

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 466**

51 Int. Cl.:

C12N 15/68 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2014 PCT/EP2014/002300**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15024667**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2014 E 14755335 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3036330**

54 Título: **Procedimiento para aumentar la expresión de proteínas codificadas por ARN**

30 Prioridad:
21.08.2013 WO PCT/EP2013/002512

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2019

73 Titular/es:
**CUREVAC AG (100.0%)
Paul-Ehrlich-Str. 15
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:
BAUMHOF, PATRICK

74 Agente/Representante:
AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 702 466 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para aumentar la expresión de proteínas codificadas por ARN

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) y que comprende al menos una modificación, que aumenta la expresión de la proteína o del péptido codificado, donde la al menos una modificación comprende una modificación del contenido de G/C en su región codificante en comparación con tal región codificante de tipo natural, donde la secuencia de aminoácidos traducida de la región codificante de tipo natural se mantiene, para su uso en un tratamiento médico, administrándose tal ARN modificado a un
- 10 sujeto mediante inyección neumática. La invención también se refiere a una composición farmacéutica y a un kit de partes que comprende dicho ARN modificado para la administración por inyección neumática, preferentemente para su uso en el campo de la terapia génica y/o la vacunación genética.

Estado de la técnica

- 15 La terapia génica y la vacunación genética son de los métodos más prometedores y de rápido desarrollo de la medicina moderna. Pueden proporcionar opciones altamente específicas e individualizadas para la terapia de una gran variedad de enfermedades. En particular, enfermedades genéticas hereditarias, pero también enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas, cánceres o enfermedades tumorales relacionadas, así como enfermedades inflamatorias pueden ser objeto de tales modos de terapia. También se prevén prevenir el comienzo temprano (precoz) de tales enfermedades mediante estos enfoques.

- 20 La principal razón conceptual que subyace en la terapia génica es la modulación apropiada de la expresión génica alterada asociada con afecciones patológicas de enfermedades específicas. La expresión génica patológicamente alterada puede resultar en la falta o la sobreproducción de productos génicos esenciales, por ejemplo factores de señalización tales como hormonas, factores de mantenimiento, enzimas metabólicas, proteínas estructurales o similares. La expresión génica alterada puede no solo deberse a una mala regulación de la transcripción y/o la traducción, sino que puede deberse también a mutaciones dentro de la codificación
- 25 ORF para una proteína particular. Las mutaciones patológicas pueden estar causadas, por ejemplo, por aberración cromosómica o por mutaciones más específicas, como mutaciones puntuales o mutaciones de cambio de marco, todas ellas pudiendo dar como resultado una funcionalidad limitada y potencialmente una pérdida total de la función del producto genético. Sin embargo, también puede producirse una mala regulación de la transcripción y/o de la traducción si las mutaciones afectan a genes que codifican proteínas que están implicadas en la maquinaria transcripcional o de traducción de la célula. Estas mutaciones pueden conducir a una sub-regulación o sobre-regulación patológica de los genes, que son, como tales, funcionales. Genes que codifican productos genéticos que ejercen tales funciones reguladoras pueden ser, por ejemplo, factores de transcripción, receptores de señal, proteínas mensajeras o similares. Sin embargo, la pérdida de la función de
- 30 tales genes que codifican proteínas reguladoras en ciertas circunstancias puede revertirse mediante la introducción artificial de otros factores que actúan aguas abajo del producto genético deteriorado. Dichos defectos genéticos también pueden compensarse por terapia génica mediante la sustitución del gen afectado en sí mismo.

- 40 Como puede verse de lo anterior, ambos métodos, la terapia génica y la vacunación genética, se basan esencialmente en la administración de moléculas de ácido nucleico a un paciente y la posterior transcripción y/o traducción de la información genética codificada.

- 45 Para la administración en el contexto de la terapia génica o la vacunación genética se puede emplear ADN y ARN como moléculas de ácido nucleico. Es sabido que el ADN es relativamente estable y fácil de manejar. Sin embargo, el uso de ADN conlleva el riesgo de una inserción no deseada en el genoma del paciente de fragmentos de ADN administrados, lo que podría ocasionar la pérdida de la función de los genes alterados. Como riesgo adicional, surge la generación no deseada de anticuerpos anti-ADN. Otro inconveniente es el nivel de expresión limitado del péptido o proteína codificados que puede conseguirse mediante la administración de ADN y su posterior transcripción/traducción. Entre otros factores, la presencia de factores de transcripción específicos que regulan la transcripción del ADN tiene gran impacto en el nivel de expresión del ADN administrado. En ausencia de tales factores, la transcripción de ADN no producirá cantidades satisfactorias de ARN. Como resultado, el nivel de péptido o proteína traducidos obtenido es limitado.

- 50 Mediante el uso de ARN en lugar de ADN para la terapia génica o la vacunación genética, el riesgo de integración genómica no deseada y la generación de anticuerpos anti-ADN se minimiza o puede evitarse por completo. Sin embargo, el ARN se considera una especie molecular bastante inestable. Por un lado, en el espacio extracelular el ARN está sujeto a la degradación por ARNasas casi ubicuas. Por otro lado, la vida media del ARNm *in vivo* en el citoplasma está limitada por la tasa de desintegración del ARNm enzimático, que

depende, al menos en parte, de los elementos que actúan en cis en la molécula de ARNm. Así, la degradación controlada del ARNm contribuye a la regulación fina de la expresión génica eucariótica (Friedel y col., Conserved principles of mammalian transcriptional regulation revealed by RNA half-life, *Nucleic Acid Research*, 2009, 1-12). En consecuencia, cada ARNm de origen natural tiene su vida media individual dependiendo del gen del cual se deriva el ARNm.

