aquí descritos (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) se administra mediante inyección periorbital directa o inyección retrobulbar. Los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes terapéuticos que sean eficaces, al menos en parte, en el tratamiento de la enfermedad, trastorno o afección para la que están destinados los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV).

Los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas rAAV) pueden formularse usando uno o más excipientes para (1) aumentar la estabilidad; (2) aumentar la transfección o transducción celular; (3) permitir la liberación sostenida o retardada; o (4) alterar la biodistribución (por ejemplo, dirigir el vector AAV a tejidos o tipos celulares específicos).

VII. Administración

Las composiciones de terapia génica y los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV) pueden administrarse por cualquier vía que produzca un

resultado terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la expresión terapéutica de un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento. En ciertos aspectos, la administración puede ser a o cerca de un ojo (por ejemplo, uno o ambos ojos), por ejemplo, intraocular, retro o periorbitaria, retrobulbar, intramuscular cerca del ojo, al tejido conjuntivo cerca del ojo, intralinfática, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, el tejido periorbital o retroorbital se selecciona entre músculo, tejido conjuntivo y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, la entrega o administración es a células fibroblásticas retro o periorbitarias, células adipocitarias, células miofibroblásticas, células miocitarias, o cualquier combinación de las mismas. En ciertos aspectos, la administración es a un músculo extraocular. En ciertos aspectos, el músculo extraocular es un músculo elevador o un músculo glabelar. En ciertos aspectos, la administración se realiza en un tejido conjuntivo. En ciertos aspectos, la administración es transconjuntival en el espacio periorbitario. En ciertos aspectos, la administración es intralinfática al ganglio preauricular o submandibular. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección. En ciertos aspectos, la administración se realiza por infusión. En ciertos aspectos, la administración se realiza mediante inyección y/o infusión como dosis única. En ciertos

aspectos, la administración de dosis única comprende múltiples inyecciones o infusiones

En ciertos aspectos, las composiciones de los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión) o las cápsides de AAV pueden administrarse de manera que se facilite la entrada de los vectores en un tejido periorbital o retrobulbar del sujeto. En ciertos aspectos, el tejido periorbital o retrobulbar es músculo seleccionado, y/o tejido adiposo. En ciertos aspectos, las composiciones de los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, casetes de expresión) o cápsides de AAV pueden administrarse en un ganglio linfático. En ciertos aspectos, el ganglio linfático es un ganglio linfático preauricular y/o submandibular.

En ciertos aspectos, la administración es periorbital o retrobulbar. En ciertos aspectos, los vectores de administración descritos en el presente documento (por ejemplo, vectores virales o vectores no virales (incluido el ADN desnudo)) que comprenden un ácido nucleico se introducen en el tejido periorbital o retrobulbar *in vivo*, por ejemplo, mediante administración periorbital o retrobulbar, que puede realizarse mediante perfusión (por ejemplo, inyección continua), o mediante una inyección única discontinua. La administración periorbitaria o retrobulbar también puede realizarse por canulación, por ejemplo, mediante la inserción de una cánula

junto al ojo o en el tejido conjuntivo periorbitario. La administración retrobulbar puede realizarse mediante la inserción de una aguja, por ejemplo, una aguja de calibre 22-27, en el borde inferolateral de la órbita ósea, avanzando en línea recta hacia atrás hasta que la punta pase por el ecuador del ojo y dirigiéndose después medialmente hacia el vértice de la órbita. La administración retrobulbar también puede realizarse insertando una aguja a través del párpado y la fascia orbital para depositar la composición descrita en el presente documento detrás del globo. En ciertos aspectos, la administración retrobulbar proporciona ventajas, por ejemplo, debido a que el vector se presenta a las células en un microambiente generalmente inmune privilegiado, pueden evitarse las reacciones inmunológicas e inflamatorias que se observan comúnmente como resultado de la administración de formulaciones transformantes y sus adyuvantes en sangre y fluido intersticial.

La cantidad de ácido nucleico para transformar un número suficiente de células y proporcionar la expresión de niveles terapéuticos de la proteína puede evaluarse usando un modelo animal (por ejemplo, un roedor (ratón o rata) u otro modelo animal de mamífero) para evaluar factores como la eficacia de la transformación, los niveles de expresión de la proteína conseguidos, la susceptibilidad de las células objetivo a la transformación y las cantidades de vector y/o

ácido nucleico necesarias para transformar las células objetivo.

La cantidad precisa de vector y/o ácido nucleico administrada variará enormemente en función de una serie de factores, como la susceptibilidad de las células objetivo a la transformación, el tamaño y el peso del sujeto, los niveles de expresión proteica deseados y la afección a tratar.

En ciertos aspectos, un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo, un vector vírico, un vector no vírico, un plásmido, un lípido, una partícula proteica, un vector bacteriano o un lisosoma) que comprende un promotor enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento puede administrarse a un tejido periorbital o retrobulbar o a un músculo extraorbital o a un ganglio linfático preauricular o submandibular mediante inyección directa.

En ciertos aspectos, un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo, un vector vírico, un vector no vírico, un plásmido, un lípido, una partícula proteica, un vector bacteriano o un lisosoma) que comprende un promotor unido de forma operable a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno

del mismo descrito en el presente documento se administra por inyección directa, por ejemplo, a un músculo periorbital o retrobulbar o extraorbital o a un tejido ganglionar preauricular o submandibular.

En ciertos aspectos, un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo., un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido o un lisosoma) que comprende un promotor enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo., un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento puede administrarse mediante inyección intramuscular.

En ciertos aspectos, puede administrarse por vía intravenosa un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo, un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido o un lisosoma) que comprende un promotor operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento.

En ciertos aspectos, un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo., un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido o un lisosoma) que comprende un promotor enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por

ejemplo., un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento puede administrarse mediante inyección periorbital.

En ciertos aspectos, un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo., un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido o un lisosoma) que comprende un promotor enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R (por ejemplo., un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento puede administrarse mediante inyección retrobulbar.

En ciertos aspectos, un vector de administración de la presente descripción (por ejemplo., un vector viral, un vector no viral, un plásmido, un lípido o un lisosoma) que comprende un promotor enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo (por ejemplo., un anticuerpo monoclonal) o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento puede administrarse mediante inyección a un tejido adiposo, un tejido conjuntivo, un músculo o cualquier combinación de los mismos.

Los vectores de administración aquí descritos (por ejemplo, vectores AAV o cápsides AAV) pueden administrarse en cualquier forma adecuada, ya sea como solución líquida o suspensión, como forma sólida adecuada para solución líquida o suspensión en una solución líquida.

En ciertos aspectos, el método comprende la administración de un polinucleótido que codifica anti-IGF-1R mediante cualquier método descrito en el presente documento, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción vectorial o de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) que comprende uno cualquiera de los SEC ID NOs: 68-76, en el que la construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, o un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.).

VIII. Kits

La presente descripción también proporciona kits, o productos de fabricación, que comprenden (i) el vector de administración de la presente descripción, o una composición farmacéutica de la presente descripción, y (ii) opcionalmente instrucciones de uso (por ejemplo, un prospecto con instrucciones para realizar cualquiera de los métodos descritos

en el presente documento).

En ciertos aspectos, el kit o producto de fabricación comprende (i) los vectores de administración de la presente descripción (por ejemplo, un vector AAV o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento), o una composición farmacéutica de la presente descripción, (ii) opcionalmente, un agente terapéutico adicional, y (iii) opcionalmente, instrucciones de uso (por ejemplo., también se contempla un prospecto con instrucciones para realizar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento).

En ciertos aspectos, los componentes de un kit o producto de fabricación descrito en el presente documento están en uno o más recipientes. En ciertos aspectos, el kit o producto de fabricación comprende (i) un vector AAV o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento, y (ii) un folleto con instrucciones para administrar el vector AAV o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) a un sujeto.

En ciertos aspectos, un kit o producto de fabricación de la presente descripción comprende al menos un vector de

administración (por ejemplo, casetes de expresión de anticuerpos o partículas de rAAV). En ciertos aspectos, un kit o producto de fabricación de la presente descripción comprende al menos un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo anti-IGF-1R o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotumumab, VRDN-01100 (SEC ID NO: 113), VRDN-02700 (SEC ID NO: 116), ganitumab (AMG 479), figitumumab, CP-751,871, cixutumumab (AMG 655), IMC-A12, dalotuzumab, MK0646, RG1507, robatumumab, SCH 717454, AVE-1642a, MEDI-573, BIIB022, rhuMab IGFR, L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, o L52H52, o sus variantes.

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es VRDN-01100, o VRDN-02700, o una variante del mismo. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 113 (correspondiente a VRDN-01100). En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGFR o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de

SEC ID NO: 116 (correspondiente a VRDN-002700).

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-IGF-1R es teprotomumab, o una variante del mismo.

En ciertos aspectos, el kit comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, teprotomumab) que comprende: (i) VH CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 7-9, 10-12, o 13-15) y VL CDR 1-3 (por ejemplo, SEC ID NOs: 16-18, 19-21, o 22-24); (ii) VH (por ejemplo, SEC ID NOs: 26 o 27) y VL (por ejemplo, SEC ID NOs: 30 o 31); (iii) HC (por ejemplo, SEC ID NOs: 36 o 37) y LC (por ejemplo, SEC ID NOs: 40 o 41); o (iv) una construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpo) que comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 68-76, en la que la construcción vectorial o construcción de expresión (por ejemplo, casete de expresión de anticuerpos) comprende además uno o más de IRES, sitio de escisión de furina, sitio 2a, un promotor dual (por ejemplo, promotor-VH-IRES-VL, etc.), o un péptido señal (por ejemplo, un péptido señal de IL-2 o IL-10).

Un experto en la materia reconocerá fácilmente que los polinucleótidos (por ejemplo, el casete de expresión de anticuerpos), los vectores, las partículas de rAAV y las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, o sus combinaciones, pueden incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la

materia.

La práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la habilidad de la técnica. Estas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía.

Todas las referencias citadas anteriormente, así como todas las referencias citadas en el presente documento, se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a título ilustrativo y no limitativo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ácidos nucleicos de anticuerpos anti-IGF-1R modificados

Las siguientes secuencias de ácido nucleico ORF de anticuerpos anti-IGF-1R modificados (mostradas en la Tabla 16) correspondientes a los SEC ID NOs: 57-67 y 94-97 se diseñaron *in silico*. Los OFR incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican una cadena pesada anti-IGF-1R y una cadena ligera.

Tabla 16. Secuencias de ácido nucleico ORF modificadas que codifican el anticuerpo anti-IGF-1R

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
(SEC ID NO:	ORF No. 1	atgcacagctccgccctgctctgctgtttggtgcttctgaccggcgtccgggctcaggttgagttagt

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
57) Completo: 2202 IL-10 Péptido señal: 1-54 HC: 55-1398 Furina: 1399-1410 Enlazador: 1411-1422 F2A: 1423-1494 IL-2 Péptido señal: 1495-1554 LC: 1555-2198 Codón de detención: 2200-2202		ggaatctggaggggtgtagtgcaacccggcagatcacagaggctgagttgcgcagcgtcgggg ttcacatttagctcctacgggatgcattgggtccgccaggcccctggcaagggtctagagtgggtggc tatcatttggttcgacggatcttcaacttattacgccgatagtgttcgagggcgttttacgataagccgg gacaactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagccgtgtact ctgtgctagggagctgggccgccggtattttgacctttggggcagaggaactctcgtcagcgtatcc tcagcaagtaccaaggggccaagcgtgttcccgctggccccctcttccaaatcgacatcaggtggc accgcggctctgggatgcctcgttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtgg ggccttgacgtctggcgtgcacacattccccgcagtccttcagtccagcggtctgtattcattatccag tgtggttaccgtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaacgtaaatcataaaccaag caacacaaaggtggacaagaaagtcgagcccaagtcttgcgataaaacccacacttgtccgccttg cccagcccccgagctactcgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattga tgattagtaggacgcccgaagtgacctgtgtcgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaa gttcaattggtacgtggatggcgtcgaggtgcacaacgctaagactaaaccgcgcgaagagcagta taatagcacataccgagtcgtgtcggttctgaccgtgcttcaccaagactggctcaacggaaaggag tataaatgcaaggtatctaataaggccctgcccgcacctatcgaaaaaactatttcaaaggctaaagg gcagccacgtgagccccaggtctacaccctgcctccatcccgggacgaattaacaaagaaccagg tgagtctcacgtgcctggttaaaggtttttatcccagcgatatcgccgtggagtgggagtctaacggc

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		caaccggaaaataactacaagaccacacctccagtcttggactccgatggaagcttctttctttactc a aagctgactgtggacaaaagtagatggcagcaggggaatgtgttcagctgttccgttatgcatgag g cgctacacaaccattatacccagaagtctctctcgctgtcacccggcaaaagaaagagaaggagt g gctcaggagcccctgtgaaacagaccctgaactttgacctcttgaagcttgctggggatgtggagtc t aatcctggtccaatgtaccggatgcagctgctcagctgcatcgccttgtcccttgctctggtgaccaa ctctgagattgtcttaacacaatcacccgcaactctgagtctatcgcctggcgaaagagcgacgctc a gctgtagggcctcccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggcccc gcgcttgctgatatatgacgcaagcaaacgagccaccgggatccccgctcgtttctccggttctggc agcggaacagattttactcttaccatttcctcactcgagcctgaagacttcgcagtgtactattgccag c agcggagtaagtggccaccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaact gt ggccgcgccttctgtcttcatctttccaccctccgatgaacagctgaaatcgggtacggcttcagtggt ttgtctgctcaataacttctacccgagggaggccaaggtgcagtggaaggtcgacaatgcattgca g agcggaaacagtcaagagtctgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccag ta ctctgaccttatctaaggccgattacgagaaacacaaggtgtacgcttgcgaagttacacatcagg g gctgagctcccctgtgaccaaaagctttaatcgcggcgagtgttag
(SEC ID NO: 58) Completo:	ORF No. 2	ATGCACAGCTCCGCCCTGCTCTGCTGTTTGGTGCTTCTGACA GGAGTCAGGGCTCAGGTTGAGTTAGTGGAATCTGGAGGGGG TGTAGTGCAACCTGGCAGATCACAGAGGCTGAGTTGCGCAG CAAGTGGATTCACATTTAGCTCCTATGGGATGCATTGGGTCC

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
2202 IL-10 Péptido señal: 1-54 HC: 55-1398 Furina: 1399-1410 Enlazador: 1411-1422 F2A: 1423-1494 IL-2 Péptido señal: 1495-1554 LC: 1555-2199 Codón de detención: 2200-2202		GCCAGGCCCCTGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTGGCTATCATT TGGTTTGATGGATCTTCAACTTATTATGCTGATAGTGTTAGA GGGCGCTTTACTATAAGCAGGGACAACTCCAAAAATACCCT CTATCTGCAAATGAACTCTTTGAGAGCAGAAGATACAGCTG TGTACTTCTGTGCTAGGGAGCTGGGCCGCAGATATTTTGACC TTTGGGGCAGAGGAACTCTTGTCTCTGTATCCTCAGCAAGTA CCAAGGGGCCATCTGTGTTCCCGCTGGCCCCCTCTTCCAAAA GTACATCAGGTGGCACCGCGGCTCTGGGATGCTTGGTTAAG GATTACTTTCCTGAACCAGTGACTGTCAGCTGGAATAGTGG GGCCTTGACTTCTGGGGTGCACACATTCCCCGCAGTCCTTCA GTCCAGCGGTCTGTATTCATTATCCAGTGTGGTTACAGTGCC TTCTAGCTCCCTGGGAACTCAGACCTACATCTGTAATGTAAA TCATAAACCAAGCAACACAAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAGTCTTGTGATAAAACCCACACTTGTCCGCCTTGCCCA GCCCCTGAGCTACTTGGGGGCCCTTCAGTTTTTCTGTTCCCA CCCAAGCCTAAAGACACATTGATGATTAGTAGGACTCCTGA AGTGACCTGTGTTGTGGTGGATGTTTCCCATGAGGACCCAG AAGTAAAGTTCAATTGGTATGTGGATGGAGTTGAGGTGCAC AATGCTAAGACTAAACCGAGGGAAGAGCAGTATAATAGCA CATACAGAGTTGTGTCAGTTCTGACAGTGCTTCACCAAGACT GGCTCAATGGAAAGGAGTATAAATGCAAGGTATCTAATAAG GCCCTGCCCGCACCTATTGAAAAAACTATTTCAAAGGCTAA AGGGCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCTCCAT CCAGAGATGAATTAACAAAGAACCAGGTGAGTCTCACTTGC CTGGTTAAAGGTTTTTATCCCTCTGATATTGCTGTGGAGTGG GAGTCTAATGGCCAACCAGAAAATAACTACAAGACCACACC TCCAGTCTTGGACTCTGATGGAAGCTTCTTTCTTTACTCAAA GCTGACTGTGGACAAAAGTAGATGGCAGCAGGGGAATGTGT

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		TCAGCTGTTCTGTTATGCATGAGGCGCTACACAACCATTATA CCCAGAAGTCTCTCAGTCTGTCACCTGGCAAAAGAAAGAGA AGGAGTGGCTCAGGAGCCCCTGTGAAACAGACCCTGAACTT TGACCTCTTGAAGCTTGCTGGGGATGTGGAGTCTAATCCTGG TCCAATGTACAGAATGCAGCTGCTCAGCTGCATTGCCTTGTC CCTTGCTCTGGTGACCAACTCTGAGATTGTCTTAACACAATC ACCCGCAACTCTGAGTCTAAGTCCTGGAGAAAGAGCAACTC TCAGCTGTAGGGCCTCCCAGTCTGTTTCAAGTTATCTGGCTT GGTACCAGCAAAAGCCAGGACAGGCCCCGCGCTTGCTGATA TATGATGCAAGCAAAAGGGCCACAGGGATCCCCGCTAGATT CAGCGGTTCTGGCAGCGGAACAGATTTTACTCTTACCATTTC CTCACTTGAGCCTGAAGACTTTGCAGTGTACTATTGCCAGCA GCGGAGTAAGTGGCCACCCTGGACATTTGGGCAAGGCACCA AAGTAGAGAGCAAGAGAACTGTGGCCGCGCCTTCTGTCTTC ATCTTTCCACCCTCTGATGAACAGCTGAAATCAGGTACTGCT TCAGTGGTTTGTCTGCTCAATAACTTCTACCCAAGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTTGACAATGCATTGCAGAGCGGAA ACAGTCAAGAGTCTGTAACAGAACAGGATTCCAAAGACAGC ACCTATTCACTTTCCAGTACTCTGACCTTATCTAAGGCTGAT TATGAGAAACACAAGGTGTATGCTTGTGAAGTTACACATCA GGGGCTGAGCTCCCCTGTGACCAAAAGCTTTAATAGGGGGG AGTGTTAG
(SEC ID NO: 59) Completo: 1401	ORF # 3	atgcacagctctgccctgctctgctgtttggtgcttctgacaggagtcagggctcaggttgagttagtg gaatctggaggggtgtagtgcaacctggcagatcacagaggctgagttgtgcagcaagtggatt c acatttagctcctatgggatgcattgggtcagacaggcccctggcaagggtctagagtgggtggcta tcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttaggggagatttactataagcagggac aactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagctgtgtacttctg

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
IL-10 Péptido señal: 1-54 HC: 55-1398 Codón de detención: 1399-1401		t gctagggagctgggcagaaggtattttgacctttggggcagaggaactcttgtctctgtatcctcagc aagtaccaaggggccatctgtgttcccactggccccctcttccaaaagtacatcaggtggcacagc a gctctgggatgcttggttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtggggccttg acttctggggtgcacacattccctgcagtccttcagtcctctggtctgtattcattatccagtgtggttac agtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaatgtaaatcataaaccaagcaacaca a aggtggacaagaaagttgagcccaagtcttgtgataaaacccacacttgtccaccttgcccagccc c tgagctacttgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgatgattagtag g actcctgaagtgacctgtgttgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaagttcaattggtat gtggatggagttgaggtgcacaatgctaagactaaaccaagagaagagcagtataatagcacat ac agggttgtgtcagttctgacagtgcttcaccaagactggctcaatggaaaggagtataaatgcaag gt atctaataaggccctgcctgcacctattgaaaaaactatttcaaaggctaaagggcagccaagag ag ccccaggtctacaccctgcctccatccagggatgaattaacaaagaaccaggtgagtctcacttgc c tggttaaaggtttttatccctctgatattgctgtggagtgggagtctaatggccaaccagaaaataact a caagaccacacctccagtcttggactctgatggaagcttctttctttactcaaagctgactgtggacaa aagtagatggcagcaggggaatgtgttcagctgttctgttatgcatgaggcactacacaaccattat a cccagaagtctctcagtctgtcacctggcaaatag
(SEC ID NO: 60)	ORF #4	atgtaccggatgcagctgctcagctgcatcgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtc ttaacacaatcacccgcaactctgagtctatcgcctggcgaaagagcgacgctcagctgtagggc