Durante muchos años se ha venido aceptado generalmente que el ARNm es demasiado inestable para su uso eficiente con fines de terapia génica. Sin embargo, en la última década, diversos grupos de investigación enfrentaron este desafío y no sólo demostraron la viabilidad de la transfección mediada por ARNm, con resultados sorprendentes en relación a la eficacia de transfección y la duración de la expresión de la proteína, sino también pudieron demostrar ventajas importantes sobre el uso de ADNp. Una de estas ventajas es la circunstancia de que el ARNm no necesita cruzar la barrera nuclear para que sus proteínas codificadas sean expresadas (revisado por Tavernier y col., *J Control Release*. 2011 Mar 30; 150(3): 238-47. PMID: 20970469).

Para la terapia génica y la vacunación genética, el ARN modificado y por tanto estabilizado suele ser más adecuado que el ARN no modificado, que generalmente se degrada rápidamente. Por una parte, es deseable acumular *in vivo* el producto codificado por la secuencia de ARN. Por otra parte, el ARN debe mantener su integridad estructural y funcional cuando se prepara para una forma de dosificación adecuada, durante su almacenamiento y cuando se administra. Por tanto, se han realizado considerables esfuerzos para proporcionar moléculas de ARN estables para la terapia génica o la vacunación genética con el fin de evitar una degradación o descomposición temprana. Por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP 2083851 se describen ARN codificantes de proteínas base modificadas.

Después de la introducción en la célula, la vida media del ARNm (no estabilizado) es limitada. Como resultado, la producción de proteína codificada por este ARNm dura como mucho unos pocos días. Obviamente este hecho limita la aplicabilidad de la terapia génica basada en ARNm (no estabilizado). Por ejemplo, no puede emplearse para corregir enfermedades hereditarias, dado que esto requeriría administraciones repetitivas (revisado en Tavernier y col., *J Control Release*. 30 de marzo de 2011; 150 (3): 238-47. PMID: 20970469).

Como se ha mencionado anteriormente, generalmente el ARNm se considera una molécula bastante inestable en comparación con el ADN, especialmente una vez que alcanza el citoplasma donde está expuesto a enzimas degradantes. La principal razón de su inestabilidad es la presencia de un grupo hidroxilo en el segundo átomo de carbono del resto azúcar, que, debido a un impedimento estérico, evita que el ARNm adopte una estructura estable de doble hélice β y hace que la molécula sea más propensa a la degradación hidrolítica. Los informes iniciales de administración de ARNm intracelular fueron objeto de escepticismo, principalmente debido a la creencia de que el ARNm es extremadamente lábil y no puede resistir los protocolos de transfección.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las ventajas del ARN es que basta con suministrar el ARN al citoplasma de una célula para que se produzca su expresión (en contraste con el ADN, que tiene que cruzar la envoltura nuclear). Sin embargo, las moléculas de ácido nucleico desnudas no entran en las células de forma eficiente por su gran tamaño y naturaleza hidrofílica debida a grupos fosfato cargados negativamente. Además, son muy sensibles a la degradación mediada por nucleasas. Por tanto, un reto de la terapia génica es desarrollar medios efectivos y seguros de suministro de ARN a una célula. Con respecto al ARNsh, se ha empleado la inyección neumática (Stein y col., *Mol. Ther.* Enero 2008. 16 (1): 178-86).

En general, se han descrito métodos de administración viral y no viral (véase por ejemplo Tavernier y col., *J Control Release*. 30 de marzo de 2011; 150 (3): 238-47. PMID: 20970469). Con respecto a la seguridad y la economía de proceso, normalmente se prefieren métodos no virales. Mientras que algunos de estos métodos se basan en la interrupción física de la función barrera de la membrana celular, otros emplean moléculas portadoras catiónicas para facilitar la transferencia de genes a células diana sin degradación del gen suministrado.

La primera información sobre el mecanismo de captación de ARNm desnudo procede de un primer estudio con ratones donde se investigó la administración intradérmica por inyección. En este contexto, se pudo demostrar que la entrada local en células de la dermis resultó ser saturable, lo que significa que sólo se puede alcanzar un nivel de proteína definido mediante la inyección intradérmica del ARNm. Un trabajo más elaborado *in vitro* confirmó la saturabilidad de la absorción y demostró que también depende de la temperatura y la dosis (revisado en Schlake y col.; *RNA Biology* 9:11, 1-12; noviembre de 2012).

Hasta ahora, la inyección intradérmica es la usada con mayor frecuencia para aplicaciones basadas en ARNm, permitiendo la captación del ARNm por las células de Langerhans y las CD dérmicas, tras lo cual se asume el transporte a los ganglios linfáticos drenantes (revisado en Van Lint y col.; *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9: 2, 248-257; febrero de 2013). Otras vías de administración que se han utilizado para administrar ARN comprenden la inyección intramuscular, la inyección intranodal (inyección en un ganglio linfático) y la inyección intratumoral.

Es evidente, no solo a partir de experimentos que emplean ARN como vacuna, que la expresión de proteínas mediada por la introducción de ARNm heterólogo *in vivo* es generalmente posible y suficiente para elevar una respuesta inmune detectable. Sin embargo, elevar una respuesta inmune efectiva y, aún más, lograr un efecto terapéutico mediante el suministro de proteínas mediadas por ARNm puede ser más exigente en términos del nivel de expresión de proteínas requerido.