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
Completo: 708 IL-2 Péptido señal: 1-60 LC: 61-705 Codón de detención: 706-708		ct cccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccgcgcttgctgat a tatgacgcaagcaaacgagccaccgggatccccgctcgtttctccggttctggcagcggaacaga t tttactcttaccatttcctcactcgagcctgaagacttcgcagtgtactattgccagcagcggagtaagt ggccaccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggccgcgccttct gtcttcatctttccaccctccgatgaacagctgaaatcgggtacggcttcagtggtttgtctgctcaata acttctacccgagggaggccaaggtgcagtggaaggtcgacaatgcattgcagagcggaaacagt caagagtctgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatct aaggccgattacgagaaacacaaggtgtacgcttgcgaagttacacatcaggggctgagctcccct gtgaccaaaagctttaatcgcggcgagtgttag
(SEC ID NO: 61) Completo: 1401 IL-10 Péptido señal: 1-54 HC: 55-1398 Codón de	ORF # 5	atgcacagctccgccctgctctgctgtttggtgcttctgaccggcgtccgggctcaggttgagttagt ggaatctggaggggtgtagtgcaacccggcagatcacagaggctgagttgcgcagcgtcgggga ttcacatttagctcctacgggatgcattgggtccgccaggcccctggcaagggtctagagtgggtggc tatcatttggttcgacggatcttcaacttattacgccgatagtgttcgagggcgttttacgataagccg ggacaactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagccgtgtact ctgtgctagggagctgggccgccggtattttgacctttggggcagaggaactctcgtcagcgtatcc tcagcaagtaccaaggggccaagcgtgttcccgctggccccctcttccaaatcgacatcaggtggc accgcggctctgggatgcctcgttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtgg ggccttgacgtctggcgtgcacacattccccgcagtccttcagtccagcggtctgtattcattatccag tgtggttaccgtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaacgtaaatcataaaccaa

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
detención: 1399-1401		g caacacaaaggtggacaagaaagtcgagcccaagtcttgcgataaaacccacacttgtccgcctt g cccagcccccgagctactcgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattg a tgattagtaggacgcccgaagtgacctgtgtcgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaa a gttcaattggtacgtggatggcgtcgaggtgcacaacgctaagactaaaccgcgcgaagagcagt a taatagcacataccgagtcgtgtcggttctgaccgtgcttcaccaagactggctcaacggaaagga g tataaatgcaaggtatctaataaggccctgcccgcacctatcgaaaaaactatttcaaaggctaaa gg gcagccacgtgagccccaggtctacaccctgcctccatcccgggacgaattaacaaagaaccag g tgagtctcacgtgcctggttaaaggtttttatcccagcgatatcgccgtggagtgggagtctaacggc caaccggaaaataactacaagaccacacctccagtcttggactccgatggaagcttctttctttactc a aagctgactgtggacaaaagtagatggcagcaggggaatgtgttcagctgttccgttatgcatgag g cgctacacaaccattatacccagaagtctctctcgctgtcacccggcaaatag
(SEC ID NO: 62) Completo: 708 IL-2 Péptido señal: 1-60	ORF # 6	atgtacagaatgcagctgctcagctgcattgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtct taacacaatcacccgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagcaactctcagctgtagggcct c ccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccgcgcttgctgatat atgatgcaagcaaaagggccacagggatccccgctagattcagcggttctggcagcggaacag at tttactcttaccatttcctcacttgagcctgaagactttgcagtgtactattgccagcagcggagtaagt ggccaccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggccgcgcctt

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
LC: 61-705 Codón de detención: 706-708		ct gtcttcatctttccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttcagtggtttgtctgctcaataa cttctacccaagggaggccaaggtgcagtggaaggttgacaatgcattgcagagcggaaacagt c aagagtctgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatct a aggctgattatgagaaacacaaggtgtatgcttgtgaagttacacatcaggggctgagctcccctgt g accaaaagctttaataggggggagtgttag
(SEC ID NO: 63) Completo: 1401 IL-10 Péptido señal: 1-54 HC: 55-1398 Codón de detención: 1399-1401	ORF # 7	ATGCACAGCTCCGCCCTGCTCTGCTGTTTGGTGCTTCTGACA GGAGTCAGGGCTCAGGTTGAGTTAGTGGAATCTGGAGGGGG TGTAGTGCAACCTGGCAGATCACAGAGGCTGAGTTGCGCAG CAAGTGGATTCACATTTAGCTCCTATGGGATGCATTGGGTCC GCCAGGCCCCTGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTGGCTATCATT TGGTTTGATGGATCTTCAACTTATTATGCTGATAGTGTTAGA GGGCGCTTTACTATAAGCAGGGACAACTCCAAAAATACCCT CTATCTGCAAATGAACTCTTTGAGAGCAGAAGATACAGCTG TGTACTTCTGTGCTAGGGAGCTGGGCCGCAGATATTTTGACC TTTGGGGCAGAGGAACTCTTGTCTCTGTATCCTCAGCAAGTA CCAAGGGGCCATCTGTGTTCCCGCTGGCCCCCTCTTCCAAAA GTACATCAGGTGGCACCGCGGCTCTGGGATGCTTGGTTAAG GATTACTTTCCTGAACCAGTGACTGTCAGCTGGAATAGTGG GGCCTTGACTTCTGGGGTGCACACATTCCCCGCAGTCCTTCA GTCCAGCGGTCTGTATTCATTATCCAGTGTGGTTACAGTGCC TTCTAGCTCCCTGGGAACTCAGACCTACATCTGTAATGTAAA TCATAAACCAAGCAACACAAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAGTCTTGTGATAAAACCCACACTTGTCCGCCTTGCCCA GCCCCTGAGCTACTTGGGGGCCCTTCAGTTTTTCTGTTCCCA CCCAAGCCTAAAGACACATTGATGATTAGTAGGACTCCTGA

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		AGTGACCTGTGTTGTGGTGGATGTTTCCCATGAGGACCCAG AAGTAAAGTTCAATTGGTATGTGGATGGAGTTGAGGTGCAC AATGCTAAGACTAAACCGAGGGAAGAGCAGTATAATAGCA CATACAGAGTTGTGTCAGTTCTGACAGTGCTTCACCAAGACT GGCTCAATGGAAAGGAGTATAAATGCAAGGTATCTAATAAG GCCCTGCCCGCACCTATTGAAAAAACTATTTCAAAGGCTAA AGGGCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCTCCAT CCAGAGATGAATTAACAAAGAACCAGGTGAGTCTCACTTGC CTGGTTAAAGGTTTTTATCCCTCTGATATTGCTGTGGAGTGG GAGTCTAATGGCCAACCAGAAAATAACTACAAGACCACACC TCCAGTCTTGGACTCTGATGGAAGCTTCTTTCTTTACTCAAA GCTGACTGTGGACAAAAGTAGATGGCAGCAGGGGAATGTGT TCAGCTGTTCTGTTATGCATGAGGCGCTACACAACCATTATA CCCAGAAGTCTCTCAGTCTGTCACCTGGCAAATAG
(SEC ID NO: 64) Completo: 1401 IL-10 Péptido señal: 1-54 HC: 55-1398 Codón de detención: 1399-1401	ORF # 8	ATGCACAGCTCCGCCCTGCTCTGCTGTTTGGTGCTTCTGACA GGAGTCAGGGCTCAGGTTGAGTTAGTGGAATCTGGAGGGGG TGTAGTGCAACCTGGCAGATCACAGAGGCTGAGTTGCGCAG CAAGTGGATTCACATTTAGCTCCTATGGGATGCATTGGGTCC GCCAGGCCCCTGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTGGCTATCATT TGGTTTGATGGATCTTCAACTTATTATGCTGATAGTGTTAGA GGGCGCTTTACTATAAGCAGGGACAACTCCAAAAATACCCT CTATCTGCAAATGAACTCTTTGAGAGCAGAAGATACAGCTG TGTACTTCTGTGCTAGGGAGCTGGGCCGCAGATATTTTGACC TTTGGGGCAGAGGAACTCTTGTCTCTGTATCCTCAGCAAGTA CCAAGGGGCCATCTGTGTTCCCGCTGGCCCCCTCTTCCAAAA GTACATCAGGTGGCACCGCGGCTCTGGGATGCTTGGTTAAG GATTACTTTCCTGAACCAGTGACTGTCAGCTGGAATAGTGG GGCCTTGACTTCTGGGGTGCACACATTCCCCGCAGTCCTTCA

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		GTCCAGCGGTCTGTATTCATTATCCAGTGTGGTTACAGTGCC TTCTAGCTCCCTGGGAACTCAGACCTACATCTGTAATGTAAA TCATAAACCAAGCAACACAAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAGTCTTGTGATAAAACCCACACTTGTCCGCCTTGCCCA GCCCCTGAGCTACTTGGGGGCCCTTCAGTTTTTCTGTTCCCA CCCAAGCCTAAAGACACATTGATGATTAGTAGGACTCCTGA AGTGACCTGTGTTGTGGTGGATGTTTCCCATGAGGACCCAG AAGTAAAGTTCAATTGGTATGTGGATGGAGTTGAGGTGCAC AATGCTAAGACTAAACCGAGGGAAGAGCAGTATAATAGCA CATACAGAGTTGTGTCAGTTCTGACAGTGCTTCACCAAGACT GGCTCAATGGAAAGGAGTATAAATGCAAGGTATCTAATAAG GCCCTGCCCGCACCTATTGAAAAAACTATTTCAAAGGCTAA AGGGCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCTCCAT CCAGAGATGAATTAACAAAGAACCAGGTGAGTCTCACTTGC CTGGTTAAAGGTTTTTATCCCTCTGATATTGCTGTGGAGTGG GAGTCTAATGGCCAACCAGAAAATAACTACAAGACCACACC TCCAGTCTTGGACTCTGATGGAAGCTTCTTTCTTTACTCAAA GCTGACTGTGGACAAAAGTAGATGGCAGCAGGGGAATGTGT TCAGCTGTTCTGTTATGCATGAGGCGCTACACAACCATTATA CCCAGAAGTCTCTCAGTCTGTCACCTGGCAAATAG
(SEC ID NO: 65) Completo: 1401 IL-10 Péptido señal: 1-54	ORF # 9	atgcacagctctgccctgctctgctgtttggtgcttctgacaggagtcagggctcaggttgagttagtg gaatctggaggggtgtagtgcaacctggcagatcacagaggctgagttgtgcagcaagtggatt c acatttagctcctatgggatgcattgggtcagacaggcccctggcaagggtctagagtgggtggcta tcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttaggggagatttactataagcagggac aactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagctgtgtacttctg t gctagggagctgggcagaaggtattttgacctttggggcagaggaactcttgtctctgtatcctcagc

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
HC: 55-1398 Codón de detención: 1399-1401		aagtaccaaggggccatctgtgttcccactggccccctcttccaaaagtacatcaggtggcacagc a gctctgggatgcttggttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtggggccttg acttctggggtgcacacattccctgcagtccttcagtcctctggtctgtattcattatccagtgtggttac agtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaatgtaaatcataaaccaagcaacaca a aggtggacaagaaagttgagcccaagtcttgtgataaaacccacacttgtccaccttgcccagccc c tgagctacttgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgatgattagtag g actcctgaagtgacctgtgttgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaagttcaattggtat gtggatggagttgaggtgcacaatgctaagactaaaccaagagaagagcagtataatagcacat ac agggttgtgtcagttctgacagtgcttcaccaagactggctcaatggaaaggagtataaatgcaag gt atctaataaggccctgcctgcacctattgaaaaaactatttcaaaggctaaagggcagccaagag ag ccccaggtctacaccctgcctccatccagggatgaattaacaaagaaccaggtgagtctcacttgc c tggttaaaggtttttatccctctgatattgctgtggagtgggagtctaatggccaaccagaaaataact a caagaccacacctccagtcttggactctgatggaagcttctttctttactcaaagctgactgtggacaa aagtagatggcagcaggggaatgtgttcagctgttctgttatgcatgaggcactacacaaccattat a cccagaagtctctcagtctgtcacctggcaaatag
(SEC ID NO: 66) Completo: 708	ORF # 10	atgtacagaatgcagctgctcagctgcattgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtct taacacaatcacctgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagcaactctcagctgtagggcct c ccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccaaggttgctgata

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
IL-2 Péptido señal: 1-60 LC: 61-705 Codón de detención: 706-708		t atgatgcaagcaaaagagccacagggatccctgctaggttctctggttctggctctggaacagatttt actcttaccatttcctcacttgagcctgaagactttgcagtgtactattgccagcagagaagtaagtgg ccaccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggctgcaccttctgt c ttcatctttccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttcagtggtttgtctgctcaataacttc tacccaagggaggccaaggtgcagtggaaggttgacaatgcattgcagtctggaaacagtcaag a gtctgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatctaagg c tgattatgagaaacacaaggtgtatgcttgtgaagttacacatcaggggctgagctcccctgtgacc a aaagctttaatagggggagtgttag
(SEC ID NO: 67) Completo: 708 IL-2 Péptido señal: 1-60 LC: 61-705 Codón de detención: 706-708	ORF # 11	atgtacagaatgcagctgctcagctgcattgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtct taacacaatcacctgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagcaactctcagctgtagggcct c ccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccaaggttgctgata t atgatgcaagcaaaagagccacagggatccctgctaggttctctggttctggctctggaacagatttt actcttaccatttcctcacttgagcctgaagactttgcagtgtactattgccagcagagaagtaagtgg ccaccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggctgcaccttctgt c ttcatctttccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttcagtggtttgtctgctcaataacttc tacccaagggaggccaaggtgcagtggaaggttgacaatgcattgcagtctggaaacagtcaag a gtctgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatctaagg c tgattatgagaaacacaaggtgtatgcttgtgaagttacacatcaggggctgagctcccctgtgacc a aaagctttaatagggggagtgttag

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
(SEC ID NO: 94) Completo: 2694 IL-2 Péptido señal: 1-60 LC: 61-705 Codón de detención: 706-708 IRES: 709-1293 IL-10 Péptido señal: 1294-1347 HC: 1348-2691 Codón de detención: 2692-2694	ORF # 12	atgtaccggatgcagctgctcagctgcatcgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtc ttaacacaatcacccgcaactctgagtctatcgcctggcgaaagagcgacgctcagctgtagggc ct cccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccgcgcttgctgat a tatgacgcaagcaaacgagccaccgggatccccgctcgtttctccggttctggcagcggaacaga t tttactcttaccatttcctcactcgagcctgaagacttcgcagtgtactattgccagcagcggagtaagt ggccaccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggccgcgccttct gtcttcatctttccaccctccgatgaacagctgaaatcgggtacggcttcagtggtttgtctgctcaata acttctacccgagggaggccaaggtgcagtggaaggtcgacaatgcattgcagagcggaaacag t caagagtctgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatc t aaggccgattacgagaaacacaaggtgtacgcttgcgaagttacacatcaggggctgagctccc ct gtgaccaaaagctttaatcgcggcgagtgttaggcccctctccctccccccccctaacgttactgg c cgaagccgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttgg caatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcg ccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagac a aacaacgtctgtagcgacccctttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtgcctctgcg gccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgag tt ggatagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgcc c

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		agaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtacacatgctttacatgtgtttagtcga ggttaaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgat a atatggccacaatgcacagctccgccctgctctgctgtttggtgcttctgaccggcgtccgggctcag gttgagttagtggaatctggaggggtgtagtgcaacccggcagatcacagaggctgagttgcgc a gcgtcgggattcacatttagctcctacgggatgcattgggtccgccaggcccctggcaagggtctag agtgggtggctatcatttggttcgacggatcttcaacttattacgccgatagtgttcgagggcgttttac gataagccgggacaactccaaaaatacctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagata ca gccgtgtacttctgtgctagggagctgggccgccggtattttgacctttggggcagaggaactctcgt cagcgtatcctcagcaagtaccaaggggccaagcgtgttcccgctggccccctcttccaaatcgac atcaggtggcaccgcggctctgggatgcctcgttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagct ggaatagtggggccttgacgtctggcgtgcacacattccccgcagtccttcagtccagcggtctgtat tcattatccagtgtggttaccgtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaacgtaaatc ataaaccaagcaacacaaaggtggacaagaaagtcgagcccaagtcttgcgataaaacccac actt gtccgccttgcccagcccccgagctactcgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaa gacacattgatgattagtaggacgcccgaagtgacctgtgtcgtggtggatgtttcccatgaggacc cagaagtaaagttcaattggtacgtggatggcgtcgaggtgcacaacgctaagactaaaccgcgc g aagagcagtataatagcacataccgagtcgtgtcggttctgaccgtgcttcaccaagactggctca a cggaaaggagtataaatgcaaggtatctaataggccctgcccgcacctatcgaaaaaactatttc a aaggctaaagggcagccacgtgagccccaggtctacaccctgcctccatcccgggacgaattaa c aaagaaccaggtgagtctcacgtgcctggttaaaggtttttatcccagcgatatcgccgtggagtgg

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		gagtctaacggccaaccggaaaataactacaagaccacacctccagtcttggactccgatggaagc ttctttctttactcaaagctgactgtggacaaaagtagatggcagcaggggaatgtgttcagctgttccgttatgcatgaggcgctacacaaccattatacccagaagtctctctcgctgtcacccggcaaatag
(SEC ID NO: 95) Completo: 2700 IL-2 Péptido señal: 1-60 LC: 91-705 IRES: 709-1293 IL-10 Péptido señal: 1294-1347 HC: 1294-2697 Codón de detención: 2698-2700-	ORF # 13	atgtacagaatgcagctgctcagctgcattgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtcttaacacaatcacccgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagcaactctcagctgtagggcctc ccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccgcgcttgctgatatatgatgcaagcaaaagggccacagggatccccgctagattcagcggttctggcagcggaacagat tttactcttaccatttcctcacttgagcctgaagactttgcagtgtactattgccagcagcggagtaagtggccaccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggccgcgccttct gtcttcatctttccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttcagtggtttgtctgctcaataacttctacccaagggaggccaaggtgcagtggaaggttgacaatgcattgcagagcggaaacagtc aagagtctgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatcta aggctgattatgagaaacacaaggtgtatgcttgtgaagttacacatcaggggctgagctcccctgtg accaaaagctttaatagggggagtgttaggcccctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaa caacgtctgtagcgacccctttgcaggcagcggaacccccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttgg

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		atagttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccca ga aggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtacacatgctttacatgtgtttagtcgaggtt aaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataat at ggccacaatgcacagctccgccctgctctgctgtttggtgcttctgacaggagtcagggctcaggtt gagttagtggaatctggaggggtgtagtgcaacctggcagatcacagaggctgagttgcgcagc aagtggattcacatttagctcctatgggatgcattgggtccgccaggcccctggcaagggtctagag tgggtggctatcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttagagggcgctttactata agcagggacaactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagc tg tgtacttctgtgctagggagctgggccgcagatattttgacctttggggcagaggaactcttgtctctgt atcctcagcaagtaccaaggggccatctgtgttcccgctggccccctcttccaaaagtacatcaggt ggcaccgcggctctgggatgcttggttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatag tggggccttgacttctggggtgcacacattccccgcagtccttcagtccagcggtctgtattcattatc cagtgtggttacagtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaatgtaaatcataaac c aagcaacacaaaggtggacaagaaagttgagcccaagtcttgtgataaaacccacacttgtccg cc ttgcccagcccctgagctacttgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacatt gatgattagtaggactcctgaagtgacctgtgttgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaa agttcaattggtatgtggatggagttgaggtgcacaatgctaagactaaaccgagggaagagcag ta taatagcacatacagagttgtgtcagttctgacagtgcttcaccaagactggctcaatggaaagga gt ataaatgcaaggtatctaataaggccctgcccgcacctattgaaaaaactatttcaaaggctaaag gg cagccaagggagccccaggtctacaccctgcctccatccagagatgaattaacaaagaaccag