Así, la transferencia eficiente de ARN a las células de un sujeto todavía representa un cuello de botella en la expresión eficiente de proteínas introducidas en las células mediante un ARN heterólogo. La eficacia terapéutica de los medicamentos basados en ARN, particularmente en el campo de la terapia génica, depende en gran medida de la expresión eficiente de los productos genéticos codificados en la molécula de ARN terapéutica.

Por tanto, un objeto de la invención es mejorar la expresión de la información genética contenida en una molécula de ARN. Más específicamente, el objeto de la invención es mejorar la expresión de una proteína codificada en una molécula de ARN, que se emplea para la terapia génica o la vacunación genética y que se administra a un sujeto.

El objeto que subyace en la presente invención se resuelve por el contenido de las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) y que comprende al menos una modificación ("ARN modificado") que aumenta la expresión de la proteína codificada, para su uso médico, donde el ARN modificado se administra a un sujeto por inyección neumática. Dicha modificación comprende una modificación del contenido de G/C de la región codificante en comparación con la región codificante de tipo natural respectiva, donde se conserva la secuencia de aminoácidos traducida de dicha región codificante de tipo natural. Específicamente, la invención proporciona un ARN modificado que codifica para al menos un péptido o proteína, cuya expresión aumenta además con la inyección neumática. Además, la invención proporciona una composición farmacéutica y un kit de partes que comprenden dicho ARN modificado para la administración por inyección neumática, preferiblemente para su uso en el campo de la terapia génica y/o la vacunación genética.

En resumen, el objeto de la presente invención se resuelve proporcionando un ARN modificado en el que la expresión de la proteína codificada en un tejido diana o en una célula diana se incrementa adicionalmente mediante inyección neumática.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: Expresión de luciferasa en cobayas. Se inyectaron cobayas con 20 µg de ARNm modificado que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc (GC) - muag - A64 - C30 - histonaSL) mediante inyección neumática o inyección con aguja intradérmica convencional. 24 h después de la inyección, se prepararon muestras de piel y se midió la expresión de la luciferasa.
- Figura 2: Expresión de luciferasa en cobayas. Se inyectaron cobayas con diferentes dosis (10, 40 y 80 µg) de ARNm modificado que codifica la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc (GC) - muag - A64 - C30 - histonaSL) mediante inyección neumática o inyección con aguja convencional intradérmica. 24 h después de la inyección, se prepararon muestras de piel y se midió la expresión de la luciferasa.
- Figura 3: Comparación de ARNm no modificado y modificado. Las cobayas se inyectaron con diferentes dosis (5 y 80 µg) de ARNm no modificado (PpLuc (wt) - A30) y ARNm modificado (PpLuc (GC) - muag - A64 - C30 - histonaSL) que codifican para la luciferasa de *Photinus pyralis* por inyección neumática o inyección con aguja intradérmica convencional. 24 h después de la inyección, se prepararon muestras de piel y se midió la expresión de la luciferasa.
- Figura 4: Secuencia de ARNm R1265: PpLuc(GC) - muag - A64 - C30 - histonaSL (SEQ ID NO: 46).
- Figura 5: Secuencia de ARNm R2652: PpLuc(wt) - A30 (SEQ ID NO: 47).
- Figura 6: Secuencia de ARNm R3454: PpLuc(wt) - A64 (SEQ ID NO: 48).
- Figura 7: Secuencia de ARNm R2462: PpLuc(GC)-A64-C30-HistonaSL (SEQ ID NO: 49).
- Figura 8: Secuencia de ARNm R1256: PpLuc(GC)-muag-A64-C30 (SEQ ID NO: 50).
- Figura 9: Secuencia de ARNm R2393: PpLuc(nat)-muag-A64-C30-HistonaSL (SEQ ID NO: 51).
- Figura 10: Secuencia de ARNm R2403: RAV-G(GC)-muag-A64-C30-histonaSL (SEQ ID NO: 52).
- Figura 11: Secuencia de ARNm R3513: EPO(wt)-A30 (SEQ ID NO: 53).
- Figura 12: Secuencia de ARNm R3135: HSD17B4-EPO(GC)-albumina7-A64-C30-histonaSL (SEQ ID NO: 54).
- Figura 13: Comparación de ARNm no modificado y modificado que codifica para Eritropoyetina (EPO). Las cobayas se inyectaron con ARNm no modificado (R3513: EPO(wt) -A30) o ARNm modificado (HSD17B4-EPO (GC)-albumin7-A64C30-histonaSL) que codifica Eritropoyetina (EPO) por inyección neumática o inyección con aguja intradérmica convencional. Cada animal

se inyectó en 3 sitios con 80 µg de ARN por sitio de inyección. 24 h después de la inyección, se tomaron muestras de sangre y se midió la expresión de EPO como se describe en el Ejemplo 5.

- 5
 10
 15
 20
 25
 30
- Figura 14: Secuencia de ARNm optimizada en G/C R2510 (SEQ ID NO: 64) que codifica para la proteína RSV-F de la cepa larga RSV (RSV-F larga) como está incluida en la vacuna de ARNm RSV-F.
- Figura 15: Comparación de la inyección con jeringa de aguja convencional e inyección neumática de una vacuna de ARNm de RSV (título de anticuerpos). Cobayas hembra (n = 8/grupo) se inyectaron vía intradérmica (id) con la vacuna de ARNm RSV-F (80 µg de R2510) a 1 x 100 µl con inyección de aguja convencional (id), 4 x 25 µl con inyección de aguja (id) o 1 x 100 µl con inyección neumática (id). Un grupo control (n = 2) se inyectó con una aguja intramuscular (im) con 20 µg de RSV inactivado largo (2 x 50 µl). Todos los animales recibieron inyecciones de refuerzo los días 14 y 28. Se recogieron muestras de sangre el día 3 (tres días antes de la primera vacunación) y los días 7, 21 y 42 para la determinación de los títulos de anticuerpos anti-RSV F. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 4. Fig. 15 A: títulos de punto final de IgG1 determinados por ELISA. Fig. 15 B: títulos de punto final de IgG2a según se determina por ELISA. Como puede verse, la vacuna de ARNm RSV-F ya indujo anticuerpos anti-proteína F de la subclase IgG1 (A) y la subclase IgG2a (B) el día 21 (una semana después de la primera vacunación de refuerzo el día 14) cuando la vacuna se administró por inyección neumática (1 x 100 µl). Sólo se alcanzaron títulos de anticuerpos comparables el día 42 (dos semanas después de la segunda vacunación de refuerzo en el día 28) cuando la vacuna se administró mediante una inyección de aguja convencional (4 x 25 µl).
- Figura 16: Comparación de la inyección con jeringa de aguja convencional y la inyección neumática de una vacuna de ARNm RSV (títulos de neutralización de virus). El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 4. Los títulos de neutralización de virus (VNT) se determinaron mediante un ensayo de reducción en placa los días 3, 21 y 42. Los VNT medianos se representan frente al tiempo. Los VNT se indican como títulos de anticuerpos neutralizantes recíprocos en un punto final de reducción del 60% del control del virus. Como se puede observar, los títulos significativos de neutralización del RSV se midieron el día 42 sólo cuando la vacuna se administró mediante inyección neumática (1 x 100 µl).

35
 40

Por razones de claridad y legibilidad, se proporcionan las siguientes definiciones. Cualquier característica técnica mencionada en estas definiciones se puede leer en todas y cada una de las realizaciones de la invención. Las definiciones y explicaciones adicionales se pueden proporcionar específicamente en el contexto de estas realizaciones. Cuando las secuencias de ácido nucleico se indican en el contexto de la presente invención, estas secuencias en general comprenden tanto la secuencia específica de ARN o ADN como su correspondiente homólogo de ADN o ARN, respectivamente. Por ejemplo, cuando se proporciona una secuencia de ADN, el experto en la materia sabe que la secuencia de ARN correspondiente se obtiene mediante el intercambio de timina por residuos uracilo y viceversa.

45

Terapia Génica: La terapia génica se puede entender típicamente como un tratamiento de elementos corporales o aislados del cuerpo de un paciente, por ejemplo tejidos/células aisladas, con ácidos nucleicos que codifican un péptido o proteína. Típicamente puede comprender al menos una de las etapas de a) administrar un ácido nucleico, preferentemente una molécula de ARN como se define aquí, directamente al paciente – por cualquier vía de administración – o *in vitro* a células/tejidos aislados del paciente, lo cual tiene como resultado la transfección de las células del paciente ya sea *in vivo/ex vivo* o *in vitro*; b) la transcripción y/o traducción de la molécula de ácido nucleico introducida; y opcionalmente c) la re-administración de las células transfectadas aisladas al paciente si el ácido nucleico no se ha administrado directamente al mismo.

50
 55

Vacunación genética: La vacunación genética típicamente se puede entender como la vacunación por administración de una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno o un inmunógeno o fragmentos de los mismos. La molécula de ácido nucleico se puede administrar a un cuerpo del sujeto o a células aisladas de un sujeto. Tras la transfección de ciertas células del cuerpo o tras la transfección de las células aisladas, el antígeno o inmunógeno puede ser expresado por aquellas células y posteriormente ser presentado al sistema inmunitario, provocando una respuesta inmunitaria adaptativa, esto es específica de antígeno. En consecuencia, la vacunación genética típicamente comprende al menos una de las etapas de a) administrar un ácido nucleico, preferiblemente una molécula de ARN como se define aquí, a un sujeto, preferiblemente un paciente, o a células aisladas de un sujeto, preferiblemente de un paciente, que usualmente resulta en la transfección de las células del sujeto ya sea *in vivo* o *in vitro*; b) transcripción y/o traducción de la molécula de ácido nucleico introducida; y opcionalmente c) re-administración de células aisladas transfectadas al sujeto, preferiblemente al paciente, si el ácido nucleico no se ha administrado directamente al paciente.

60

Sistema inmunitario: El sistema inmunitario puede proteger a los organismos de infecciones. Si un patógeno tiene éxito traspasando una barrera física de un organismo y entra en éste, el sistema inmunitario innato proporciona una respuesta inmediata, pero no específica. Si los patógenos evaden esta respuesta innata, los

vertebrados tienen una segunda capa de protección, el sistema inmunitario adaptativo. Aquí, el sistema inmunitario adapta su respuesta durante una infección para mejorar su reconocimiento del patógeno. Esta respuesta mejorada se mantiene así después de que el patógeno se ha eliminado en forma de una memoria inmunológica y permite al sistema inmunitario adaptativo desarrollar ataques más rápidos y fuertes cada vez que se encuentra este patógeno. De acuerdo con esto, el sistema inmunitario comprende el sistema inmunitario innato y el adaptativo. Cada una de estas dos partes típicamente contiene los también denominados componentes humorales y celulares.