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		gt gagtctcacttgcctggttaaaggtttttatccctctgatattgctgtggagtgggagtctaatggccaa ccagaaaataactacaagaccacacctccagtcttggactctgatggaagcttctttctttactcaaa g ctgactgtggacaaaagtagatggcagcaggggaatgtgttcagctgttctgttatgcatgaggcgc t acacaaccattatacccagaagtctctcagtctgtcaccggcaaatagcaattga
(SEC ID NO: 96) Completo: 2211 IL-10 Péptido señal: 1-54 HC: 55-1398 Codón de detención: 1399-1402 Enlazador: 1403-1407 Furina: 1408-1419 Enlazador: 1420-1431	ORF # 14	atgcacagctctgccctgctctgctgtttggtgcttctgacaggagtcagggctcaggttgagttagtg gaatctggaggggtgtagtgcaacctggcagatcacagaggctgagttgtgcagcaagtggatt c acatttagctcctatgggatgcattgggtcagacaggcccctggcaagggtctagagtgggtggcta tcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttaggggagatttactataagcagggac aactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagctgtgtacttctg t gctagggagctgggcagaaggtattttgacctttggggcagaggaactcttgtctctgtatcctcagc aagtaccaaggggccatctgtgttcccactggccccctcttccaaaagtacatcaggtggcacagc a gctctgggatgcttggttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtggggccttg acttctggggtgcacacattccctgcagtccttcagtcctctggtctgtattcattatccagtgtggttac agtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaatgtaaatcataaaccaagcaacaca a aggtggacaagaaagttgagcccaagtcttgtgataaaacccacacttgtccaccttgcccagccc c tgagctacttgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgatgattagtag g actcctgaagtgacctgtgttgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaagttcaattggtat gtggatggagttgaggtgcacaatgctaagactaaaccaagagaagagcagtataatagcacat ac agggttgtgtcagttctgacagtgcttcaccaagactggctcaatggaaaggagtataaatgcaag

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
F2A: 1432-1503 IL-2 Péptido señal: 1505-1563 LC: 1564-2208 Codón de detención: 2209-2211		gt atctaataaggccctgcctgcacctattgaaaaaactatttcaaaggctaaagggcagccaagag ag ccccaggtctacaccctgcctccatccagggatgaattaacaaagaaccaggtgagtctcacttgc c tggttaaaggtttttatccctctgatattgctgtggagtgggagtctaatggccaaccagaaaataact a caagaccacacctccagtcttggactctgatggaagcttctttctttactcaaagctgactgtggacaa aagtagatggcagcaggggaatgtgttcagctgttctgttatgcatgaggcactacacaaccattat a cccagaagtctctcagtctgtcacctggcaaatagggcaaaagaaagagaaggagtggctcagg a gcccctgtgaaacagaccctgaactttgacctcttgaagcttgctggggatgtggagtctaatcctgg tccaatgtacagaatgcagctgctcagctgcattgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagatt gtcttaacacaatcacctgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagcaactctcagctgtagg g cctcccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccaaggttgct g atatatgatgcaagcaaaagagccacagggatccctgctaggttctctggttctggctctggaacag attttactcttaccatttcctcacttgagcctgaagactttgcagtgtactattgccagcagagaagtaa g tggccaccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggctgcacctt ct gtcttcatctttccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttcagtggtttgtctgctcaataa cttctacccaagggaggccaaggtgcagtggaaggttgacaatgcattgcagtctggaaacagtc a agagtctgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatcta a

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		ggctgattatgagaaacacaaggtgtatgcttgtgaagttacacatcaggggctgagctcccctgtg a ccaaaagctttaataggggggagtgttag
(SEC ID NO: 97) Completo: 2694 IL-2 Péptido señal: 1-60 LC: 61-705 Codón de detención: 706-708 IRES: 709-1293 IL-10 Péptido señal: 1294-1347 HC: 1348-2691 Codón de detención:	ORF # 15	atgtacagaatgcagctgctcagctgcattgccttgtcccttgctctggtgaccaactctgagattgtct taacacaatcacctgcaactctgagtctaagtcctggagaaagagcaactctcagctgtagggcct c ccagtctgtttcaagttatctggcttggtaccagcaaaagccaggacaggccccaaggttgctgata t atgatgcaagcaaaagagccacagggatccctgctaggttctctggttctggctctggaacagatttt actcttaccatttcctcacttgagcctgaagactttgcagtgtactattgccagcagagaagtaagtgg ccaccctggacatttgggcaaggcaccaaagtagagagcaagagaactgtggctgcaccttctgt c ttcatctttccaccctctgatgaacagctgaaatcaggtactgcttcagtggtttgtctgctcaataacttc tacccaagggaggccaaggtgcagtggaaggttgacaatgcattgcagtctggaaacagtcaag a gtctgtaacagaacaggattccaaagacagcacctattcactttccagtactctgaccttatctaagg c tgattatgagaaacacaaggtgtatgcttgtgaagttacacatcaggggctgagctcccctgtgacc a aaagctttaataggggggagtgttaggcccctctccctccccccccctaacgttactggccgaagc cgcttggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattgccgtcttttggcaatgtg agggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaag gaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaacaa c gtctgtagcgacccctttgcaggcagcggaacccccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaa agccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggata g ttgtggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgcccagaag g

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
2692-2694		tacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtacacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaa aaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataatatgg c cacaatgcacagctctgccctgctctgctgtttggtgcttctgacaggagtcagggctcaggttgagtt agtggaatctggaggggtgtagtgcaacctggcagatcacagaggctgagttgtgcagcaagtg gattcacatttagctcctatgggatgcattgggtcagacaggcccctggcaagggtctagagtgggt ggctatcatttggtttgatggatcttcaacttattatgctgatagtgttagggggagatttactataagca gggacaactccaaaaataccctctatctgcaaatgaactctttgagagcagaagatacagctgtgt ac ttctgtgctagggagctgggcagaaggtattttgacctttggggcagaggaactcttgtctctgtatcct cagcaagtaccaaggggccatctgtgttcccactggccccctcttccaaaagtacatcaggtggca c agcagctctgggatgcttggttaaggattactttcctgaaccagtgactgtcagctggaatagtgggg ccttgacttctggggtgcacacattccctgcagtccttcagtcctctggtctgtattcattatccagtgtg gttacagtgccttctagctccctgggaactcagacctacatctgtaatgtaaatcataaaccaagca ac acaaaggtggacaagaaagttgagcccaagtcttgtgataaaacccacacttgtccaccttgccc ag cccctgagctacttgggggcccttcagtttttctgttcccacccaagcctaaagacacattgatgatta gtaggactcctgaagtgacctgtgttgtggtggatgtttcccatgaggacccagaagtaaagttcaat t ggtatgtggatggagttgaggtgcacaatgctaagactaaaccaagagaagagcagtataatag ca catacagggttgtgtcagttctgacagtgcttcaccaagactggctcaatggaaaggagtataaatg c aaggtatctaataaggccctgcctgcacctattgaaaaaactatttcaaaggctaaagggcagcca a gagagccccaggtctacaccctgcctccatccagggatgaattaacaaagaaccaggtgagtctc

SEC ID NO/longitud	Nombre	Secuencia
		a cttgcctggttaaaggtttttatccctctgatattgctgtggagtgggagtctaatggccaaccagaaaa taactacaagaccacacctccagtcttggactctgatggaagcttctttctttactcaaagctgactgtg gacaaaagtagatggcagcaggggaatgtgttcagctgttctgttatgcatgaggcactacacaac c attatacccagaagtctctcagtctgtcacctggcaaatag

Se diseñaron *in silico* las siguientes secuencias de ácido nucleico de casete de expresión de anticuerpos anti-IGF-1R modificados (mostradas en la Tabla 17) correspondientes a los SEC ID NOs: 68-76. Las construcciones de expresión incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican el promotor, la cadena pesada y la cadena ligera. Las construcciones de expresión incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican un promotor, una cadena pesada y una cadena ligera. Algunas secuencias también incluyen un sitio de escisión de furina, un péptido F2A, un enlazador, un IRES y un segundo promotor.

Tabla 17. Casetes de expresión que codifican un anticuerpo IGFR-alfa

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
(SEC ID NO: 68) Completo: 4479	EC # 1 H-F2A-L	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
ITR: 1-130 CMV potenciador: 149-528 Promotor CBA: 531-806 intrón CAG: 807-1870 Péptido señal de la IL-10: 1898-1951 HC: 1952-3295 Sitio de escisión de la furina: 3296-3307 Enlazador: 3308-3319 F2A: 3320-3391 Péptido señal de IL-2: 3392-3451 LC: 3452-4096		TTCCTTAGTATTAAACGCGTGTCGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGT TCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG CGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGC AGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGC GAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGC GGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCC GCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTC CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTC TTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGG CCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGG CGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCT CCGCAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCA CGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTG CGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCG CGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGA GTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGG GCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCG GCGGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCG

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
Codón de detención: 4097-4099 bGHpA: 4106-4329 ITR: 4339-4479		GGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCC GGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA TGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAA ATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCC TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAA GGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCC GTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGC TTCTGGCGTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCATGTTC ATGCCTTCTTCTCTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGT TGTTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCA GCTAGCGCCACCATGCACAGCTCCGCCCTGCTCTGCTGTTTGG TGCTTCTGACCGGCGTCCGGGCTCAGGTTGAGTTAGTGGAAT CTGGAGGGGGTGTAGTGCAACCCGGCAGATCACAGAGGCTG AGTTGCGCAGCGTCGGGATTCACATTTAGCTCCTACGGGATG CATTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTG GCTATCATTTGGTTCGACGGATCTTCAACTTATTACGCCGATA GTGTTCGAGGGCGTTTTACGATAAGCCGGGACAACTCCAAAA ATACCCTCTATCTGCAAATGAACTCTTTGAGAGCAGAAGATA CAGCCGTGTACTTCTGTGCTAGGGAGCTGGGCCGCCGGTATT TTGACCTTTGGGGCAGAGGAACTCTCGTCAGCGTATCCTCAG CAAGTACCAAGGGGCCAAGCGTGTTCCCGCTGGCCCCCTCTT CCAAATCGACATCAGGTGGCACCGCGGCTCTGGGATGCCTCG TTAAGGATTACTTTCCTGAACCAGTGACTGTCAGCTGGAATA GTGGGGCCTTGACGTCTGGCGTGCACACATTCCCCGCAGTCC TTCAGTCCAGCGGTCTGTATTCATTATCCAGTGTGGTTACCGT GCCTTCTAGCTCCCTGGGAACTCAGACCTACATCTGTAACGT AAATCATAAACCAAGCAACACAAAGGTGGACAAGAAAGTCG AGCCCAAGTCTTGCGATAAAACCCACACTTGTCCGCCTTGCC CAGCCCCCGAGCTACTCGGGGGCCCTTCAGTTTTTCTGTTCCCAC CCAAGCCTAAAGACACATTGATGATTAGTAGGACGCCCGA

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		AGTGACCTGTGTCGTGGTGGATGTTTCCCATGAGGACCCAGA AGTAAAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCACAA CGCTAAGACTAAACCGCGCGAAGAGCAGTATAATAGCACAT ACCGAGTCGTGTCGGTTCTGACCGTGCTTCACCAAGACTGGC TCAACGGAAAGGAGTATAAATGCAAGGTATCTAATAAGGCC CTGCCCGCACCTATCGAAAAAACTATTTCAAAGGCTAAAGGG CAGCCACGTGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCTCCATCCCGG GACGAATTAACAAAGAACCAGGTGAGTCTCACGTGCCTGGTT AAAGGTTTTTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCT AACGGCCAACCGGAAAATAACTACAAGACCACACCTCCAGT CTTGGACTCCGATGGAAGCTTCTTTCTTTACTCAAAGCTGACT GTGGACAAAAGTAGATGGCAGCAGGGGAATGTGTTCAGCTG TTCCGTTATGCATGAGGCGCTACACAACCATTATACCCAGAA GTCTCTCTCGCTGTCACCCGGCAAAAGAAAGAGAAGGAGTGG CTCAGGAGCCCCTGTGAAACAGACCCTGAACTTTGACCTCTT GAAGCTTGCTGGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCAATGTA CCGGATGCAGCTGCTCAGCTGCATCGCCTTGTCCCTTGCTCTG GTGACCAACTCTGAGATTGTCTTAACACAATCACCCGCAACT CTGAGTCTATCGCCTGGCGAAAGAGCGACGCTCAGCTGTAGG GCCTCCCAGTCTGTTTCAAGTTATCTGGCTTGGTACCAGCAAA AGCCAGGACAGGCCCCGCGCTTGCTGATATATGACGCAAGCA AACGAGCCACCGGGATCCCCGCTCGTTTCTCCGGTTCTGGCA GCGGAACAGATTTTACTCTTACCATTTCCTCACTCGAGCCTGA AGACTTCGCAGTGTACTATTGCCAGCAGCGGAGTAAGTGGCC ACCCTGGACATTTGGGCAAGGCACCAAAGTAGAGAGCAAGA GAACTGTGGCCGCGCCTTCTGTCTTCATCTTTCCACCCTCCGA TGAACAGCTGAAATCGGGTACGGCTTCAGTGGTTTGTCTGCT CAATAACTTCTACCCGAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG TCGACAATGCATTGCAGAGCGGAAACAGTCAAGAGTCTGTAA CAGAACAGGATTCCAAAGACAGCACCTATTCACTTTCCAGTA CTCTGACCTTATCTAAGGCCGATTACGAGAAACACAAGGTGT

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		ACGCTTGCGAAGTTACACATCAGGGGCTGAGCTCCCCTGTGA CCAAAAGCTTTAATCGCGGCGAGTGTTAGCAATTGCTGTGCC TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCT TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAAT AAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATT CTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGG CTCTATGGAGCTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA CCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA GTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAGATCTG
(SEC ID NO: 69) Completo: 4799 ITR: 1-130 CMV potenciador: 149-528 Promotor CBA: 531-806 intrón CAG: 807-1870 Péptido señal de IL-2: 1898-1957 LC: 1958-2602 Codón de	EC # 2 L-IRES-H	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCTTAGTATTAAACGCGTGTCGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGT TCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG CGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGC AGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGC GAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGC GGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCC

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
detención: 2603-2605 IRES2: 2606-3190 Péptido señal de IL-10: 3191-3244 HC: 3245-4588 Codón de detención: 4589-4591 Poli(A) sintético: 4601-4649 ITR: 4659-4799		GCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTC CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTC TTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGG CCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGG CGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCT CCGCAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCA CGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTG CGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCG CGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGA GTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCG GGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCG GCGGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCG GGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCC GGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA TGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAA ATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCC TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAA GGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCC GTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGC TTCTGGCGTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCATGTTC ATGCCTTCTTCTCTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGT TGTTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCA GCTAGCGCCACCATGTACCGGATGCAGCTGCTCAGCTGCATC GCCTTGTCCCTTGCTCTGGTGACCAACTCTGAGATTGTCTTAA CACAATCACCCGCAACTCTGAGTCTATCGCCTGGCGAAAGAG CGACGCTCAGCTGTAGGGCCTCCCAGTCTGTTTCAAGTTATCT GGCTTGGTACCAGCAAAAGCCAGGACAGGCCCCGCGCTTGCT GATATATGACGCAAGCAAACGAGCCACCGGGATCCCCGCTCG

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		TTTCTCCGGTTCTGGCAGCGGAACAGATTTTACTCTTACCATT TCCTCACTCGAGCCTGAAGACTTCGCAGTGTACTATTGCCAG CAGCGGAGTAAGTGGCCACCCTGGACATTTGGGCAAGGCACC AAAGTAGAGAGCAAGAGAACTGTGGCCGCGCCTTCTGTCTTC ATCTTTCCACCCTCCGATGAACAGCTGAAATCGGGTACGGCT TCAGTGGTTTGTCTGCTCAATAACTTCTACCCGAGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTCGACAATGCATTGCAGAGCGGAAA CAGTCAAGAGTCTGTAACAGAACAGGATTCCAAAGACAGCA CCTATTCACTTTCCAGTACTCTGACCTTATCTAAGGCCGATTA CGAGAAACACAAGGTGTACGCTTGCGAAGTTACACATCAGG GGCTGAGCTCCCCTGTGACCAAAAGCTTTAATCGCGGCGAGT GTTAGGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGA AGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTAT TTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAA ACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCC CCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAG GAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT GTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGAC AGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCT GCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATA GTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGG ATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCTTTACATGTGTTTAG TCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGA CGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAA TGCACAGCTCCGCCCTGCTCTGCTGTTTGGTGCTTCTGACCGG CGTCCGGGCTCAGGTTGAGTTAGTGGAATCTGGAGGGGGTGT AGTGCAACCCGGCAGATCACAGAGGCTGAGTTGCGCAGCGTC GGGATTCACATTTAGCTCCTACGGGATGCATTGGGTCCGCCA GGCCCCTGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTGGCTATCATTTGGTT CGACGGATCTTCAACTTATTACGCCGATAGTGTTCGAGGGCG

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		TTTTACGATAAGCCGGGACAACTCCAAAAATACCCTCTATCT GCAAATGAACTCTTTGAGAGCAGAAGATACAGCCGTGTACTT CTGTGCTAGGGAGCTGGGCCGCCGGTATTTTGACCTTTGGGG CAGAGGAACTCTCGTCAGCGTATCCTCAGCAAGTACCAAGGG GCCAAGCGTGTTCCCGCTGGCCCCCTCTTCCAAATCGACATC AGGTGGCACCGCGGCTCTGGGATGCCTCGTTAAGGATTACTT TCCTGAACCAGTGACTGTCAGCTGGAATAGTGGGGCCTTGAC GTCTGGCGTGCACACATTCCCCGCAGTCCTTCAGTCCAGCGG TCTGTATTCATTATCCAGTGTGGTTACCGTGCCTTCTAGCTCC CTGGGAACTCAGACCTACATCTGTAACGTAAATCATAAACCA AGCAACACAAAGGTGGACAAGAAAGTCGAGCCCAAGTCTTG CGATAAAACCCACACTTGTCCGCCTTGCCCAGCCCCCGAGCT ACTCGGGGGCCCTTCAGTTTTTCTGTTCCCACCCAAGCCTAAA GACACATTGATGATTAGTAGGACGCCCGAAGTGACCTGTGTC GTGGTGGATGTTTCCCATGAGGACCCAGAAGTAAAGTTCAAT TGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCTAAGACTAAA CCGCGCGAAGAGCAGTATAATAGCACATACCGAGTCGTGTCG GTTCTGACCGTGCTTCACCAAGACTGGCTCAACGGAAAGGAG TATAAATGCAAGGTATCTAATAAGGCCCTGCCCGCACCTATC GAAAAAACTATTTCAAAGGCTAAAGGGCAGCCACGTGAGCC CCAGGTCTACACCCTGCCTCCATCCCGGGACGAATTAACAAA GAACCAGGTGAGTCTCACGTGCCTGGTTAAAGGTTTTTATCC CAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAACCGG AAAATAACTACAAGACCACACCTCCAGTCTTGGACTCCGATG GAAGCTTCTTTCTTTACTCAAAGCTGACTGTGGACAAAAGTA GATGGCAGCAGGGGAATGTGTTCAGCTGTTCCGTTATGCATG AGGCGCTACACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTCTCGCTGT CACCCGGCAAATAGTGACAATTGAATAAAAGATCTTTATTTT CATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGGAGCTCGAGAGGA ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGC TCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCG

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		GGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGC TGCAGATCTG
(SEC ID NO: 70) Completo: 4288 ITR: 1-130 CMV potenciador: 149-528 Promotor CMV: 529-732 Intrón SV40: 791-887 Péptido señal de IL-12: 954-1013 LC: 1014-1658 Codón de detención: 1659-1661 bGH poli(A): 1668-1842 Sitio de pausa: 1857-1948	CE # 3 Dual	CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCTTAGTATTAAACGCGTGTCGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTAC ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCA AGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACC AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCC CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCT ATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA GAAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGT CTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCA AATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAG GCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAAT TGTAGCCCGGTTAATTAAGCCACCATGTACCGGATGCAGCTG CTCAGCTGCATCGCCTTGTCCCTTGCTCTGGTGACCAACTCTG AGATTGTCTTAACACAATCACCCGCAACTCTGAGTCTATCGC CTGGCGAAAGAGCGACGCTCAGCTGTAGGGCCTCCCAGTCTG TTTCAAGTTATCTGGCTTGGTACCAGCAAAAGCCAGGACAGG CCCCGCGCTTGCTGATATATGACGCAAGCAAACGAGCCACCG GGATCCCCGCTCGTTTCTCCGGTTCTGGCAGCGGAACAGATTT TACTCTTACCATTTCCTCACTCGAGCCTGAAGACTTCGCAGTG TACTATTGCCAGCAGCGGAGTAAGTGGCCACCCTGGACATTT