Sistema inmunitario adaptativo: El sistema inmunitario adaptativo se dedica esencialmente a eliminar o impedir el crecimiento patogénico. Típicamente regula la respuesta inmunitaria adaptativa dotando al sistema inmunitario vertebrado de la capacidad para reconocer y recordar patógenos específicos (para generar inmunidad) y para desarrollar ataques más fuertes cada vez que se encuentra el patógeno. El sistema es altamente adaptable debido a la hipermutación somática (un proceso de mutaciones somáticas aceleradas) la y recombinación V(D)J (una recombinación genética irreversible de segmentos de gen de receptor de antígeno). Este mecanismo permite a un número pequeño de genes generar un gran número de diferentes receptores de antígeno, que luego se expresan únicamente en cada linfocito individual. Debido a que el reordenamiento del gen lleva a un cambio irreversible del ADN de cada célula, toda de la progenie (descendencia) de tal célula heredará entonces genes que codifican la misma especificidad de receptor, que incluye células B de Memoria y células T de Memoria, claves para la inmunidad específica longeva.

Sistema inmunitario innato: El sistema inmunitario innato, también conocido como sistema inmunitario no específico (o inespecífico), típicamente comprende células y mecanismos que defienden al huésped de la infección por otros organismos de manera no específica. Esto significa que las células del sistema innato pueden reconocer y responder a patógenos de forma genérica, pero, a diferencia del sistema inmunitario adaptativo, no confiere inmunidad de larga duración o de protección al huésped. El sistema inmunitario innato puede ser, por ejemplo, activado por ligandos de receptores tipo Toll (TLRs) u otras sustancias auxiliares, como lipopolisacáridos, TNF-alfa, ligando CD40, o citoquinas, monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimiocinas, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LT-beta, TNF-alfa, factores de crecimiento y hGH, un ligando de receptor tipo Toll humano TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, un ligando de receptor tipo Toll de murino TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13, un ligando de un receptor tipo NOD, un ligando de un receptor tipo RIG-I, un ácido nucleico inmunoestimulador, un ARN inmunoestimulador (isARN), un CpG-ADN, un agente antibacteriano o un agente anti-viral. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más de tales sustancias. Típicamente, una respuesta del sistema inmunitario innato incluye células inmunitarias de reclutamiento a sitios de infección mediante la producción de factores químicos, incluyendo mediadores químicos especializados denominados citoquinas; activación de la cascada del complemento; identificación y eliminación de sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa por glóbulos blancos especializados; activación del sistema inmunitario adaptativo; y/o actuando como barrera física y química a agentes infecciosos.

Respuesta inmunitaria: Una respuesta inmunitaria puede ser típicamente una reacción específica del sistema inmunitario adaptativo a un antígeno particular (llamada así respuesta inmunitaria específica o adaptativa) o una reacción no específica del sistema inmunitario innato (llamada entonces respuesta inmunitaria no específica o innata), o una combinación de las mismas.

Respuesta inmunitaria adaptativa: La respuesta inmunitaria adaptativa se entiende típicamente como una respuesta específica de antígeno del sistema inmunitario. La especificidad de antígeno permite generar respuestas que se adaptan a patógenos específicos o células infectadas por patógenos. Normalmente, la capacidad de desarrollar estas respuestas adaptadas es mantenida en el cuerpo por "células de memoria". Si un patógeno infecta el cuerpo más de una vez, se usan estas células de memoria específicas para eliminarlo rápidamente. En este contexto, la primera etapa de una respuesta inmunitaria adaptativa es la activación de células T específicas de antígeno primitivo o diferentes células inmunitarias capaces de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno por células presentadoras de antígeno. Esto ocurre en los tejidos linfoides y órganos a través de los cuales las células T naive pasan constantemente. Los tres tipos de células que pueden servir como células presentadoras de antígeno son células dendríticas, macrófagos y células B. Cada una de estas células tiene una función distinta provocando respuestas inmunitarias. Las células dendríticas pueden tomar antígenos por fagocitosis y macropinocitosis y pueden volverse a estimular por contacto con, por ejemplo, un antígeno exterior para migrar al tejido linfóide local, donde se diferencian en células dendríticas maduras. Los macrófagos ingieren antígenos de partículas como bacterias y se inducen por agentes infecciosos u otros estímulos apropiados para expresar las moléculas MHC. La capacidad única de las células B de enlazar e interiorizar antígenos de proteína solubles por medio de sus receptores también puede ser importante para inducir las células T. Las moléculas MHC son típicamente responsables de la presentación de un antígeno a

células T. A este respecto, presentar el antígeno en moléculas MHC lleva a la activación de las células T que inducen su proliferación y diferenciación en células T efectoras armadas. La función más importante de las células T efectoras es la eliminación de células infectadas por células T citotóxicas CD8+ y la activación de macrófagos por células Th1 que juntos conforman la inmunidad mediada por célula, y la activación de células B por ambas células Th2 y Th1 para producir diferentes clases de anticuerpo, conduciendo así a la respuesta inmunitaria humoral. Las células T reconocen un antígeno por sus receptores de células T que no reconocen y enlazan el antígeno directamente, pero en su lugar reconocen fragmentos peptídicos cortos, por ejemplo de antígenos de proteína derivados de patógeno, por ejemplo los llamados epítomos, que se enlazan a moléculas MHC en las superficies de otras células.