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
EF-1α Promotor: 1967-2196 5' LTR (truncado): 2209-2477 Intrón quimérico HBG/IgHC: 2504-2636 Péptido señal de IL-10: 2686-2739 HC: 2739-4083 Codón de detención: 4084-4086 Poli(A) sintético: 4093-4141 ITR: 4148-4288		GGGCAAGGCACCAAAGTAGAGAGCAAGAGAACTGTGGCCGC GCCTTCTGTCTTCATCTTTCCACCCTCCGATGAACAGCTGAAA TCGGGTACGGCTTCAGTGGTTTGTCTGCTCAATAACTTCTACC CGAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTCGACAATGCATTG CAGAGCGGAAACAGTCAAGAGTCTGTAACAGAACAGGATTC CAAAGACAGCACCTATTCACTTTCCAGTACTCTGACCTTATCT AAGGCCGATTACGAGAAACACAAGGTGTACGCTTGCGAAGTT ACACATCAGGGGCTGAGCTCCCCTGTGACCAAAAGCTTTAAT CGCGGCGAGTGTTAGGCATGCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC CATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA AGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAAT TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGT GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTCTCAGAACTA ACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAACAAACT AGCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAA CATTTCTCTATCGAAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCA GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGG GGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGG CGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGC CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTA GTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGA ACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGC GCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGT CGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGT CCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCC TTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCT CTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTT GTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCGAAGTTGGTCG TGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTT TAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAG ACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATC

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		CACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATT ACAGCTCTTAAGGCTAGTTTAAACCACCATGCACAGCTCCGC CCTGCTCTGCTGTTTGGTGCTTCTGACCGGCGTCCGGGCTCAG GTTGAGTTAGTGGAATCTGGAGGGGGTGTAGTGCAACCCGGC AGATCACAGAGGCTGAGTTGCGCAGCGTCGGGATTCACATTT AGCTCCTACGGGATGCATTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAG GGTCTAGAGTGGGTGGCTATCATTTGGTTCGACGGATCTTCA ACTTATTACGCCGATAGTGTTCGAGGGCGTTTTACGATAAGC CGGGACAACTCCAAAAATACCCTCTATCTGCAAATGAACTCT TTGAGAGCAGAAGATACAGCCGTGTACTTCTGTGCTAGGGAG CTGGGCCGCCGGTATTTTGACCTTTGGGGCAGAGGAACTCTC GTCAGCGTATCCTCAGCAAGTACCAAGGGGCCAAGCGTGTTC CCGCTGGCCCCCTCTTCCAAATCGACATCAGGTGGCACCGCG GCTCTGGGATGCCTCGTTAAGGATTACTTTCCTGAACCAGTG ACTGTCAGCTGGAATAGTGGGGCCTTGACGTCTGGCGTGCAC ACATTCCCCGCAGTCCTTCAGTCCAGCGGTCTGTATTCATTAT CCAGTGTGGTTACCGTGCCTTCTAGCTCCCTGGGAACTCAGA CCTACATCTGTAACGTAAATCATAAACCAAGCAACACAAAGG TGGACAAGAAAGTCGAGCCCAAGTCTTGCGATAAAACCCAC ACTTGTCCGCCTTGCCCAGCCCCCGAGCTACTCGGGGGCCCTT CAGTTTTTCTGTTCCCACCCAAGCCTAAAGACACATTGATGAT TAGTAGGACGCCCGAAGTGACCTGTGTCGTGGTGGATGTTTC CCATGAGGACCCAGAAGTAAAGTTCAATTGGTACGTGGATGG CGTCGAGGTGCACAACGCTAAGACTAAACCGCGCGAAGAGC AGTATAATAGCACATACCGAGTCGTGTCGGTTCTGACCGTGC TTCACCAAGACTGGCTCAACGGAAAGGAGTATAAATGCAAG GTATCTAATAAGGCCCTGCCCGCACCTATCGAAAAAACTATT TCAAAGGCTAAAGGGCAGCCACGTGAGCCCCAGGTCTACACC CTGCCTCCATCCCGGGACGAATTAACAAAGAACCAGGTGAGT CTCACGTGCCTGGTTAAAGGTTTTTATCCCAGCGATATCGCCG TGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAACCGGAAAATAACTACAAG

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		ACCACACCTCCAGTCTTGGACTCCGATGGAAGCTTCTTTCTTT ACTCAAAGCTGACTGTGGACAAAAGTAGATGGCAGCAGGGG AATGTGTTCAGCTGTTCCGTTATGCATGAGGCGCTACACAAC CATTATACCCAGAAGTCTCTCTCGCTGTCACCCGGCAAATAG CCTAGGAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTG GTTTTTTGTGTGCTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC GACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAGATCTG
(SEC ID NO: 71) Completo: 4479 ITR: 1-130 CMV potenciador: 149-528 Promotor CBA: 531-806 intrón CAG: 807-1870 Péptido señal de la IL-10: 1898-1951 HC: 1952-3295 Furina: 3296-	EC #4 H-F2A-L	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCA AAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCTTAGTATTAAACGCGTGTCGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGT TCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG CGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGC AGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGC GAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGC GGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCC GCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
3307 Enlazador: 3308-3319 F2A: 3320-3391 Péptido señal de IL-2: 3392-3451 LC: 3452-4096 Codón de detención: 4097-4099 bGH poli(A): 4106-4329 ITR: 4339-4479		CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTC CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTC TTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGG CCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGG CGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCT CCGCAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCA CGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTG CGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCG CGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGA GTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCG GGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGGTGGCG GCGGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCG GGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCC GGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA TGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAA ATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCC TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAA GGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCC GTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGC TTCTGGCGTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCATGTTC ATGCCTTCTTCTCTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGT TGTTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCA GCTAGCGCCACCATGCACAGCTCCGCCCTGCTCTGCTGTTTGG TGCTTCTGACAGGAGTCAGGGCTCAGGTTGAGTTAGTGGAAT CTGGAGGGGGTGTAGTGCAACCTGGCAGATCACAGAGGCTG AGTTGCGCAGCAAGTGGATTCACATTTAGCTCCTATGGGATG CATTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTG GCTATCATTTGGTTTGATGGATCTTCAACTTATTATGCTGATA GTGTTAGAGGGCGCTTTACTATAAGCAGGGACAACTCCAAAA

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		ATACCCTCTATCTGCAAATGAACTCTTTGAGAGCAGAAGATA CAGCTGTGTACTTCTGTGCTAGGGAGCTGGGCCGCAGATATT TTGACCTTTGGGGCAGAGGAACTCTTGTCTCTGTATCCTCAGC AAGTACCAAGGGGCCATCTGTGTTCCCGCTGGCCCCCTCTTCC AAAAGTACATCAGGTGGCACCGCGGCTCTGGGATGCTTGGTT AAGGATTACTTTCCTGAACCAGTGACTGTCAGCTGGAATAGT GGGGCCTTGACTTCTGGGGTGCACACATTCCCCGCAGTCCTTC AGTCCAGCGGTCTGTATTCATTATCCAGTGTGGTTACAGTGCC TTCTAGCTCCCTGGGAACTCAGACCTACATCTGTAATGTAAAT CATAAACCAAGCAACACAAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAGTCTTGTGATAAAACCCACACTTGTCCGCCTTGCCCAGC CCCTGAGCTACTTGGGGGCCCTTCAGTTTTTCTGTTCCCACCC AAGCCTAAAGACACATTGATGATTAGTAGGACTCCTGAAGTG ACCTGTGTTGTGGTGGATGTTTCCCATGAGGACCCAGAAGTA AAGTTCAATTGGTATGTGGATGGAGTTGAGGTGCACAATGCT AAGACTAAACCGAGGGAAGAGCAGTATAATAGCACATACAG AGTTGTGTCAGTTCTGACAGTGCTTCACCAAGACTGGCTCAA TGGAAAGGAGTATAAATGCAAGGTATCTAATAAGGCCCTGCC CGCACCTATTGAAAAAACTATTTCAAAGGCTAAAGGGCAGCC AAGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCTCCATCCAGAGATGA ATTAACAAAGAACCAGGTGAGTCTCACTTGCCTGGTTAAAGG TTTTTATCCCTCTGATATTGCTGTGGAGTGGGAGTCTAATGGC CAACCAGAAAATAACTACAAGACCACACCTCCAGTCTTGGAC TCTGATGGAAGCTTCTTTCTTTACTCAAAGCTGACTGTGGACA AAAGTAGATGGCAGCAGGGGAATGTGTTCAGCTGTTCTGTTA TGCATGAGGCGCTACACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTCA GTCTGTCACCTGGCAAAAGAAAGAGAAGGAGTGGCTCAGGA GCCCCTGTGAAACAGACCCTGAACTTTGACCTCTTGAAGCTT GCTGGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCAATGTACAGAATG CAGCTGCTCAGCTGCATTGCCTTGTCCCTTGCTCTGGTGACCA ACTCTGAGATTGTCTTAACACAATCACCCGCAACTCTGAGTCT

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		AAGTCCTGGAGAAAGAGCAACTCTCAGCTGTAGGGCCTCCCA GTCTGTTTCAAGTTATCTGGCTTGGTACCAGCAAAAGCCAGG ACAGGCCCCGCGCTTGCTGATATATGATGCAAGCAAAAGGGC CACAGGGATCCCCGCTAGATTCAGCGGTTCTGGCAGCGGAAC AGATTTTACTCTTACCATTTCCTCACTTGAGCCTGAAGACTTT GCAGTGTACTATTGCCAGCAGCGGAGTAAGTGGCCACCCTGG ACATTTGGGCAAGGCACCAAAGTAGAGAGCAAGAGAACTGT GGCCGCGCCTTCTGTCTTCATCTTTCCACCCTCTGATGAACAG CTGAAATCAGGTACTGCTTCAGTGGTTTGTCTGCTCAATAACT TCTACCCAAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTTGACAAT GCATTGCAGAGCGGAAACAGTCAAGAGTCTGTAACAGAACA GGATTCCAAAGACAGCACCTATTCACTTTCCAGTACTCTGAC CTTATCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAGGTGTATGCTTG TGAAGTTACACATCAGGGGCTGAGCTCCCCTGTGACCAAAAG CTTTAATAGGGGGGAGTGTTAGCAATTGCTGTGCCTTCTAGTT GCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGAC CCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGA GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA AGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG AGCTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTC TCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGCTGCAGATCTG
(SEC ID NO: 72) Completo: 4795 ITR: 1-130 CMV potenciador: 149-528	EC # 5 L-IRES-H	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCTTAGTATTAAACGCGTGTCGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
Promotor CBA: 531-806 intrón CAG: 807-1870 Péptido señal de IL-2: 1898-1957 LC: 1958-2602 Codón de detención: 2602-2605 IRES2: 2606-3190 Péptido señal de IL-10: 3191-3245 HC: 3191-4594 Codón de detención: 4595-4597 Poli(A) sintético: 4597-4645		TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGT TCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG CGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGC AGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGC GAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGC GGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCC GCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTC CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTC TTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGG CCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGG CGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCT CCGCAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCA CGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTG CGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCG CGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGA GTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCG GGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCG GCGGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCG GGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCC GGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA TGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAA ATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCC

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
ITR: 4655-4795		TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAA GGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCC GTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGC TTCTGGCGTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCATGTTC ATGCCTTCTTCTCTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGT TGTTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCA GCTAGCGCCACCATGTACAGAATGCAGCTGCTCAGCTGCATT GCCTTGTCCCTTGCTCTGGTGACCAACTCTGAGATTGTCTTAA CACAATCACCCGCAACTCTGAGTCTAAGTCCTGGAGAAAGAG CAACTCTCAGCTGTAGGGCCTCCCAGTCTGTTTCAAGTTATCT GGCTTGGTACCAGCAAAAGCCAGGACAGGCCCCGCGCTTGCT GATATATGATGCAAGCAAAAGGGCCACAGGGATCCCCGCTA GATTCAGCGGTTCTGGCAGCGGAACAGATTTTACTCTTACCA TTTCCTCACTTGAGCCTGAAGACTTTGCAGTGTACTATTGCCA GCAGCGGAGTAAGTGGCCACCCTGGACATTTGGGCAAGGCA CCAAAGTAGAGAGCAAGAGAACTGTGGCCGCGCCTTCTGTCT TCATCTTTCCACCCTCTGATGAACAGCTGAAATCAGGTACTGC TTCAGTGGTTTGTCTGCTCAATAACTTCTACCCAAGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTTGACAATGCATTGCAGAGCGGAAA CAGTCAAGAGTCTGTAACAGAACAGGATTCCAAAGACAGCA CCTATTCACTTTCCAGTACTCTGACCTTATCTAAGGCTGATTA TGAGAAACACAAGGTGTATGCTTGTGAAGTTACACATCAGGG GCTGAGCTCCCCTGTGACCAAAAGCTTTAATAGGGGGGAGTG TTAGGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAA GCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATT TTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAA ACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCC CCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAG GAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT GTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGAC

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		AGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCT GCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATA GTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAAC AAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGG ATCTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCTTTACATGTGTTTAG TCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGA CGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAA TGCACAGCTCCGCCCTGCTCTGCTGTTTGGTGCTTCTGACAGG AGTCAGGGCTCAGGTTGAGTTAGTGGAATCTGGAGGGGGTGT AGTGCAACCTGGCAGATCACAGAGGCTGAGTTGCGCAGCAA GTGGATTCACATTTAGCTCCTATGGGATGCATTGGGTCCGCC AGGCCCCTGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTGGCTATCATTTGGT TTGATGGATCTTCAACTTATTATGCTGATAGTGTTAGAGGGCG CTTTACTATAAGCAGGGACAACTCCAAAAATACCCTCTATCT GCAAATGAACTCTTTGAGAGCAGAAGATACAGCTGTGTACTT CTGTGCTAGGGAGCTGGGCCGCAGATATTTTGACCTTTGGGG CAGAGGAACTCTTGTCTCTGTATCCTCAGCAAGTACCAAGGG GCCATCTGTGTTCCCGCTGGCCCCCTCTTCCAAAAGTACATCA GGTGGCACCGCGGCTCTGGGATGCTTGGTTAAGGATTACTTT CCTGAACCAGTGACTGTCAGCTGGAATAGTGGGGCCTTGACT TCTGGGGTGCACACATTCCCCGCAGTCCTTCAGTCCAGCGGT CTGTATTCATTATCCAGTGTGGTTACAGTGCCTTCTAGCTCCC TGGGAACTCAGACCTACATCTGTAATGTAAATCATAAACCAA GCAACACAAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAGTCTTGT GATAAAACCCACACTTGTCCGCCTTGCCCAGCCCCTGAGCTA CTTGGGGGCCCTTCAGTTTTTCTGTTCCCACCCAAGCCTAAAG ACACATTGATGATTAGTAGGACTCCTGAAGTGACCTGTGTTG TGGTGGATGTTTCCCATGAGGACCCAGAAGTAAAGTTCAATT GGTATGTGGATGGAGTTGAGGTGCACAATGCTAAGACTAAAC CGAGGGAAGAGCAGTATAATAGCACATACAGAGTTGTGTCA GTTCTGACAGTGCTTCACCAAGACTGGCTCAATGGAAAGGAG	

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		TATAAATGCAAGGTATCTAATAAGGCCCTGCCCGCACCTATT GAAAAAACTATTTCAAAGGCTAAAGGGCAGCCAAGGGAGCC CCAGGTCTACACCCTGCCTCCATCCAGAGATGAATTAACAAA GAACCAGGTGAGTCTCACTTGCCTGGTTAAAGGTTTTTATCCC TCTGATATTGCTGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAACCAGAA AATAACTACAAGACCACACCTCCAGTCTTGGACTCTGATGGA AGCTTCTTTCTTTACTCAAAGCTGACTGTGGACAAAAGTAGA TGGCAGCAGGGGAATGTGTTCAGCTGTTCTGTTATGCATGAG GCGCTACACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTCAGTCTGTCA CCGGCAAATAGCAATTGAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAG ATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGGAGCTCGAGAGGAACCCCT AGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTT GCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAG ATCTG
(SEC ID NO: 73) Completo: 4288 ITR: 1-130 CMV potenciador: 149-528 Promotor CMV: 529-732 Intrón SV40: 791-887 Péptido señal de	EC #6 Doble	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCTTAGTATTAAACGCGTGTCGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTAC ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCA AGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACC AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCC

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
IL-2: 954-1013 LC: 1014-1658 Codón de detención: 1659-1661 bGH poli(A): 1668-1842 sitio de pausa: 1857-1948 EF-1α Promotor: 1967-2196 5' LTR (truncado): 2209-2477 Intrón quimérico HGB/IgHC: 2504-2636 Péptido señal de IL-10: 2686-2739 HC: 2740-4083		CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCT ATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA GAAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGT CTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCA AATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAG GCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAAT TGTAGCCCGGTTAATTAAGCCACCATGTACAGAATGCAGCTG CTCAGCTGCATTGCCTTGTCCCTTGCTCTGGTGACCAACTCTG AGATTGTCTTAACACAATCACCCGCAACTCTGAGTCTAAGTC CTGGAGAAAGAGCAACTCTCAGCTGTAGGGCCTCCCAGTCTG TTTCAAGTTATCTGGCTTGGTACCAGCAAAAGCCAGGACAGG CCCCGCGCTTGCTGATATATGATGCAAGCAAAAGGGCCACAG GGATCCCCGCTAGATTCAGCGGTTCTGGCAGCGGAACAGATT TTACTCTTACCATTTCCTCACTTGAGCCTGAAGACTTTGCAGT GTACTATTGCCAGCAGCGGAGTAAGTGGCCACCCTGGACATT TGGGCAAGGCACCAAAGTAGAGAGCAAGAGAACTGTGGCCG CGCCTTCTGTCTTCATCTTTCCACCCTCTGATGAACAGCTGAA ATCAGGTACTGCTTCAGTGGTTTGTCTGCTCAATAACTTCTAC CCAAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTTGACAATGCATT GCAGAGCGGAAACAGTCAAGAGTCTGTAACAGAACAGGATT CCAAAGACAGCACCTATTCACTTTCCAGTACTCTGACCTTATC TAAGGCTGATTATGAGAAACACAAGGTGTATGCTTGTGAAGT TACACATCAGGGGCTGAGCTCCCCTGTGACCAAAAGCTTTAA TAGGGGGGAGTGTTAGGCATGCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAG CCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGG AAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGG TGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTCTCAGAACT AACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAACAAAC TAGCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAA CATTTCTCTATCGAAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCA

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
Codón de detención: 4084-4086 Poli(A) sintético: 4093-4141 ITR: 4148-4288		GTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGG GGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGG CGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGC CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTA GTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGA ACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGC GCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGT CGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGT CCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCC TTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCT CTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTT GTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCGAAGTTGGTCG TGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTT TAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAG ACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATC CACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATT ACAGCTCTTAAGGCTAGTTTAAACCACCATGCACAGCTCCGC CCTGCTCTGCTGTTTGGTGCTTCTGACAGGAGTCAGGGCTCAG GTTGAGTTAGTGGAATCTGGAGGGGGTGTAGTGCAACCTGGC AGATCACAGAGGCTGAGTTGCGCAGCAAGTGGATTCACATTT AGCTCCTATGGGATGCATTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAG GGTCTAGAGTGGGTGGCTATCATTTGGTTTGATGGATCTTCAA CTTATTATGCTGATAGTGTTAGAGGGCGCTTTACTATAAGCA GGGACAACTCCAAAAATACCCTCTATCTGCAAATGAACTCTT TGAGAGCAGAAGATACAGCTGTGTACTTCTGTGCTAGGGAGC TGGGCCGCAGATATTTTGACCTTTGGGGCAGAGGAACTCTTG TCTCTGTATCCTCAGCAAGTACCAAGGGGCCATCTGTGTTCCC GCTGGCCCCCTCTTCCAAAAGTACATCAGGTGGCACCGCGGC TCTGGGATGCTTGGTTAAGGATTACTTTCCTGAACCAGTGACT GTCAGCTGGAATAGTGGGGCCTTGACTTCTGGGGTGCACACA TTCCCCGCAGTCCTTCAGTCCAGCGGTCTGTATTCATTATCCA