10 Inmunidad celular/respuesta inmunitaria celular: La inmunidad celular se relaciona típicamente con la activación de macrófagos, células asesinas naturales (NK), linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y la liberación de diversas citoquinas en respuesta a un antígeno. En términos más generales, la inmunidad celular no se basa en anticuerpos, sino en la activación de células del sistema inmunitario. Típicamente, una respuesta inmunitaria celular se puede caracterizar por ejemplo activando linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno que son capaces de inducir la apoptosis celular, por ejemplo en células inmunitarias específicas como células dendríticas u otras células, que detectan epítomos de antígenos extraños en su superficie. Tales células se pueden infectar por virus o con bacterias intracelulares o con células de cáncer que detectan antígenos tumorales. Las características adicionales pueden ser la activación de macrófagos y células asesinas naturales, permitiéndoles destruir patógenos y la estimulación de células para secretar una variedad de citoquinas que influyen en la función de otras células implicadas en respuestas inmunitarias adaptativas e innatas.

25 Inmunógeno: En el contexto de la presente invención, un inmunógeno se puede entender típicamente como un compuesto capaz de estimular una respuesta inmunitaria. Preferentemente, un inmunógeno es un péptido, polipéptido o proteína. En una realización particularmente preferente, un inmunógeno en el sentido de la presente invención es el producto de la traducción de una molécula de ácido nucleico proporcionada, preferentemente una molécula artificial de ácido nucleico como se define aquí. Típicamente un inmunógeno induce al menos una respuesta inmunitaria adaptativa.

30 Antígeno: En el contexto de la presente invención, el "antígeno" se refiere típicamente a una sustancia que puede ser reconocida por el sistema inmunitario, preferiblemente por el sistema inmunitario adaptativo, y es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria específica de antígeno, por ejemplo por la formación de anticuerpos y/o células T específicas de antígeno como parte de una respuesta inmunitaria adaptativa. Típicamente, un antígeno puede ser o puede comprender un péptido o proteína que comprende al menos un epítomo y que se puede presentar por la MHC a células T.

35 Epítomo: Los epítomos (también llamados 'determinantes de antígeno') pueden distinguirse en epítomos de células T y epítomos de células B. Los epítomos de células T o partes de las proteínas en el contexto de la presente invención pueden comprender fragmentos que, preferiblemente, tienen una longitud de alrededor de 6 a alrededor de 20 o aún más aminoácidos, por ejemplo fragmentos tal como se procesan y presentan por moléculas de clase I MHC, preferiblemente con una longitud de alrededor de 8 a alrededor de 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9, o 10, (o aún 11, o 12 aminoácidos), o fragmentos tales como se procesan y presentan por moléculas de clase II MHC, preferiblemente de una longitud de alrededor de 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o aún más aminoácidos, donde estos fragmentos se pueden seleccionar de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son típicamente reconocidos por células T en forma de un complejo que consiste en el fragmento de péptido y una molécula MHC, así, los fragmentos típicamente no son reconocidos en su forma nativa. Los epítomos de células B son típicamente fragmentos ubicados en la superficie externa de proteínas (nativas) o antígenos de péptido como se define aquí, preferiblemente de 5 a 15 aminoácidos, más preferiblemente de 5 a 12 aminoácidos, aún más preferiblemente de 6 a 9 aminoácidos, que pueden ser reconocidos por anticuerpos, esto es en su forma nativa.

45 Tales epítomos de proteínas o péptidos además se pueden seleccionar de cualquiera de las variantes aquí mencionadas de tales proteínas o péptidos. En este contexto, los determinantes antigénicos pueden ser epítomos conformacionales y discontinuos que se componen de segmentos de las proteínas o péptidos tal como se definen aquí que son discontinuos en la secuencia de aminoácidos de las proteínas o péptidos como se definen aquí, pero se reúnen en la estructura tridimensional, o epítomos continuos o lineales que se componen de una única cadena de polipéptidos.

55 Adyuvante/componente adyuvante: Un adyuvante o un componente adyuvante en el sentido más amplio es típicamente un agente farmacológico y/o inmunológico que puede modificar, por ejemplo mejorar, el efecto de otros agentes, tal como un fármaco o vacuna. Esto debe interpretarse en un sentido amplio y se refiere a un espectro amplio de sustancias. Típicamente, estas sustancias son capaces de incrementar la inmunogenicidad de antígenos. Por ejemplo, los adyuvantes se pueden ser reconocidos por los sistemas inmunitarios innatos y,

por ejemplo, pueden provocar una respuesta inmunitaria innata. Los “adyuvantes” típicamente no provocan una respuesta inmunitaria adaptativa. A este respecto, los “adyuvantes” no califican como antígenos. Su modo de acción es distinto de los efectos desencadenados por antígenos que resultan en una respuesta inmunitaria adaptativa.

5 Proteína: Una proteína comprende típicamente uno o más péptidos o polipéptidos. Una proteína típicamente está plegada en una forma tridimensional, que puede ser necesaria para que la proteína ejerza su función biológica.

10 Péptido: Un péptido o polipéptido es típicamente un polímero de monómeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Contiene típicamente menos de 50 unidades monoméricas. No obstante, el término péptido no excluye moléculas que tienen más de 50 unidades monoméricas. Los péptidos largos también se denominan polipéptidos, que tienen típicamente entre 50 y 600 unidades monoméricas.

15 Fragmento o parte de una proteína: Fragmentos o partes de una proteína en el contexto de la presente invención se entienden típicamente como péptidos que corresponden a una parte continua de la secuencia de aminoácidos de una proteína, que preferiblemente tiene una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o incluso más aminoácidos, por ejemplo partes procesadas y presentadas por moléculas MHC de clase I que tienen preferiblemente una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos, por ejemplo 8, 9 o 10, (o incluso 11 o 12 aminoácidos), o fragmentos procesados y presentados por moléculas MHC de clase II preferiblemente con una longitud de aproximadamente 13 o más aminoácidos, por ejemplo 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o incluso más aminoácidos, donde estos fragmentos pueden seleccionarse de cualquier parte de la secuencia de aminoácidos. Estos fragmentos son reconocidos típicamente por las células T en forma de un complejo que consiste en el fragmento peptídico y una molécula de MHC, es decir, los fragmentos típicamente no se reconocen en su forma nativa. Los fragmentos o partes de las proteínas como se definen aquí también pueden comprender epítopos o sitios funcionales de esas proteínas. Preferiblemente, los fragmentos o partes de una proteína en el contexto de la invención son antígenos, particularmente inmunógenos, por ejemplo determinantes de antígeno (también llamados "epítopos"), o tienen características antigénicas, provocando una respuesta inmune adaptativa. Por tanto, los fragmentos de proteínas o péptidos pueden comprender al menos un epítipo de esas proteínas o péptidos. Además, también dominios de una proteína, como el dominio intracelular o el dominio transmembrana, y las versiones acortadas o truncadas de una proteína pueden entenderse que comprenden un fragmento de una proteína.

20 Cantidad farmacéuticamente efectiva: Una cantidad farmacéuticamente efectiva en el contexto de la invención se entiende típicamente como una cantidad que es suficiente para inducir un efecto farmacéutico, tal como una respuesta inmunitaria, que altera un nivel patológico de un péptido o proteína expresado, o sustituye un producto carente de gen, por ejemplo, en el caso de una situación patológica.

35 Identidad de secuencia: Dos o más secuencias son idénticas si tienen la misma longitud y orden de nucleótidos o aminoácidos. El porcentaje de identidad típicamente describe el grado en que dos secuencias son idénticas, esto es típicamente describe el porcentaje de nucleótidos que corresponden en su posición de secuencia con nucleótidos idénticos de una secuencia de referencia. Para determinar el grado de identidad, las secuencias a comparar se consideran de la misma longitud, esto es la longitud de la secuencia más larga de las secuencias a comparar. Esto significa que una primera secuencia que consiste en 8 nucleótidos es un 80% idéntica a una segunda secuencia que consiste en 10 nucleótidos que comprende la primera secuencia. En otras palabras, en el contexto de la presente invención, la identidad de secuencia preferiblemente se refiere al porcentaje de nucleótidos de una secuencia que tiene la misma posición en dos o más secuencias de la misma longitud. Los espacios son usualmente considerados como posiciones no idénticas, independientemente de su posición actual en una alineación.

40 Fragmento de una secuencia: Un fragmento de una secuencia es típicamente una parte más corta de una secuencia de longitud completa de, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos. En consecuencia, un fragmento de una secuencia típicamente consiste en una secuencia que es idéntica al tramo o tramos correspondientes dentro de la secuencia de longitud completa. Un fragmento preferente de una secuencia en el contexto de la presente invención consiste en un tramo continuo de entidades, como nucleótidos o aminoácidos, que corresponden a un tramo continuo de entidades en la molécula de la que se deriva el fragmento, lo que representa al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, incluso más preferiblemente al menos el 60%, aún más preferiblemente al menos el 70%, y con total preferencia al menos el 80% de la molécula total (es decir, de longitud completa) de la que se deriva el fragmento.

55 Secuencia de una molécula de ácido nucleico: La secuencia de una molécula de ácido nucleico se

entiende típicamente como el orden particular e individual, es decir la sucesión, de sus nucleótidos. La secuencia de una proteína o péptido se entiende típicamente como el orden, es decir la sucesión de sus aminoácidos.

5 Molécula de ácido nucleico estabilizada: Una molécula de ácido nucleico estabilizada es una molécula de ácido nucleico, preferentemente una molécula de ADN o ARN, que se modifica de forma que es más estable a la desintegración o degradación, por ejemplo por factores ambientales o digestión enzimática, tal como por degradación con exo o endonucleasas, que la molécula de ácido nucleico sin la modificación. De manera preferente, una molécula de ácido nucleico estabilizado en el contexto de la presente invención se estabiliza en una célula, tal como una célula procariótica o eucariótica, de manera preferente en una célula de mamífero, tal como una célula humana. El efecto de estabilización también se puede ejercer fuera de las células, por ejemplo con una solución tampón, etc., por ejemplo en un proceso de fabricación para una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico estabilizada.

15 Secuencia heteróloga: Típicamente se entiende que dos secuencias son "heterólogas" cuando no se derivan del mismo gen, es decir, aunque las secuencias heterólogas se pueden derivar del mismo organismo, no se presentan naturalmente (en la naturaleza) en la misma molécula de ácido nucleico, tal como en el mismo ARNm.

20 Molécula de ácido nucleico: Una molécula de ácidos nucleico es una molécula que comprende, preferentemente que consiste en, componentes de ácido nucleico. El término molécula de ácido nucleico se refiere preferentemente a moléculas de ADN o ARN. Se utiliza preferentemente como sinónimo del término "polinucleótido". De manera preferente, una molécula de ácido nucleico es un polímero que comprende o que consiste en monómeros de nucleótidos que se unen covalentemente entre sí por enlaces fosfodiéster a un esqueleto azúcar/fosfato.