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		GTGTGGTTACAGTGCCTTCTAGCTCCCTGGGAACTCAGACCT ACATCTGTAATGTAAATCATAAACCAAGCAACACAAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAGTCTTGTGATAAAACCCACACTT GTCCGCCTTGCCCAGCCCCTGAGCTACTTGGGGGCCCTTCAGT TTTTCTGTTCCCACCCAAGCCTAAAGACACATTGATGATTAGT AGGACTCCTGAAGTGACCTGTGTTGTGGTGGATGTTTCCCAT GAGGACCCAGAAGTAAAGTTCAATTGGTATGTGGATGGAGTT GAGGTGCACAATGCTAAGACTAAACCGAGGGAAGAGCAGTA TAATAGCACATACAGAGTTGTGTCAGTTCTGACAGTGCTTCA CCAAGACTGGCTCAATGGAAAGGAGTATAAATGCAAGGTAT CTAATAAGGCCCTGCCCGCACCTATTGAAAAAACTATTTCAA AGGCTAAAGGGCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTG CCTCCATCCAGAGATGAATTAACAAAGAACCAGGTGAGTCTC ACTTGCCTGGTTAAAGGTTTTTATCCCTCTGATATTGCTGTGG AGTGGGAGTCTAATGGCCAACCAGAAAATAACTACAAGACC ACACCTCCAGTCTTGGACTCTGATGGAAGCTTCTTTCTTTACT CAAAGCTGACTGTGGACAAAAGTAGATGGCAGCAGGGGAAT GTGTTCAGCTGTTCTGTTATGCATGAGGCGCTACACAACCATT ATACCCAGAAGTCTCTCAGTCTGTCACCTGGCAAATAGCCTA GGAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTT TTTGTGTGCTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC AAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAGATCTG
(SEC ID NO: 74) Completo: 4488 ITR: 1-130 CMV potenciador: 149-528	EC#7 H-F2A-L	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCTTAGTATTAAACGCGTGTCGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
Promotor CBA: 531-806 intrón CAG: 807-1870 Péptido señal de la IL-10: 1898-1951 HC: 1952-3295 Codón de detención: 3296-3298 Furina: 3305-3316 Enlazador: 3317-3328 F2A: 3329-3400 Péptido señal de IL-2: 3401-3460 LC: 3461-4105 Codón de		TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGT TCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG CGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGC AGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGC GAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGC GGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCC GCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTC CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTC TTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGG CCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGG CGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCT CCGCAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCA CGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTG CGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCG CGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGA GTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCG GGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCG GCGGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCG GGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCC GGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA TGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAA ATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCC

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
detención: 4106-4108 bGH poli(A): 4115-4338 ITR: 4348-4488		TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAA GGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCC GTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGC TTCTGGCGTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCATGTTC ATGCCTTCTTCTCTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGT TGTTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCA GCTAGCGCCACCATGCACAGCTCTGCCCTGCTCTGCTGTTTGG TGCTTCTGACAGGAGTCAGGGCTCAGGTTGAGTTAGTGGAAT CTGGAGGGGGTGTAGTGCAACCTGGCAGATCACAGAGGCTG AGTTGTGCAGCAAGTGGATTCACATTTAGCTCCTATGGGATG CATTGGGTCAGACAGGCCCCTGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTG GCTATCATTTGGTTTGATGGATCTTCAACTTATTATGCTGATA GTGTTAGGGGGAGATTTACTATAAGCAGGGACAACTCCAAAA ATACCCTCTATCTGCAAATGAACTCTTTGAGAGCAGAAGATA CAGCTGTGTACTTCTGTGCTAGGGAGCTGGGCAGAAGGTATT TTGACCTTTGGGGCAGAGGAACTCTTGTCTCTGTATCCTCAGC AAGTACCAAGGGGCCATCTGTGTTCCCACTGGCCCCCTCTTC AAAAGTACATCAGGTGGCACAGCAGCTCTGGGATGCTTGGTT AAGGATTACTTTCCTGAACCAGTGACTGTCAGCTGGAATAGT GGGGCCTTGACTTCTGGGGTGCACACATTCCCTGCAGTCCTTC AGTCCTCTGGTCTGTATTCATTATCCAGTGTGGTTACAGTGCC TTCTAGCTCCCTGGGAACTCAGACCTACATCTGTAATGTAAAT CATAAACCAAGCAACACAAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAGTCTTGTGATAAAACCCACACTTGTCCACCTTGCCCAGC CCCTGAGCTACTTGGGGGCCCTTCAGTTTTTCTGTTCCCACCC AAGCCTAAAGACACATTGATGATTAGTAGGACTCCTGAAGTG ACCTGTGTTGTGGTGGATGTTTCCCATGAGGACCCAGAAGTA AAGTTCAATTGGTATGTGGATGGAGTTGAGGTGCACAATGCT AAGACTAAACCAAGAGAAGAGCAGTATAATAGCACATACAG GGTTGTGTCAGTTCTGACAGTGCTTCACCAAGACTGGCTCAA

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		TGGAAAGGAGTATAAATGCAAGGTATCTAATAAGGCCCTGCC TGCACCTATTGAAAAAACTATTTCAAAGGCTAAAGGGCAGCC AAGAGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCTCCATCCAGGGATGA ATTAACAAAGAACCAGGTGAGTCTCACTTGCCTGGTTAAAGG TTTTTATCCCTCTGATATTGCTGTGGAGTGGGAGTCTAATGGC CAACCAGAAAATAACTACAAGACCACACCTCCAGTCTTGGAC TCTGATGGAAGCTTCTTTCTTTACTCAAAGCTGACTGTGGACA AAAGTAGATGGCAGCAGGGGAATGTGTTCAGCTGTTCTGTTA TGCATGAGGCACTACACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTCA GTCTGTCACCTGGCAAATAGGGCAAAAGAAAGAGAAGGAGT GGCTCAGGAGCCCCTGTGAAACAGACCCTGAACTTTGACCTC TTGAAGCTTGCTGGGGATGTGGAGTCTAATCCTGGTCCAATG TACAGAATGCAGCTGCTCAGCTGCATTGCCTTGTCCCTTGCTC TGGTGACCAACTCTGAGATTGTCTTAACACAATCACCTGCAA CTCTGAGTCTAAGTCCTGGAGAAAGAGCAACTCTCAGCTGTA GGGCCTCCCAGTCTGTTTCAAGTTATCTGGCTTGGTACCAGCA AAAGCCAGGACAGGCCCCAAGGTTGCTGATATATGATGCAA GCAAAAGAGCCACAGGGATCCCTGCTAGGTTCTCTGGTTCTG GCTCTGGAACAGATTTTACTCTTACCATTTCCTCACTTGAGCC TGAAGACTTTGCAGTGTACTATTGCCAGCAGAGAAGTAAGTG GCCACCCTGGACATTTGGGCAAGGCACCAAAGTAGAGAGCA AGAGAACTGTGGCTGCACCTTCTGTCTTCATCTTTCCACCCTC TGATGAACAGCTGAAATCAGGTACTGCTTCAGTGGTTTGTCT GCTCAATAACTTCTACCCAAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTTGACAATGCATTGCAGTCTGGAAACAGTCAAGAGTCTGT AACAGAACAGGATTCCAAAGACAGCACCTATTCACTTTCCAG TACTCTGACCTTATCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAGGT GTATGCTTGTGAAGTTACACATCAGGGGCTGAGCTCCCCTGT GACCAAAAGCTTTAATAGGGGGGAGTGTTAGCAATTGCTGTG CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGC CTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTA

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		ATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA TTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGG AGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTG GGCTCTATGGAGCTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC GACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAGATCTG
(SEC ID NO: 75) Completo:4796 ITR: 1-130 CMV potenciador: 149-528 Promotor CBA: 531-806 intrón CAG: 807-1870 IL-2péptido señal: 1898-1957 LC: 1958-2602 Codón de detención: 2603-2605	EC # 8 LC-IRES-HC	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCTTAGTATTAAACGCGTGTCGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGT TCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGG CGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGC AGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGC GAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGC GGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCC GCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGA CCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTC CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTC TTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGG

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
IRES2: 2606-3190 Péptido señal de IL-10: 3191-3244 HC: 3245-4588 Codón de detención: 4589-4591 Poli(A) sintético: 4598-4646 ITR: 4656-4796		CCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGG CGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCT CCGCAGTGTGCGCGAGAGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCA CGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTG CGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCG CGGCGGTCGGGCTGTAACCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGA GTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCG GGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGGTGGCG GCGGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCG GGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCC GGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA TGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAA ATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCC TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAA GGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCC GTCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGG ACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGC TTCTGGCGTGTGACCGGCGGTCTAGACTCTGCTAACCATGTTC ATGCCTTCTTCTCTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGT TGTTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCAAGCTTCCA GCTAGCGCCACCATGTACAGAATGCAGCTGCTCAGCTGCATT GCCTTGTCCCTTGCTCTGGTGACCAACTCTGAGATTGTCTTAA CACAATCACCTGCAACTCTGAGTCTAAGTCCTGGAGAAAGAG CAACTCTCAGCTGTAGGGCCTCCCAGTCTGTTTCAAGTTATCT GGCTTGGTACCAGCAAAAGCCAGGACAGGCCCCAAGGTTGCT GATATATGATGCAAGCAAAAGAGCCACAGGGATCCCTGCTA GGTTCTCTGGTTCTGGCTCTGGAACAGATTTTACTCTTACCAT TTCCTCACTTGAGCCTGAAGACTTTGCAGTGTACTATTGCCAG CAGAGAAGTAAGTGGCCACCCTGGACATTTGGGCAAGGCAC CAAAGTAGAGAGCAAGAGAACTGTGGCTGCACCTTCTGTCTT

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		CATCTTTCCACCCTCTGATGAACAGCTGAAATCAGGTACTGCT TCAGTGGTTTGTCTGCTCAATAACTTCTACCCAAGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTTGACAATGCATTGCAGTCTGGAAAC AGTCAAGAGTCTGTAACAGAACAGGATTCCAAAGACAGCAC CTATTCACTTTCCAGTACTCTGACCTTATCTAAGGCTGATTAT GAGAAACACAAGGTGTATGCTTGTGAAGTTACACATCAGGGG CTGAGCTCCCCTGTGACCAAAAGCTTTAATAGGGGGGAGTGT TAGGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAG CCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTT TCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAA CCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCC CTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGG AAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTG TAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACA GGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTG CAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAG TTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACA AGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGAT CTGATCTGGGGCCTCGGTACACATGCTTTACATGTGTTTAGTC GAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACG TGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAATG CACAGCTCTGCCCTGCTCTGCTGTTTGGTGCTTCTGACAGGAG TCAGGGCTCAGGTTGAGTTAGTGGAATCTGGAGGGGGTGTAG TGCAACCTGGCAGATCACAGAGGCTGAGTTGTGCAGCAAGTG GATTCACATTTAGCTCCTATGGGATGCATTGGGTCAGACAGG CCCCTGGCAAGGGTCTAGAGTGGGTGGCTATCATTTGGTTTG ATGGATCTTCAACTTATTATGCTGATAGTGTTAGGGGGAGAT TTACTATAAGCAGGGACAACTCCAAAAATACCCTCTATCTGC AAATGAACTCTTTGAGAGCAGAAGATACAGCTGTGTACTTCT GTGCTAGGGAGCTGGGCAGAAGGTATTTTGACCTTTGGGGCA GAGGAACTCTTGTCTCTGTATCCTCAGCAAGTACCAAGGGGC

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		CATCTGTGTTCCCACTGGCCCCCTCTTCCAAAAGTACATCAGG TGGCACAGCAGCTCTGGGATGCTTGGTTAAGGATTACTTTCCT GAACCAGTGACTGTCAGCTGGAATAGTGGGGCCTTGACTTCT GGGGTGCACACATTCCCTGCAGTCCTTCAGTCCTCTGGTCTGT ATTCATTATCCAGTGTGGTTACAGTGCCTTCTAGCTCCCTGGG AACTCAGACCTACATCTGTAATGTAAATCATAAACCAAGCAA CACAAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAGTCTTGTGATA AAACCCACACTTGTCCACCTTGCCCAGCCCCTGAGCTACTTG GGGGCCCTTCAGTTTTTCTGTTCCCACCCAAGCCTAAAGACAC ATTGATGATTAGTAGGACTCCTGAAGTGACCTGTGTTGTGGT GGATGTTTCCCATGAGGACCCAGAAGTAAAGTTCAATTGGTA TGTGGATGGAGTTGAGGTGCACAATGCTAAGACTAAACCAAG AGAAGAGCAGTATAATAGCACATACAGGGTTGTGTCAGTTCT GACAGTGCTTCACCAAGACTGGCTCAATGGAAAGGAGTATAA ATGCAAGGTATCTAATAAGGCCCTGCCTGCACCTATTGAAAA AACTATTTCAAAGGCTAAAGGGCAGCCAAGAGAGCCCCAGG TCTACACCCTGCCTCCATCCAGGGATGAATTAACAAAGAACC AGGTGAGTCTCACTTGCCTGGTTAAAGGTTTTTATCCCTCTGA TATTGCTGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAACCAGAAAATAA CTACAAGACCACACCTCCAGTCTTGGACTCTGATGGAAGCTT CTTTCTTTACTCAAAGCTGACTGTGGACAAAAGTAGATGGCA GCAGGGGAATGTGTTCAGCTGTTCTGTTATGCATGAGGCACT ACACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTCAGTCTGTCACCTGG CAAATAGCAATTGAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTG TGTGTTGGTTTTTTGTGTGGAGCTCGAGAGGAACCCCTAGTG ATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAGATCT G
(SEC ID NO: 76) Completo: 4288	EC #9 Doble	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGG

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
ITR: 1-130 CMV potenciador: 149-528 Promotor CMV: 529-732 Intrón SV40: 791-887 Péptido señal de IL-2: 960-1013 LC: 1014-1658 Codón de detención: 1659-1661 bGH poli(A): 1668-1842 sitio de pausa: 1857-1948 EF-1α Promotor: 1967-2196		TTCCTTAGTATTAAACGCGTGTCGACATTGATTATTGACTAGT TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT GACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTAC ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCA AGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACC AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCC CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCT ATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA GAAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGT CTTTTTGTCTTTTATTTCAGGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCA AATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAG GCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAAT TGTAGCCCGGTTAATTAAGCCACCATGTACAGAATGCAGCTG CTCAGCTGCATTGCCTTGTCCCTTGCTCTGGTGACCAACTCTG AGATTGTCTTAACACAATCACCTGCAACTCTGAGTCTAAGTC CTGGAGAAAGAGCAACTCTCAGCTGTAGGGCCTCCCAGTCTG TTTCAAGTTATCTGGCTTGGTACCAGCAAAAGCCAGGACAGG CCCCAAGGTTGCTGATATATGATGCAAGCAAAAGAGCCACAG GGATCCCTGCTAGGTTCTCTGGTTCTGGCTCTGGAACAGATTT TACTCTTACCATTTCCTCACTTGAGCCTGAAGACTTTGCAGTG TACTATTGCCAGCAGAGAAGTAAGTGGCCACCCTGGACATTT GGGCAAGGCACCAAAGTAGAGAGCAAGAGAACTGTGGCTGC ACCTTCTGTCTTCATCTTTCCACCCTCTGATGAACAGCTGAAA TCAGGTACTGCTTCAGTGGTTTGTCTGCTCAATAACTTCTACC

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
5' LTR (truncado): 2209-2477 Intrón quimérico HBG/IgHC: 2504-2636 Péptido señal de IL-10: 2686-2739 HC: 2740-4083 Codón de detención: 4084-4086 Poli(A) sintético: 4093-4141 ITR: 4148-4288		CAAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTTGACAATGCATTG CAGTCTGGAAACAGTCAAGAGTCTGTAACAGAACAGGATTCC AAAGACAGCACCTATTCACTTTCCAGTACTCTGACCTTATCTA AGGCTGATTATGAGAAACACAAGGTGTATGCTTGTGAAGTTA CACATCAGGGGCTGAGCTCCCCTGTGACCAAAAGCTTTAATA GGGGGGAGTGTTAGGCATGCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC ATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA GGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATT GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTG GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTCTCAGAACTAA CATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAACAAACTA GCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAAC ATTTCTCTATCGAAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAG TGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG GGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGC GCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCC TTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAG TCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAAC ACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGC CCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCG CGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCC GCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTT TGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCT CCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGT TTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCGAAGTTGGTCGTG AGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTA AGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGAC TCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCA CTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGTTCAATTAC AGCTCTTAAGGCTAGTTTAAACCACCATGCACAGCTCTGCCC TGCTCTGCTGTTTGGTGCTTCTGACAGGAGTCAGGGCTCAGGT

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		TGAGTTAGTGGAATCTGGAGGGGGTGTAGTGCAACCTGGCAG ATCACAGAGGCTGAGTTGTGCAGCAAGTGGATTCACATTTAG CTCCTATGGGATGCATTGGGTCAGACAGGCCCCTGGCAAGGG TCTAGAGTGGGTGGCTATCATTTGGTTTGATGGATCTTCAACT TATTATGCTGATAGTGTTAGGGGGAGATTTACTATAAGCAGG GACAACTCCAAAAATACCCTCTATCTGCAAATGAACTCTTTG AGAGCAGAAGATACAGCTGTGTACTTCTGTGCTAGGGAGCTG GGCAGAAGGTATTTTGACCTTTGGGGCAGAGGAACTCTTGTC TCTGTATCCTCAGCAAGTACCAAGGGGCCATCTGTGTTCCCA CTGGCCCCCTCTTCCAAAAGTACATCAGGTGGCACAGCAGCT CTGGGATGCTTGGTTAAGGATTACTTTCCTGAACCAGTGACT GTCAGCTGGAATAGTGGGGCCTTGACTTCTGGGGTGCACACA TTCCCTGCAGTCCTTCAGTCCTCTGGTCTGTATTCATTATCCA GTGTGGTTACAGTGCCTTCTAGCTCCCTGGGAACTCAGACCT ACATCTGTAATGTAAATCATAAACCAAGCAACACAAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAGTCTTGTGATAAAACCCACACTT GTCCACCTTGCCCAGCCCCTGAGCTACTTGGGGGCCCTTCAGT TTTTCTGTTCCCACCCAAGCCTAAAGACACATTGATGATTAGT AGGACTCCTGAAGTGACCTGTGTTGTGGTGGATGTTTCCCAT GAGGACCCAGAAGTAAAGTTCAATTGGTATGTGGATGGAGTT GAGGTGCACAATGCTAAGACTAAACCAAGAGAAGAGCAGTA TAATAGCACATACAGGGTTGTGTCAGTTCTGACAGTGCTTCA CCAAGACTGGCTCAATGGAAAGGAGTATAAATGCAAGGTAT CTAATAAGGCCCTGCCTGCACCTATTGAAAAAACTATTTCAA AGGCTAAAGGGCAGCCAAGAGAGCCCCAGGTCTACACCCTG CCTCCATCCAGGGATGAATTAACAAAGAACCAGGTGAGTCTC ACTTGCCTGGTTAAAGGTTTTTATCCCTCTGATATTGCTGTGG AGTGGGAGTCTAATGGCCAACCAGAAAATAACTACAAGACC ACACCTCCAGTCTTGGACTCTGATGGAAGCTTCTTTCTTTACT CAAAGCTGACTGTGGACAAAAGTAGATGGCAGCAGGGGAAT GTGTTCAGCTGTTCTGTTATGCATGAGGCACTACACAACCATT

SEC ID NO /longitud	Nombre	Secuencia
		ATACCCAGAAGTCTCTCAGTCTGTCACCTGGCAAATAGCCTA GGAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTT TTTGTGTGCTCGAGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC AAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCAGATCTG

Ejemplo 2: Evaluación y caracterización *in vitro* de la proteína Anti-IGF-1R a partir de construcciones plasmídicas

Expresión de la proteína IGg

Las células se sembraron en placas de 48 pocillos tratadas con cultivo celular en medio normal con un 10% de suero bovino fetal y un 1% de penicilina-estreptomicina a una confluencia del 40-75%, dependiendo del tipo de célula y de la duplicación celular. Veinticuatro horas después de la siembra, cuando las células tenían una confluencia del 80-90%, se cambió el medio celular por 300 µl de medio fresco por pocillo, y los plásmidos que se iban a transfectar se diluyeron en OptiMEM y se incubaron con Lipofectamina 3000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos diluidos y la mezcla de Lipofectamina se añadieron al cultivo celular por triplicado a tres concentraciones (0.83 µg/ml, 0.42 µg/ml, y 0.21 µg/ml por pocillo; reportados como 250 ng, 125 ng, y 62.5 ng/pocillo en una placa de 48 pocillos). Después de 72 horas, se recogió el sobrenadante y se lavaron las células para la

extracción de ARN con PBS tres veces. Tanto el sobrenadante de los medios como las células se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis o procesamiento.

En el primer experimento, las células HEK293 se transfectaron como se ha descrito anteriormente con plásmidos que contenían las siguientes construcciones de teprotumumab en una columna sobredimensionada: H-F2A-L (ORF #1), H-F2A-L (ORF #2), L-IRES-H (ORF #12), L-IRES-H (ORF #13), Promotor dual (ORF #4 y 5), o Promotor dual (ORF #6 y 7), y se cuantificó la secreción total de IgG de teprotumumab (FIG. 4A). En el segundo experimento se transfectaron células HEK293 como se ha descrito anteriormente con plásmidos que contenían las siguientes construcciones de teprotumumab en una columna sobredimensionada: H-F2A-L (ORF #1), H-F2A-L (ORF #2), L-IRES-H (ORF #12) o L-IRES-H (ORF #13), o con las siguientes construcciones de plásmidos de teprotumumab en una columna pUC57: H-F2A-L (ORF #1) (plásmido) o L-IRES-H (ORF #12) (plásmido) (FIG. 4B).

La expresión de huIgG se determinó mediante inmunoensayos realizados con un kit Gyrolab xPlore y Gyrolab huIgG de baja titulación (Gyrolab). El kit incluía Bioaffy 1000HC CD, anticuerpos de captura biotinilados y de detección Alexafluor647, amortiguadores de lavado y diluyente estándar Reactivo E. Todos los sobrenadantes que contenían huIgG se centrifugaron a 1,000 g durante 30 minutos a 4°C y se analizaron

limpios. Para cuantificar la huIgG en cada sobrenadante, se preparó una curva estándar usando el estándar de huIgG de Gyrolab a partir de 25,000 pg/ml y se diluyó como recomienda la bibliografía del kit en reactivo E. La concentración se determinó usando el método de tres pasos específico del kit (captura - analito - detección), solución de dos lavados, PMT al 0.05%.

En el primer experimento, se secretó IgG entre 5 y 10 µg/ml con todos los plásmidos transfectados con AAV de teprotumumab, con la excepción del plásmido de promotor dual (ORF #6 y 7), en el que la expresión fue significativamente menor (FIG. 4A). En el segundo experimento, también se observaron altos niveles de secreción de teprotumumab en células transfectadas con los plásmidos de teprotumumab usando columnas sobredimensionadas, mientras que se observaron niveles más bajos en células transfectadas con los plásmidos de teprotumumab en columnas pUC57, con >5 µg/ml de teprotumumab secretado a partir de células HEK293 a las 72 horas post-transfección. Se observó una respuesta a la dosis en todas las construcciones. Además, el orden de las cadenas pesadas y ligeras y la secuencia enlazadora (F2A o IRES) parecían afectar a los niveles de expresión de teprotumumab (FIG. 4B).

Los anticuerpos secretados se analizaron mediante Western blot para estimar los patrones de expresión de las cadenas pesadas (HC) y ligeras (LC). Se usaron anticuerpos

únicos para detectar LC y HC, por lo que no fue posible realizar una cuantificación relativa. Sin embargo, no se observó un exceso de bandas de LC en los blots no reductores, ni bandas adicionales en ninguno de los blots para estas transfecciones, lo que indica la ausencia de especies parciales (FIG. 4C).

Se analizó el peso molecular y la pureza del sobrenadante recogido del cultivo de células HEK293T mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés) seguida de un Western Blot. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se recogió y se trató con el cóctel inhibidor de proteasas HALT. Como muestras de control positivo se usaron Teprotumumab recombinante (Invitrogen y Proteogenix) y anticuerpo de control del isotipo IgG1/Kappa (Abcam), y en cada pocillo se cargó el mismo volumen de sobrenadante de muestra. A continuación, las muestras se cargaron en geles prefabricados de Tris-Glicina: Se usaron geles de Tris-Glicina al 4-20% para condiciones reductoras y geles de Tris-Glicina al 8% para condiciones no reductoras. En un pocillo de cada gel se cargaron también escalas de proteínas teñidas previamente. Tras el análisis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon con amortiguador de bloqueo TBS sin proteínas (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. Tras el bloqueo, todos los blots se incubaron con una combinación de dos anticuerpos, diluidos 1:400 (condiciones reductoras) o

1:1000 (condiciones no reductoras) en amortiguador de bloqueo fresco: Anticuerpo monoclonal de conejo anti-humano de ligera Kappa conjugado con AF647 (Abcam), y Anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG1 Fc conjugado con HRP (Clon 43D17, Novus Biologicals). Estos anticuerpos se incubaron con los blots a 4°C durante toda la noche con agitación muy suave. Tras la incubación de los anticuerpos, los blots se lavaron con amortiguador TBS 3 veces durante 10 minutos cada una. A continuación, los blots se incubaron con el sustrato Pierce ECL Western Blotting y se obtuvieron imágenes en iBright usando el modo universal y Autodetect con dos canales: Quimioluminiscencia Pierce ECL y Fluorescencia AF647. Para cada blot se tomaron imágenes de los canales individuales, fusionados, y de la escalera de proteínas teñida previamente.

Expresión de ARNm

Se midieron los niveles de ARNm para comparar la transcripción y la traducción. También se compararon los niveles de expresión de las cadenas ligeras y pesadas, así como los niveles de ARNm de los diferentes plásmidos (FIG. 4D).

El ARN total se aisló de las células transfectadas usando el kit Zymo Quick-RNA 96 (Zymo Research, catálogo # R1052) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, el ARN aislado se sometió a tratamiento/purificación con DNasa usando el RNA Clean & Concentrator-96 Kit (Zymo Research, catálogo # R1080) siguiendo

las instrucciones del fabricante. La concentración del ARN aislado se midió mediante espectroscopia UV/VIS usando el instrumento NanoDropOne (ThermoFisher, catálogo # 13-400-518). El ARN transgénico se cuantificó mediante PCR cuantitativa de transcripción inversa de 1 paso (RT-qPCR) usando un ensayo de actividad 5'endonucleasa. Se usaron dos ensayos RT-qPCR separados para cuantificar el ARN que contiene la secuencia de codificación de proteínas para la cadena pesada y la cadena ligera de teprotumumab. Se usó ADN plasmídico linealizado con enzimas de restricción que contenía las secuencias de ADN de la cadena pesada y la cadena ligera del teprotumumab como patrón de cuantificación para los ensayos RT-qPCR de la cadena pesada y la cadena ligera.

Todos los cebadores y sondas RT-qPCR se adquirieron de Integrated DNA Technologies.

Cadena pesada: 5' TCTCACGTGCCTGGTTAAAG 3' (SEC ID NO: 98)

Cadena Pesada-Reversa: 5' GGAGGTGTGGTCTTGTAGTTATT 3' (SEC ID NO: 99)

Sonda de cadena pesada: 5' TATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAA 3'. (SEC ID NO: 100). Modificaciones de la sonda: 5' 6-FAM (Fluoresceína), 3' ZEN/Extintores de Iowa negros de fluorescencia.

Cadena Ligera-Adelante: 5' CGCCTTCTGTCTTCATCTTTCC 3' (SEC ID NO: 101)

Cadena Ligera-Reversa: 5' CCTCCCTCGGGTAGAAGTTATT 3' (SEC ID NO: 102)

Sonda de cadena ligera: 5' TACGGCTTCAGTGGTTTGTCTGCT3'. (SEC ID NO: 103) Modificaciones de la sonda: 5' 6-FAM (Fluoresceína), 3' ZEN/ Extintores de Iowa negros de fluorescencia.

Se usó TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher, # de catálogo 4444434) para crear la mezcla maestra de RT-qPCR de 1 paso. Se usó la plataforma de PCR QuantStudio 5 (ThermoFisher, catálogo # A28568) para la RT-qPCR, usando la configuración "Rápida" del instrumento. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 1) 50°C durante 5 minutos; 2) 95°C durante 20 segundos; 3) 95°C durante 3 segundos; 4) 60°C durante 30 segundos; y Repetir los pasos 3-4 39 veces.

Ensayo de unión a IGF-1R

También se midieron las características de unión de la proteína producida a partir de células transfectadas. La capacidad del Teprotumumab expresado y secretado para unirse al IGF-1R se evaluó usando la plataforma Gyros y una proteína IGF-1R recombinante biotinilada con un anticuerpo de detección anti-hIgG. El inmunoensayo de unión a IGF-1R para el cribado de Teprotumumab (anti-IGF-1R) se llevó a cabo usando un Gyrolab xPlore (Gyrolab). Se usaron Bioaffy 1000HC CD, amortiguadores de lavado y el diluyente estándar Reactivo E del kit Gyrolab

huIgG baja titulación. Como proteína de captura se usó IGF-1R humano biotinilado (Acro Biosystems) preparado a una concentración de 700 nM en agua estéril. Alexafluor647 anti-IgG humana Fc preparada a una concentración de 5 µg/ml en amortiguador Rexxip F (Gyrolab) sirvió como anticuerpo de detección. Todos los sobrenadantes que contenían anti-IGF-1R se centrifugaron a 1,000 g durante 30 minutos a 4°C y se analizaron limpios. Para cuantificar el anti-IGF-1R dentro de cada sobrenadante, se preparó una curva estándar usando el biosimilar Teprotumumab (Proteogenix) comenzando en 8,000 pg/ml y diluido paso 1:5 en reactivo E. La concentración se determinó usando el método de tres pasos específico del kit huIgG baja titulación (captura - analito - detección), dos soluciones de lavado, 0.05% PMT.

Los resultados mostraron que el Teprotumumab vectorizado se unía a su objetivo (IGF-1R) de forma dependiente de la concentración (FIG. 5A).

Ensayo de bloqueo de la actividad IGF-1R

Tras la activación del IGF-1R con el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) I o II, se fosforilan múltiples proteínas. El teprotumumab bloquea la activación del IGF-1R por el IGF e impide la fosforilación posterior. La actividad del teprotumumab vectorizado se midió por su capacidad de bloquear la fosforilación del IGF-1R. Se observó una reducción dependiente de la dosis en la activación del IGF-

1R por el factor de crecimiento insulínico (IGF) cuando las células HT-1080 se expusieron al Teprotumumab vectorizado y luego se trataron con 500 ng/ml de IGF. Se observó una reducción de 4 veces en la activación a una dosis de 500 ng/ml de teprotumumab vectorizado. Estos resultados mostraron que el teprotumumab recombinante y el teprotumumab vectorizado (secretado por plásmido) tenían curvas dosis-respuesta similares para la reducción de la fosforilación del IGF-1R (FIG. 6).

Se sembraron 3E5 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Al 90% de confluencia, las células se pretrataron durante 30 minutos con Teprotumumab recombinante (Invitrogen) o Teprotumumab vectorizado a partir del sobrenadante del cultivo celular 72 horas después de la transfección con plásmidos de Teprotumumab a una concentración de 100 ng-2 µg/ml (100 ng-2 µg/pocillo). Después de 30 minutos, algunos pocillos se trataron también con factor de crecimiento similar a la insulina recombinante (rIGF-I) (Invitrogen) durante 15 minutos a una concentración de 500 ng-1 µg/ml (500 ng-1 µg/pocillo). Transcurridos 15 minutos, se eliminó todo el sobrenadante celular y se enjuagaron las capas celulares con PBS enfriado con hielo. Se añadieron 600 □L de amortiguador de lisis MSD completo hecho con amortiguador de lisis MSD Tris e inhibidores de fosfatasas del kit de lisado de células enteras del Panel de Señalización de Insulina (Fosfo Proteína) (Meso Scale

Discovery, cat #K15151C-1) a la capa celular y se incubó la placa en hielo durante 30 minutos. Transcurridos 30 minutos, se usó una pipeta para mezclar cada pocillo de células y el amortiguador de lisis completo MSD; a continuación, se recogió la mezcla de cada pocillo en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó a 14,000 × g a 4°C durante 10 minutos. Tras el centrifugado, se recogió el sobrenadante.

Las muestras de proteína recogidas se usaron en el ensayo BCA (Pierce) para determinar la concentración de proteína en cada muestra en µg/ml de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ensayo MSD se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el kit del Panel de Señalización de Insulina (Fosfo Proteína). Brevemente, se bloqueó una placa MSD de 96 pocillos y 4 puntos a temperatura ambiente en un agitador de placas a 700 rpm durante 1 hora. Tras el bloqueo, la placa se lavó 3 veces con amortiguador de lavado Tris. A continuación, se cargaron por pocillo 7.5 µg proteínas totales (300 ng/µl) de cada muestra, diluidas en PBS. La placa MSD cargada con muestras y controles se triplicó, se selló y se incubó a temperatura ambiente en un agitador de placas a 700 rpm durante 1 hora. Tras la incubación de las muestras, la placa se lavó 3 veces con amortiguador de lavado Tris. A continuación, cada pocillo usado se cargó con solución de anticuerpo de detección (anticuerpo Sulfo TAG Anti-Py20,

reactivo del kit MSD, en amortiguador de lavado Tris + amortiguador de bloqueo) y la placa se incubó a temperatura ambiente en un agitador de placas a 700 rpm durante 1 hora. Tras la incubación del anticuerpo de detección, la placa se lavó 3 veces con amortiguador de lavado Tris. Se añadieron 150 µl de Amortiguador de Lectura T (reactivo del Kit MSD) a cada pocillo, y la placa se leyó en un instrumento MESO QuickPlex SQ 120, donde a cada pocillo se le asignaron 3 valores brutos, uno por cada objetivo detectada: Receptor-I del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina fosforilado; IRS-1 fosforilado, y Receptor de Insulina fosforilado.

Los datos de cada una de las 3 objetivos proteicos se analizaron por separado. Para cada objetivo, se determinó un valor de cambio de pliegue para cada muestra tratada usando la ecuación:

((Valor de la señal bruta de la muestra individual - valor de la señal bruta media sólo PBS))/((Valor de la señal bruta de la muestra sin tratamiento - valor de la señal bruta media sólo BPS))

Se realizaron análisis estadísticos de los valores de cambio de pliegues mediante ANOVA unidireccional.

Tanto el teprotumumab recombinante como el teprotumumab vectorizado inhibieron la fosforilación del IGF-1R de forma dependiente de la concentración y en una medida similar. La inhibición de la fosforilación fue estadísticamente

significativa en relación con los controles no tratados para todas las concentraciones probadas tanto para Teprotumumab recombinante como para Teprotumumab vectorizado, siendo Teprotumumab vectorizado más potente que el anticuerpo recombinante. Los resultados se presentan en la FIG. 6.

Ejemplo 3: Evaluación y caracterización *in vitro* de la proteína anti-IGF-1R expresada a partir de un vector AAV

El tratamiento de células HT-1080 y Colo205 con Teprotumumab recombinante o Teprotumumab a partir de sobrenadante de cultivo de células HEK293T recogido 72 horas después de la transducción con Teprotumumab AAV2 H-F2A-L (ORF # 2) mostró una disminución de los niveles de expresión total y de fosfo-IGF-1R (FIGS. 7A-7B).

Las células HEK293 se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia óptima. A continuación, se transdujeron las células con varias MOI (Multiplicidad De Infección. MOI = número de partículas virales por célula) de AAV-anti-IGF-1R (MOI 5E+3 a 5E+5) y se recolectaron los sobrenadantes de cada pocillo a las 72 horas después de la transfección.

Las células se sembraron a 1E5 (HT-1080) o 2E5 (Colo205) células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Al 50% de confluencia, se privó a todas las células de suero durante la noche. A continuación, las células se trataron con Teprotumumab recombinante (Invitrogen) o Teprotumumab del

sobrenadante de cultivo de células HEK293T 72 horas después de la transducción con Teprotumumab H-F2A-L (ORF # 2) administrado por AAV (UMass, lote # VCAV-08721) a 50 ng/ml, 100 ng/ml o 500 ng/ml. El pocillo de control para cada línea celular se trató con sobrenadante de cultivo celular 72 horas después de una transducción simulada y se denominó "simulacro". Las células se incubaron durante 48 horas. A las 48 horas, se eliminó el sobrenadante y se lavaron las capas celulares con PBS de grado de cultivo celular enfriado con hielo. Se añadieron 200 µl de amortiguador de lisis MSD completo de los kits de lisado de células enteras del panel de señalización de insulina (fosfoproteína) y (proteína total) recibidos de Meso Scale Discovery (Cat #K15151C y Cat #K15152C, respectivamente) a la capa celular y se incubó la placa en hielo durante 30 minutos. Transcurridos 30 minutos, se usó una pipeta para mezclar cada pocillo de células y el amortiguador de lisis completo de MSD; a continuación, la mezcla de cada pocillo se recogió en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó a 14,000 × g a 4°C durante 10 minutos. Tras el centrifugado, se recogió el sobrenadante (lisado de células enteras HT-1080 o Colo205) y se realizó la cuantificación de proteínas totales con el kit de ensayo BCA (Pierce) usando albúmina estándar de proteínas como curva estándar para determinar la concentración de proteínas de cada muestra. A continuación, se realizaron los paneles de señalización de insulina de proteína fosfo y total

con los lisados de células enteras de ambas líneas celulares, tal como se describe en el ejemplo 2.

El tratamiento de las células HT-1080 y COLO205 con teprotumumab recombinante o con un casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV que codifica teprotumumab produjo una disminución significativa del IFG-1R total y del IGF-1R fosforilado. Los resultados se presentan en las FIG. 7A y FIG. 7B.

También se emplearán métodos para evaluar las características de unión de la proteína producida a partir de células transducidas. Estos métodos incluirán la cuantificación de la proteína, la unión de la proteína al ligando IGFR, y la evaluación de la afinidad y la cinética de unión de la proteína anti-IGF-1R generada como se describe en el presente documento en comparación con la proteína anti-IGF-1R disponible comercialmente (Teprotumumab, conocido comercialmente como Tepezza).

La unión de la proteína anti-IGF-1R se probará mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y resonancia de plasmón superficial para la unión a IGFR y se comparará con la unión de Teprotumumab disponible comercialmente.

Ejemplo 4: Evaluación *in vitro* de la producción de citocinas y de los niveles de fosforilación del IGF-1R en fibrocitos normales y de pacientes de Graves tratados con

teprotumumab recombinante o vectorizado.

Aislamiento y paso de fibrocitos humanos de sangre periférica

Las muestras de sangre total periférica recolectadas en tubos de recolección con EDTA de donantes sanos o pacientes con Enfermedad de Graves (EG) se superpusieron sobre Ficoll (Ficoll-Paque, Cytiva, densidad 1.078 g/ml) para aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y, a continuación, se centrifugaron a 400 x g durante 40 minutos (sin interrupción). Se aisló la capa de PBMC (junto con una muestra de plasma), y a continuación se lavaron las células del donante/paciente de EG con tres veces su volumen en solución salina tamponada con fosfato (sin Ca++ ni Mg++), para un total de tres lavados, centrifugando inicialmente a 400 x g para el primer lavado, y a 180 x g para los lavados siguientes para eliminar cualquier resto de plaquetas. Tras el último lavado, las PBMC se resuspendieron en medio de cultivo de fibrocitos (medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) con 10% de suero de bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés), 1% de penicilina-estreptomicina (1000 U/ml), 1% de L-glutamina (200 mM)) y se contaron usando un hemocitómetro Neubauer mejorado. Las PBMC se resuspendieron a $1x10^7$ células/ml y se sembraron con $1x10^7$ células por pocillo en placas de cultivo tisular de 6 pocillos. Siete días después, se eliminaron las células no adherentes y

las células adherentes (fibrocitos) se lavaron 3 veces en PBS antes de añadir medio de cultivo fresco de fibrocitos a cada pocillo. Los cultivos se alimentaron con medio fresco cada 3-4 días y se controló la confluencia de las células para determinar cuándo debían pasarse. Para pasar las células, las células adherentes (fibrocitos) se lavaron con PBS y se trataron con una solución de tripsina/EDTA al 0.25% o con el reactivo de disociación celular StemPro Accutase (Gibco) para liberar las células de la placa de cultivo tisular, se recolectaron, se lavaron bien con PBS o medio de fibrocitos y se centrifugaron a 140 x g durante 7-10 minutos. A continuación, las células se resuspendieron en medio de cultivo Fibrocyte fresco y se sembraron a 1.0-1.4x10^4 células/cm^2 en placas o matraces o se usaron para experimentos posteriores (es decir, citometría de flujo, inmunocitoquímica, etc.).

Ensayo de bloqueo de la señalización insulina/IGF1R

La actividad de Teprotumumab vectorizado se midió por su capacidad para disminuir la concentración total de proteínas IGF-1R, IR o IRS-1 en fibrocitos derivados de la sangre periférica de pacientes con enfermedad de Graves o de donantes normales. Los fibrocitos se sembraron a 2 x 10^4 células/cm^2 en una placa de 24 o 48 pocillos con medio de cultivo de fibrocitos (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina (1000 U/ml) 1% de L-glutamina (200 mM)). Una

vez que las células alcanzaron ~70-80% de confluencia, se añadió a cada pocillo durante la noche (<20 horas) un medio fibrocitario sin suero FBS al 1% [medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 1% de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina (1000 U/ml)]. A continuación, se trataron las células con Teprotumumab recombinante (Invitrogen) o Teprotumumab vectorizado a partir de sobrenadante de cultivo de células HEK293T 72 horas después de la transducción con Teprotumumab H-F2A-L (ORF # 2) a 500 ng/ml. El pocillo de control para cada línea celular se trató con sobrenadante de cultivo celular 72 horas después de una transducción simulada y se denominó "simulacro" o medio para las condiciones tratadas con Teprotumumab recombinante. Después de 24 o 48 hora(s), las células se usaron para la generación de lisados celulares para la evaluación de IGFR, IR, o IRS-1 total o fosforilado en el Panel de Señalización de Insulina (Fosfo Proteína) y (Proteína Total) Kits de Lisado de Célula Entera recibidos de Meso Scale Discovery (Cat #K15151C y Cat #K15152C, respectivamente).

Estimulación de Fibrocitos con Factor de Crecimiento Insulínico u Hormona Estimulante de Tiroides con Bloqueo con Teprotumumab (profético)

Los fibrocitos se siembran a $2x10^4$ células/cm^2 en una placa de 24 pocillos o de 48 i con medio de cultivo de fibrocitos (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con

10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina (1000 U/ml),1% de L-glutamina (200 mM)). Una vez que las células alcanzan ~70-80% de confluencia, se añade a cada pocillo durante la noche (<20 horas) un medio fibrocitario sin suero FBS al 1% (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 1% de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina (1000 U/ml). A continuación, las células se tratan con Teprotumumab recombinante (Invitrogen) o Teprotumumab del sobrenadante de cultivo de células HEK293T 72 horas después de la transducción con un casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV que codifica Teprotumumab a 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml, 5,000 ng/ml. El pocillo de control de cada línea celular se trata con sobrenadante de cultivo celular 72 horas después de una transducción simulada y se denomina "simulacro". Los grupos de tratamiento designados se estimulan con hormona estimulante de la tiroides (TSH; 5 mU/ml) (R&D Systems) o factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1; 100 ng/ml) (R&D Systems). Después de 1, 24, y/o 48 hora(s), se recoge el sobrenadante para la evaluación de citocinas inflamatorias (IL-1β, IL-6, IL-8 y TNF-α) mediante el kit proinflamatorio de MSD y las células se usan para inmunocitoquímica o para la generación de lisados celulares para la evaluación de IGFR total o fosforilado en los kits de lisados de células enteras del panel de señalización de insulina (fosfoproteína) y (proteína total) (Meso Scale

Discovery, cat. # K15151C y cat. # K15152C, respectivamente).

Evaluación de la Producción de Citocinas Proinflamatorias por los Fibrocitos tras el Bloqueo con Factor de Crecimiento Insulínico o con Hormona Estimulante de Tiroides con Teprotumumab (Profética)

Los sobrenadantes de cultivos tisulares procedentes de cultivos de estimulación de fibrocitos se diluyen un mínimo de 2 veces usando Diluyente 2 del kit V-PLEX Plus Human Proinflammatory Panel II (4-Plex) (Mesoscale Discovery (MSD), catálogo #K15053G) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el calibrador liofilizado (suministrado por MSD) se reconstituye en 1 ml de Diluyente 2 y se invierte varias veces. La solución se deja equilibrar a temperatura ambiente (RT) durante 15-30 minutos y luego se agita brevemente en vórtex. A continuación, se realiza una dilución en serie de 4 veces y 8 puntos usando el calibrador como concentración más alta según las instrucciones del fabricante. El diluyente 2 se usa como calibrador cero. Los controles 1, 2 y 3 (suministrados por MSD) se reconstituyen añadiendo 250 µl de diluyente 2 a cada vial. Cada solución madre de control se deja durante 15-30 minutos a temperatura ambiente antes de agitar en vórtex y diluir los controles a una solución doble usando Diluyente 2. El amortiguador de lavado 1X y el amortiguador de lectura 2X también se preparan siguiendo las instrucciones del fabricante. La placa MSD se lava 3 veces con 150 µl/pocillo de amortiguador

de lavado antes de añadir 50 µl de muestras preparadas, calibradores y controles por pocillo. La placa se sella y se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de placas a 700 rpm. Durante el periodo de incubación, se prepara la solución de anticuerpos añadiendo 60 µl de cada uno de los anticuerpos de detección de IL-1β, IL-6, IL-8 y TNF-α a 2,760 µl de diluyente 3. La solución se agita en un vórtex a fondo antes de añadir 50 µl de las muestras preparadas, los calibradores y los controles por pocillo. La solución se agita a fondo en un vórtex. Una vez completadas las 2 horas de incubación, la placa se lava 3 veces usando 150 µL/pocillo de Amortiguador de Lavado. Se añaden 25 µl de solución de anticuerpo de detección a cada uno de los pocillos antes de sellar la placa y colocarla en el agitador de placas a 700 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la placa se lava 3 veces con 150 µl/pocillo de amortiguador de lavado. Se añade amortiguador de lectura (150 µL) a cada uno de los pocillos y se lee la placa en un instrumento MESO QuickPlex SQ 120.

Recolección de Lisados de Células Enteras

Tras 1, 24 y/o 48 horas de tratamiento de los fibrocitos como se ha descrito anteriormente, se recolectaron los lisados celulares según el protocolo de MSD con las siguientes modificaciones. Brevemente, se eliminaron los sobrenadantes celulares y se enjuagaron las monocapas celulares

con PBS de grado de cultivo celular enfriado con hielo. Se añadieron 150-200 µl de amortiguador de lisis MSD completo de los kits de lisado de células enteras del panel de señalización de insulina (fosfoproteína) y (proteína total) recibidos de Meso Scale Discovery (cat. # K15151C y cat. # K15152C, respectivamente) a las monocapas celulares y se incubó la placa en hielo durante 5 minutos. A continuación, se rasparon las monocapas celulares para poner los fibrocitos tratados en suspensión en la manteca de lisis completa. A continuación, se incubaron las células durante 25 minutos más en hielo. Después de la incubación, se usó una pipeta para mezclar cada pocillo de células y el amortiguador de lisis completa MSD, después se recogió la mezcla de cada pocillo en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se centrifugó a 14,000 x g en 4°C durante 10 minutos. A continuación, se sub-alicuotó el lisado y se almacenó a -80°C.

Cuantificación de la Proteína Total y Ensayo MSD de Señalización Múltiple de la Insulina

La cuantificación de la proteína total se realizó usando el DC Protein Assay Kit II (Bio-Rad) con albúmina estándar de proteína como curva estándar para determinar la concentración de proteína para cada muestra. A continuación, se realizaron los paneles de señalización de insulina fosfo y proteína total con los lisados de células enteras para cuantificar los niveles de IGF-1R, IRS e IR totales y/o

fosforilados. Brevemente, en la placa MSD de 96 pocillos y 4 puntos proporcionada por el kit del panel de señalización de insulina (proteína fosfo), se añadieron 150 µl de solución de bloqueo a cada pocillo que se iba a usar, se selló la placa con un precinto adhesivo y se incubó a temperatura ambiente en un agitador de placas a 750 rpm durante 1 hora. Tras el bloqueo, la placa se lavó 3 veces con amortiguador de lavado Tris. A continuación, se cargaron 5-7.5 µg de proteína total (200-300 ng/µl) diluida en PBS por pocillo, cargando cada muestra por triplicado. También se cargaron 3-4 pocillos con PBS solo como blanco/fondo. La placa MSD cargada con muestras por duplicado se selló con un precinto adhesivo y se incubó a temperatura ambiente en un agitador de placas a 750 rpm durante 1 hora. Tras la incubación de las muestras, la placa se lavó 3 veces con amortiguador de lavado Tris. A continuación, cada pocillo usado se cargó con solución de anticuerpo de detección de acuerdo con las instrucciones del kit respectivo, y la placa se incubó a temperatura ambiente en un agitador de placas a 750 rpm durante 1 hora. Tras la incubación del anticuerpo de detección, la placa se lavó 3 veces con amortiguador de lavado Tris. Se añadieron 150 µL de 1x Amortiguador de Lectura T diluido (reactivo del Kit MSD) a cada pocillo, y la placa se leyó en un instrumento MESO QuickPlex SQ 120, donde a cada pocillo se le asignaron valores brutos para el objetivo detectado. Los resultados de fosfo y proteína total se

analizaron por separado usando el software MSD Discovery Workbench. Para cada proteína, se determinó el valor de cambio en pliegues para cada muestra tratada mediante la ecuación: (Valor de la señal bruta de la muestra individual - valor de la señal bruta media sólo PBS) / (Valor de la señal bruta de la muestra del tratamiento de prueba - valor de la señal bruta media sólo PBS). El porcentaje de reducción de la expresión proteica tras el tratamiento con Teprotumumab vectorizado o recombinante en comparación con el control (simulacro o medio, respectivamente) se calculó usando la transducción de simulacro como expresión del 100% para el Teprotumumab vectorizado o el medio solo como nivel de expresión del 100%. El tratamiento de fibrocitos donantes con enfermedad de Graves (EG) o fibrocitos donantes normales con Teprotumumab vectorizado produjo una disminución de la proteína IGF-1R total (FIG. 8A). El tratamiento con Teprotumumab vectorizado también redujo la expresión del receptor de insulina tanto en fibrocitos normales como en fibrocitos de pacientes con EG (FIG. 8B). El Teprotumumab vectorizado también redujo la expresión de la proteína IRS-1 en los fibrocitos de la enfermedad de Graves (FIG. 8C). Por el contrario, el Teprotumumab recombinante tuvo un impacto limitado en la expresión de la proteína IGF-1R de los fibrocitos de donantes normales y no afectó a la expresión de IGF-1R de los fibrocitos de pacientes con GD.

Ejemplo 5: Evaluación *in vitro* de la Migración

Celular de Fibroblastos Normales y de Pacientes de Graves Tratados con Teprotumumab Recombinante o Vectorizado.

Se comprobará la capacidad del IGF1 para inducir la migración de células T. Para ello, se incubarán células T en presencia de IGF-1, IL-1β, IgG de la enfermedad de Graves, IgG de la enfermedad de Graves y anti-IGF-1R o IgG de la enfermedad de Graves y anticuerpos de control del isotipo. Se evaluará la migración de las células T y se comparará con las células T de control no tratadas.

Usando células aisladas de grasa orbital de pacientes con TED y pacientes de control sin antecedentes de TED, se evaluará el efecto de la proteína anti-IGF-1R generada y purificada a partir de sobrenadantes de células transfectadas con plásmido, células transducidas con AAV o ambas, tal como se describe en el Ejemplo 2 o 3.

Para ello, se obtendrán explantes de tejido adiposo orbital de pacientes con TED durante la descompresión de la grasa orbital y de individuos de control sin antecedentes de TED durante la blefaroplastia. Los explantes de tejido se trocearán y tratarán con colagenasa. Tras la digestión, los tejidos se colocarán directamente en placas de cultivo con DMEM/F12 que contengan un 20% de suero bovino fetal. Las células se pasarán en serie, y para los experimentos se usarán células del quinto al octavo pasaje celular.

Se usarán células primarias de fibroblastos para

medir los niveles de IGF-1R mediante MSD, y para determinar la dosis eficaz usando sobrenadantes de células transducidas a diferentes MOI de Teprotumumab vectorizado durante 24-48 horas. Tras el tratamiento, se evaluarán las vías de señalización descendentes, incluida la detección de IGF-1R, IR, IRS-1 (panel de señalización de fosfoinsulina), la fosforilación mediada por AKT y la medición de los niveles de citocinas mediante el panel proinflamatorio humano II (MSD), incluidas IL-16β, IL-6, IL-8 y TNF-α.

Las células normales y TED se transducirán con constructos AAV-anti-IGF-1R generados como se describe en el Ejemplo 1 y el sobrenadante de las células transducidas con AAV y las células de control no transducidas se analizarán en un ensayo de migración de células T como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 6: Evaluación *in vitro* de Fibrocitos Normales y de Pacientes de Graves Aislados de Sangre Periférica y Tratados con Vectores AAV-anti IGF-1R.

Los fibrocitos de células progenitoras de linaje monocitario derivadas de la médula ósea desempeñan un papel importante en la patogénesis de la oftalmología asociada a la tiroides. Se aislarán fibrocitos de pacientes sanos y con enfermedad de Grave, se evaluará la expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo con CD34+, CD45+, CXCR4+, colágeno 1, IGF-1R y TSHR y se evaluará el efecto de

la proteína anti-IGF-1R generada a partir de sobrenadantes de células transducidas con AAV. En primer lugar, los fibrocitos de donantes sanos o de pacientes con enfermedad de Graves con y sin orbitopatía se tratarán con IGF o TSH para estimular la actividad en las células fibrocitarias. A continuación, los fibrocitos se tratarán con sobrenadante de células transducidas con diferentes MOI de Teprotumumab vectorizado durante 24-48 horas. Se realizarán experimentos para determinar la eficacia del Teprotumumab vectorizado y establecer las concentraciones efectivas del anticuerpo anti-IGF-1R, incluyendo los niveles de expresión del IGF-1R mediante la medición de la señalización del IGF-1R (MSD), y cambios de IGF-1R por citometría de flujo o inmunocitoquímica, detectando la fosforilación de IGF-1R, IR, IRS-1 por el panel de señalización de fosfo insulina (MSD), y midiendo los niveles de citocinas como IL-6β, IL-6, IL-8 y TNF-α usando el panel proinflamatorio humano II (MSD).

Ejemplo 7: Un Modelo de Ratón de la Enfermedad de Graves

Se usará un modelo de ratón GO de acuerdo los métodos descritos en Zhang *et al*. Thyroid, 31: 638-648 y Moshkelgosha *et al*. Endocrinology, 154:3008-3015, 2013. Para ello, se inmunizarán ratones hembra BALB/c con un plásmido que sobre expresa la proteína de la subunidad A de la hTSHR. Unas 22 semanas después de la primera inmunización, los animales serán sangrados para evaluar los anticuerpos anti-TSHR inducidos.

Los animales con anticuerpos anti-hTHSR se dividirán en los siguientes grupos: un grupo de tratamiento inyectado con AAV-anti-IGF-1R, un grupo de tratamiento con Teprotumumab y un grupo simulado.

Los vectores AAV-anti-IGF-1R se inyectarán por vía intraorbital en la órbita izquierda. Los animales serán sacrificados a las 2, 4, 8 y 12 semanas de la dosis inicial. Se recolectará sangre para análisis de suero y se extirpará tejido orbital para análisis histopatológicos. También se evaluará la infiltración de células T en los tejidos orbitarios, así como los niveles de glicosaminoglicanos.

Los animales con anticuerpos anti-hTHSR y los ratones normales emparejados por edad serán evaluados mediante resonancia magnética antes y después de la administración de la terapia con el vector AAV-anti-IGF-1R para monitorizar el efecto del tratamiento sobre la proptosis.

Ejemplo 8: Un Modelo de Xenoinjerto Tumoral en Ratón con Células Derivadas del Colorrectal Humano, Colo205

Sin ceñirnos a una teoría concreta, se cree que el teprotumumab se une al IGF-R1 y bloquea su activación y la vía de señalización descendente. Esto conduce a la regulación a la baja de IGF-R1. La reducción de los niveles de IGF-R1 puede usarse como indicativo de la actividad biológica de un fármaco anti-IGF-1R.

Para evaluar la eficacia de los vectores AAV1, AAV2

y AAV9 portadores de casetes de expresión que codifican el anticuerpo anti-IGF-1R se eligió un modelo de xenoinjerto tumoral en ratón con una línea celular Colo205.

El estudio para evaluar la eficacia de la expresión exógena mediada por rAAV del anticuerpo anti-IGF-1R tras la inyección intratumoral se realizó en ratones nude xenoinjertados portadores de la línea celular Colo205. El xenoinjerto Colo205 tiene una alta expresión de IGF1-R y demuestra una cinética de crecimiento adecuada para un estudio de 1 mes. La expresión de IGF-1R y la reducción de la expresión de IGF-1R en las células Colo205 *in vitro* tras el tratamiento con Trepotumumab recombinante se confirmaron mediante MSD (FIG. 7B) e inmunohistoquímica (FIG. 9).

Las células Colo205 se sembraron a 40,000 células por pocillo en una placa negra de 96 pocillos de fondo transparente y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 90%. Para el tratamiento con Teprotumumab, las células Colo205 se trataron con 500 ng/ml de Teprotumumab recombinante (Invitrogen) en medio de cultivo y se incubaron durante 24-48 horas. Se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se lavaron los pocillos con PBS. Las células se fijaron usando una solución de formaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de lavados con PBS. Si las membranas celulares estaban permeabilizadas, las células se trataron con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 10 minutos,

seguido de un lavado con PBS. Las células se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 1 hora y, a continuación, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-IGF-1R (R&D Systems) diluido en BSA al 1% en PBS. Las células se lavaron con PBS y, a continuación, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad con anticuerpo anti-ratón conjugado con APC (R&D Systems) diluido en 1% de BSA en PBS. Las células se lavaron con PBS. Los núcleos celulares se tiñeron con 3 µM de DAPI (Invitrogen) en PBS durante 5 minutos. Las células se lavaron y se almacenaron en PBS para la obtención de imágenes usando el microscopio de fluorescencia Leica DMI8 con un objetivo 20x HC PL APO C52 0.75 seco. Los archivos de imagen se procesaron con el software ImageJ.

Modelo de ratón xenoinjertado Colo205

Se establecieron tumores humanos Colo205 subcutáneos en ratones desnudos atímicos hembra. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de aproximadamente 100 mm^3, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 8 animales en función del volumen tumoral. Los tumores se trataron con una única inyección intratumoral que contenía un casete de expresión de anticuerpo liberado por AAV que codificaba Teprotumumab (designado como AAVX.Teprotumumab (donde X era AAV 1, 2 o 9)) a las dosis indicadas en la Tabla 18 formuladas en 25 µl de un vehículo consistente en 350 mM NaCl, 5% D-sorbitol en PBS pH 7.4. Los animales de control no recibieron

tratamiento o recibieron un tratamiento sistémico. Los animales de control no recibieron tratamiento o recibieron teprotumumab sistémico. Los ratones se dividieron aleatoriamente en cohortes de eficacia (Tabla 18) y cohortes de muestreo (Tabla 19). Las cohortes de eficacia continuaron en el estudio hasta el día 31 para monitorizar el crecimiento tumoral. En el día 31 estos ratones fueron sacrificados. Se sacrificaron tres ratones de cada grupo en las cohortes de muestreo en los días 7, 14 y 28. Se recolectaron los tejidos pertinentes en el laboratorio. Se recolectaron tejidos relevantes en la necropsia para medir la FC, la PD y la biodistribución (Tabla 20).

Los tumores se midieron dos veces por semana con calibradores y el volumen tumoral se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$volumen\ tumoral\ (mm^3) = (longitud * ancho^2) * 0.5$$

Además de los volúmenes tumorales, se midieron los pesos corporales individuales al menos dos veces por semana junto con las observaciones clínicas.

Tabla 18: Asignación de tratamientos a los grupos de eficacia

Grupo	N	Agente	Dosis activa	Vía de administración	Horario
1	8	Sin tratar	N/A	-	-
2	8	Teprotumumab	6 mg/kg	IP	cada 7 días hasta el

Grupo	N	Agente	Dosis activa	Vía de administración	Horario
					final
3	8	AAV1. Teprotumumab	1.5E12 vg/ratón	IT	1x el día 1 del estudio
4	8	AAV9. Teprotumumab	1.5E12 vg/ratón	IT	1x el día 1 del estudio
5	8	AAV2. Teprotumumab	9.5E11 vg/ratón	IT	1x el día 1 del estudio

Tabla 19. Asignación de tratamientos a los grupos de muestreo

Grupo	N	Agente	Dosis activa	Vía de administración	Horario
1	9	Sin tratamiento	N/A	-	-
2	9	AAV1. Teprotumumab	1,5E12 vg/ratón	IT	1x el día 1 del estudio
3	9	AAV9. Teprotumumab	1,5E12 vg/ratón	IT	1x el día 1 del estudio
4	9	AAV2. Teprotumumab	9.5E11 vg/ratón	IT	1x el día 1 del estudio

IT = inyección intratumoral; IP= intraperitoneal

Tabla 20. Recolección y evaluación de tejidos

Tejido	Análisis
Suero	Análisis de proteínas para Teprotumumab
Tumor	Peso; Análisis de proteínas para Teprotumumab e IGF-R1; Análisis de ARN para AAV VCN, Teprotumumab y ARNm IGF-R1
Hígado y bazo	Análisis de ARN para AAV VCN, Teprotumumab y ARNm IGF-R1

Crecimiento tumoral

La administración intratumoral de casetes de expresión de anticuerpos que codifican Teprotumumab mediante

AAV1, AAV9 o AAV2 fue bien tolerada. No se observaron efectos significativos sobre el peso corporal ni signos clínicos adversos graves, aparte de los asociados habitualmente a la carga tumoral. El teprotumumab recombinante administrado por vía sistémica no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento tumoral en este estudio. Esto era de esperar teniendo en cuenta el rendimiento del fármaco y su efecto limitado en modelos de xenoinjerto de otros cánceres con alta expresión de IGF1-R (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 7,572,897). En el presente estudio, se usó el modelo de xenoinjerto Colo205 porque las células Colo205 tienen una alta expresión de IGF1-R y demuestran una cinética de crecimiento más rápida en comparación con las H322M usadas en otros modelos. Sin estar limitado por la teoría, este puede ser un factor que contribuya a la falta de un efecto observado con Teprotumumab recombinante incluso con el mismo régimen de dosis de 6 mg/kg cada 7 días. También cabe destacar que los casetes de expresión de anticuerpos codificados con Teprotumumab administrados con AAV se administraron una vez al inicio del estudio, mientras que el Teprotumumab recombinante sistémico se administró semanalmente. Los casetes de expresión de anticuerpos intratumorales AAV1 y AAV2 que codifican Teprotumumab tampoco parecieron tener efecto alguno sobre el crecimiento tumoral a lo largo del estudio. Sin embargo, el tratamiento intratumoral con casetes de expresión de anticuerpos AAV9 que codifican

Teprotumumab en tumores Colo205 establecidos produjo cierta inhibición del crecimiento tumoral. Inesperadamente, las mediciones medias del tumor en los días 11, 14 17 y 31 posteriores al tratamiento con AAV9. casetes de expresión de anticuerpos administrados por AAV que codifican el tratamiento con Teprotumumab fueron significativamente menores en comparación con los controles no tratados, así como con el Teprotumumab recombinante administrado sistémicamente (FIGS. 10A-10C). Además, la evaluación de la respuesta global mediante el área bajo las curvas calculada a partir de las curvas de volumen tumoral-tiempo también demostró un efecto significativo en relación con el brazo de control para los casetes de expresión de anticuerpos administrados por AAV9 que codifican Teprotumumab. No se observó ningún impacto en el AUC para Teprotumumab recombinante ni para los casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 o AAV2 que codifican Teprotumumab (Tabla 21).

Tabla 21. El AUC demuestra el retraso del crecimiento tumoral en ratones tratados con AAV9-Teprotumumab

Sólo brazo de eficacia	
Tratamiento	AUC d1-31
Controlar	171 ± 12
Tepro	164 ± 18
AAV1	153 ± 21
AAV9	141 ± 6*

AAV2	185 ± 35

*p<0,05 (prueba t unilateral)

Estos resultados demostraron el efecto de las terapias génicas intratumorales (IT) administradas en dosis única en comparación con la administración repetida de terapias monoclonales. En conjunto, la administración local de casetes de expresión del anticuerpo AAV9 que codifican Teprotumumab demostró ser superior a la administración sistémica del anticuerpo en este modelo de cáncer de colon. Además, los primeros signos de eficacia pueden haberse reducido en momentos posteriores debido a la dilución del AAV dentro de las células del tumor que se dividen rápidamente. Como se muestra en las FIGS. 14-16, tanto los genomas como el ARNm del vector disminuyeron en el transcurso del experimento, aunque la reducción de la expresión del ARNm del vector AAV9 fue mucho menor que la de los vectores AAV1 o AAV2.

Homogeneización de tumores

Los tejidos recolectados en el lugar del estudio animal se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80°C. Los tumores congelados se transfirieron a Covaris tissueTUBEs (un recipiente cerrado para la criopulverización), se enfriaron rápidamente en nitrógeno líquido y se pulverizaron en un pulverizador en seco Covaris cryoPREP. El polvo tumoral congelado se alicuotó y procesó por separado para ensayos moleculares y proteicos.

Aislamiento de ADN/ARN

Se pesó el polvo tumoral congelado y se añadió un volumen apropiado de amortiguador de lisis RLT Plus (Qiagen) que contenía 2-mercaptoetanol a una proporción de 20 µl de amortiguador de lisis/mg de polvo tumoral. La mezcla se añadió a un tubo reforzado de 2 ml que contenía perlas de óxido de circonio sobre hielo húmedo y se hizo oscilar rápidamente a 6500 RPM durante 3 ciclos de 30 segundos cada uno usando un homogeneizador de tejidos Precellys 24 (Bertin Technologies). Los restos tumorales restantes se eliminaron mediante centrifugación a 21,100 x g durante 3 minutos a 4°C. A continuación, se aisló el ADN/ARN de los homogeneizados tumorales clarificados usando el AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, cat. # 80204) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones madre de ADN/ARN aislado se cuantificaron usando un NanoDrop One (ThermoFisher). Los stocks de trabajo de las muestras de ADN y ARN del estudio se diluyeron hasta concentraciones uniformes en amortiguador TE con bajo contenido en EDTA antes del análisis.

Cuantificación de copias de ADN del genoma del vector (qPCR)

Las copias del genoma del vector en el tejido tumoral se determinaron mediante un ensayo de qPCR dirigido a la región de enlace F2A situada entre los transgenes codificadores de las cadenas pesada y ligera de Teprotumumab que se encuentran

en el vector H-FA2-L (ORF # 1). Se diseñaron cebadores y sondas (Tabla 22) exclusivos para esta región y se confirmó la especificidad del ensayo en la calificación. Modificaciones de la sonda: 5' 6-FAM (Fluoresceína), 3' Aglutinante de ranuras menores Aglutinante no fluorescente (Minor Groove Binder Nonfluorescent Quencher) (MGBNFQ). Se analizaron hasta 500 ng de ADN total de muestra.

Tabla 22. Cebadores y sonda qPCR

Reactivo ID	Secuencia	Conc. ensayo (nM)
Cebador hacia delante - Enlace F2A	5'-CCTGTGAAACAGACCCTGAA-3' (SEC ID NO: 104)	600
Sonda - Enlace F2A	5'-TGACCTTGAAGCTTGC -3' (SEC ID NO: 105)	250
Cebador inverso - Enlace F2	5'-TGGACCAGGATTAGACTCCA-3' (SEC ID NO: 106)	900

El plásmido linealizado que contenía la secuencia de enlace F2A se diluyó en serie para usarlo como patrón de ensayo con fines de cuantificación. Los estándares apropiados, los controles de calidad y las muestras de ADN diluidas se añadieron a una placa de PCR que contenía una mezcla de reacción de los cebadores y la sonda del enlace F2A. Las dianas se amplificaron usando los parámetros de termociclado qPCR establecidos (Tabla 23) en un instrumento QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Tabla 23. Parámetros de termociclado qPCR

Paso del ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	
1	95	1 minuto	
2	95	1 segundo	40 ciclos
3	60	20 segundos	

Las copias del genoma del vector se expresaron como copias/µg de ADN genómico del hospedero.

Las copias del genoma del vector (VCN) mostraron una disminución con el tiempo en los tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 que codifican Teprotumumab, casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV2 que codifican Teprotumumab y casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab, con los niveles más bajos en el día 28 en los tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV2 que codifican Teprotumumab. En los tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 que codifican Teprotumumab, casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV2 que codifican Teprotumumab y casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab, el VCN superó sistemáticamente los 10^4 desde el día 7 hasta el día 28, Sólo el VCN fue inferior a 10^4 en los tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV2 que codifican Teprotumumab

en el día 28 (FIG. 14 y FIG. 16).

Cuantificación de copias de expresión del ARNm del vector (RT-qPCR)

La expresión del ARNm del vector en el tejido tumoral se determinó mediante un ensayo RT-qPCR de un solo paso dirigido a la región de enlace F2A situada entre los transgenes codificantes de las cadenas pesada y ligera de Teprotumumab que se encuentran en el vector H-F2A-L (ORF # 1). Se diseñaron cebadores y sondas (Tabla 24) exclusivos para esta región y se confirmó la especificidad del ensayo en la cualificación. Se analizaron hasta 100 ng de ARN total de muestra.

El ensayo RT-qPCR se realizó como ensayo dúplex, también dirigido a un gen HPRT1 endógeno de ratón usando un conjunto de cebadores y sonda (Tabla 24) para controlar la integridad del ARNm y la posible inhibición de la matriz de la muestra.

Modificaciones de la sonda: 5' 6-FAM (Fluoresceína), 3' Aglutinante de ranuras menores Quencher no fluorescente (MGBNFQ) (Sonda - enlace F2A), y 5' VIC marcado con tinte, 3' QSY (Sonda - mHPRT1).

Tabla 24. Cebadores y sondas RT-qPCR

Reactivo ID	Secuencia	Conc. ensayo (nM)
Cebador hacia delante - Enlace F2A	5'-CCTGTGAAACAGACCCTGAA-3' (SEC ID NO: 107)	300
Sonda - Enlace F2A	5'- TGACCTTGAAGCTTGC-3' (SEC ID NO: 108)	200
Cebador inverso - Enlace F2A	5'-TGGACCAGGATTAGACTCCA-3' (SEC ID NO: 109)	600
Cebador hacia adelante - mHPRT1	5'-GTTAAGCAGTACAGCCCCAAAATG-3' (SEC ID NO: 110)	150
Sonda - mHPRT1	5'-AGCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAGT-3' (SEC ID NO: 111)	150
Cebador inverso - mHPRT1	5'-AAATCCAACAAAGTCTGGCCTGTA-3' (SEC ID NO: 112)	150

El plásmido linealizado que contenía la secuencia de enlace F2A se diluyó en serie para usarlo como patrón de ensayo con fines de cuantificación. Los estándares apropiados, los controles de calidad y las muestras de ARN diluidas se añadieron a una placa de PCR que contenía una mezcla de reacción de los cebadores y la sonda del enlace F2A. Los objetivos se amplificaron usando los parámetros de termociclado de RT-qPCR establecidos (Tabla 25) en un instrumento del sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Los datos se capturaron en el software QuantStudio (Applied Biosystems, v1.5.2), se fijaron los umbrales de ciclo de las dianas y se exportaron para su posterior análisis en Microsoft Excel

(v2209).

Tabla 25. Parámetros de termociclado RT-qPCR

Paso Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo	
1	50	5 minutos	
2	95	20 segundos	
3	95	3 segundos	40 ciclos
4	60	30 segundos	

La expresión de ARNm se notificó como copias monocatenario/µg de ARN hospedero.

La expresión de ARNm en tumores obtenidos de animales tratados con el casete de expresión de anticuerpos que codifican Teprotumumab administrado por AAV1 y el casete de expresión de anticuerpos que codifican Teprotumumab administrado por AAV9 no mostró una variación significativa con el tiempo desde el día 7 hasta el día 28, mientras que la expresión de ARNm en tumores obtenidos de animales tratados con el casete de expresión de anticuerpos que codifican Teprotumumab administrado por AAV2 mostró una disminución progresiva con el tiempo desde el día 7 hasta el día 28. Las copias de ARNm fueron constantemente superiores a 1095 en tumores obtenidos de animales tratados con AAV9 (FIG. 15). Las copias de ARNm fueron constantemente superiores a 107 en los tumores obtenidos de animales tratados con AAV9 (FIG. 15).

Ensayos de proteínas

Se pesó el polvo tumoral congelado y se añadió a un volumen apropiado de amortiguador de lisis que contenía un cóctel de inhibidores de la proteasa y la fosfatasa (10 µl de amortiguador de lisis/mg de polvo). La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos con vórtex intermitente pero minucioso. El sobrenadante se separó por centrifugación a 14,000 RPM durante 15 minutos a 4°C. El lisado resultante se analizó para determinar la concentración total de proteínas mediante DC Protein Assay (Bio Rad), se alicuotó y se almacenó a -80°C.

Niveles PK de Tepro en el tumor/suero

La concentración de teprotumumab en muestras tumorales y séricas se midió usando el kit de inmunoensayo sándwich IgG humana/NHP de MSD (K150JLD-2) con modificaciones. Se confirmó la ausencia de reactividad cruzada con IgG de ratón. Brevemente, se aplicaron controles de teprotumumab recombinante, controles de calidad y suero adecuadamente diluido (MRD 1:100) y lisados tumorales (0.125 mg/ml de proteína total) a una placa pre-cubierta con anticuerpo IgG antihumano de ratón. La placa se incubó con agitación durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavó la placa y se incubó con agitación con un anticuerpo IgG antihumano de ratón marcado con sulfo-etiqueta. Tras la incubación, se lavó la placa y se añadió amortiguador

de lectura MSD 2X a todos los pocillos de la placa y se leyó inmediatamente en el lector MESO QuickPlex SQ 120MM (Meso Scale Diagnostics, Rockville MD). Los datos se capturaron en el software Methodical Mind y se analizaron en el software MSD Discovery Workbench y Excel (v2201). Los niveles tumorales de Teprotumumab en los tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 que codifican Teprotumumab y casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab fueron sistemáticamente superiores a los niveles tumorales de Teprotumumab en los tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV2 que codifican Teprotumumab en los días 7, 14 y 28. Los niveles tumorales de Teprotumumab en tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 que codifican Teprotumumab y casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab también fueron superiores a los niveles tumorales de Teprotumumab en tumores obtenidos de animales tratados con Teprotumumab recombinante (6 mg/kg cada 7 días) en el día 31, siendo los niveles de Teprotumumab más altos en los tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab (FIG. 11).

Los niveles séricos de Teprotumumab en animales

tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 que codifican Teprotumumab y casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab fueron sistemáticamente superiores a los niveles séricos de Teprotumumab en animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV2 que codifican Teprotumumab en los días 7, 14 y 28. Los niveles séricos de Teprotumumab en animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 que codifican Teprotumumab y casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab también fueron superiores a los niveles séricos de Teprotumumab en animales tratados con Teprotumumab recombinante (6 mg/kg, cada 7 días) en el día 31, siendo los niveles de Teprotumumab los más elevados en el suero de los animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab (FIG. 12 y Tablas 26A-B).

Tabla 26A. Niveles séricos de proteína teprotumumab (ng/ml) por día

	AAV1.Teprotumumab			AAV2.Teprotumumab			AAV9.Teprotumumab			Teprotumumab 6 mg/kg cada 7 días (sólo día 31)		
	Media	SEM	n	Media	SEM	n	Media	SEM	n	Media	SEM	n
Día 7	2,266	1,572	3	56.5	15.5	3	173,379	28,011	3	-	-	-
Día	23,073	12,436	3	262.3	55	3	364,037	34,840	3	-	-	-

14												
Día 31	84,566	29,138	8	8,921	2,700	8	462,008	40,985	7	60,768	6,512	8

Tabla 26B. Niveles séricos de proteína de teprotumumab (ng/ml) en el día 31

Tratamiento	Media	SEM	N
AAV1.Teprotumumab	84,566	29,138	8
AAV2.Teprotumumab	8,921	2,700	8
AAV9.Teprotumumab	462,008	40,985	8
Teprotumumab 6 mg/kg cada 7 días	60,768	6512	8
Sin tratamiento	0	0	8

Niveles de IGF-1R

La concentración de IGF-1R en el tumor se midió usando el kit ELISA para IGF-1R humano de Invitrogen (EHIGF1R) con modificaciones. Se aplicaron estándares de IGF-1R, controles de calidad y lisados tumorales debidamente diluidos (0.5 mg/ml de proteína total) a una placa previamente recubierta con anticuerpo Anti-IGF1R. La placa se incubó durante toda la noche (aproximadamente 18 horas) a 4°C con agitación suave. Tras la incubación, la placa se lavó y se incubó con agitación durante aproximadamente 1 Hora a temperatura ambiente con un anticuerpo Anti IGF-1R biotinilado. Tras un lavado, el anticuerpo anti-IGF-1R biotinilado se unió al conjugado estreptavidina-HRP agitando la placa durante

aproximadamente 45 minutos a temperatura ambiente. Tras otro lavado, se detectó IGF-1R añadiendo sustrato TMB (1-step Ultra TMB, ThermoFisher). Se terminó la reacción y se midió el producto cromogénico usando SpectraMax 5 (Molecular Devices).

Los niveles de IGF-1R en tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 que codifican Teprotumumab, casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV2 que codifican Teprotumumab y casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab fueron sistemáticamente inferiores a los niveles de IGF-1R en tumores obtenidos de animales de control no tratados en los días 7, 14 y 28, y esta diferencia fue estadísticamente significativa en todos los puntos temporales. Los niveles de IGF-1R en los tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 que codifican Teprotumumab, casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV2 que codifican Teprotumumab y casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV9 que codifican Teprotumumab fueron ligeramente superiores que en los tumores obtenidos de animales tratados con Teprotumumab recombinante (6 mg/kg cada 7 días) en el día 31. Los niveles de IGF-1R en los tumores obtenidos de animales de control no tratados fueron sistemáticamente inferiores a los niveles de IGF-1R en los tumores obtenidos de animales de control no tratados en el día 7, 14 y 28, y esta

diferencia fue estadísticamente significativa en todos los puntos temporales, siendo los niveles de IGF-1R los más bajos en los tumores obtenidos de animales tratados con casetes de expresión de anticuerpos liberados por AAV1 que codifican Teprotumumab y casetes de expresión de anticuerpos li por AAV9 que codifican Teprotumumab (véanse las FIGS. 12A 12B y Tabla 27). La diferencia a día 31 en los niveles de IGF-1R entre los animales tratados con Teprotumumab administrado por AAV1 y AAV9 y los animales tratados con Teprotumumab recombinante no fue estadísticamente diferente.

Sólo hay una figura 12

Tabla 27. Niveles tumorales de proteína IGF-1R

	AAV1. Teprotumumab			AAV2. Teprotumumab			AAV9. Teprotumumab			Teprotumumab (6 mg/kg)			Sin tratamiento		
Día	Media (pg/mg)	SEM	N	Media (pg/mg)	SEM	N	Media (pg/mg)	SEM	N	Media (pg/mg)	SEM	N	Media (pg/mg)	SEM	N
7	591	71	3	693	41	3	461	27	3				1090	60	3
14	530	22	6	522	43	6	513	33	6				873	32	6
28	266	24	9	613	56	9	359	10	9				740	40	9
31	400	19	16	553	22	16	429	11	16	350	17	16	848	19	14

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.