25 Marco de lectura abierto: Un marco de lectura abierto (ORF) en el contexto de la invención típicamente puede ser una secuencia de diversos tripletes de nucleótidos que se pueden traducir en un péptido o proteína. Un marco de lectura abierto preferiblemente contiene un codón de inicio, esto es una combinación de tres nucleótidos subsiguientes que codifican usualmente para el aminoácido metionina (ATG o AUG), en su extremo 5'- y una región posterior que usualmente tiene una longitud múltiplo de 3 nucleótidos. Un ORF preferiblemente está terminado por un codón de parada (por ejemplo, TAA, TAG, TGA). Típicamente, éste es únicamente codón de parada del marco de lectura abierto. Por tanto, un marco de lectura abierto en el contexto de la presente invención es preferiblemente una secuencia de nucleótidos que consiste en un número de nucleótidos que se pueden dividir entre tres, que inician con un codón de inicio (por ejemplo ATG o AUG) y que preferiblemente terminan con un codón de parada (por ejemplo, TAA, TGA, o TAG o UAA, UAG, UGA, respectivamente). El marco de lectura abierto se puede aislar o se puede incorporar en una secuencia de ácido nucleico más larga, por ejemplo en un vector o un ARNm. Un marco de lectura abierto también se puede denominar "región de codificación de proteína" o "región de codificación". Un marco de lectura abierto también puede denominarse "región codificadora de proteínas".

40 ADN: ADN es la abreviatura usual para ácido desoxirribonucleico. Es una molécula de ácido nucleico, es decir un polímero consistente en nucleótidos. Estos nucleótidos son normalmente monómeros de desoxiadenosin-monofosfato, desoxitimidin-monofosfato, desoxiguanosin-monofosfato y desoxicitidin-monofosfato que son a su vez están compuestos por una porción de azúcar (desoxirribosa), una porción base y una porción fosfato, y se polimerizan en un esqueleto principal característico. El esqueleto de principal está formado típicamente por uniones fosfodiéster entre la porción de azúcar del nucleótido, es decir la desoxirribosa, de una primera porción fosfato de un segundo monómero adyacente. El orden específico de los monómeros, es decir el orden de las bases ligadas a la cadena principal azúcar/fosfato, se denomina secuencia de ADN. El ADN puede ser mono- o bi-catenario. En la forma de doble hebra, los nucleótidos de la primera hebra se hibridan típicamente con los nucleótidos de la segunda hebra, por ejemplo por un apareamiento de bases A/T y G/C.

50 ARN, ARNm: ARN es la abreviatura usual para el ácido ribonucleico. Es una molécula de ácido nucleico, es decir un polímero que consiste en nucleótidos. Estos nucleótidos son usualmente monómeros de adenosina-monofosfato, uridina-monofosfato, guanosina-monofosfato y citidina-monofosfato que se unen entre sí a lo largo de un esqueleto principal. El esqueleto principal está formado por la unión fosfodiéster entre el azúcar, es decir ribosa, de una primera porción de fosfato y de un segundo monómero adyacente. La sucesión específica de monómeros se denomina secuencia de ARN. Usualmente el ARN puede ser obtenible por la transcripción de una secuencia de ADN, por ejemplo dentro de una célula. En las células eucarióticas, la transcripción se lleva a cabo típicamente dentro del núcleo de la mitocondria. *In vivo*, la transcripción del ADN da por resultado normalmente el llamado ARN prematuro, que tiene que ser procesado en el llamado ARN mensajero, usualmente abreviado como ARNm. El procesamiento del ARN prematuro, por ejemplo en organismos

eucarióticos, comprende una variedad de diferentes modificaciones pos-transcripcionales, como empalme, cap 5', poliadenilación, exportación del núcleo o la mitocondria y similares. La suma de estos procesos también se denomina maduración del ARN. El ARN mensajero maduro proporciona usualmente la secuencia de nucleótidos que se puede traducir en una secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína particular.
 5 Típicamente, un ARNm maduro comprende un cap 5', 5'UTR, un marco de lectura abierto, una 3'UTR y una secuencia poli(A). Además del ARN mensajero, existen varios tipos de ARN no codificantes que pueden estar implicados en la regulación de la transcripción y/o traducción. El término "ARN" abarca además otras moléculas de ARN codificadoras, tales como ARN viral, ARN retroviral y ARN replicón.

ARN bicistrónico, ARN multicistrónico: Un ARN bicistrónico o multicistrónico es típicamente un ARN, preferentemente un ARNm, que puede tener típicamente dos (bicistrónico) o más (multicistrónico) marcos de lectura abiertos (ORF). Un marco de lectura abierto en este contexto es una secuencia de codones que es traducible en un péptido o proteína.

Modificado en G/C: Un ácido nucleico modificado en G/C puede ser típicamente un ácido nucleico, preferentemente una molécula de ARN como se define aquí, basada en una secuencia de tipo natural modificada, que comprende un número preferentemente incrementado de nucleótidos guanosina y/o citosina en comparación con la secuencia de tipo natural. Tal número incrementado se puede generar por sustitución de codones que contienen nucleótidos de adenosina o timidina por codones que contienen nucleótidos de guanosina o citosina. Si el contenido de G/C enriquecido aparece en una región de codificación de ADN o ARN, hace uso de la degeneración del código genético. Por consiguiente, las sustituciones del codón preferentemente no alteran los residuos de aminoácidos codificados, sino incrementan exclusivamente el contenido de G/C de la molécula de ácido nucleico.

Cap 5': Cap 5' es una entidad, típicamente una entidad de nucleótidos modificada, que generalmente "cap" el extremo 5' de un ARNm maduro. Un cap 5' se puede formar típicamente por un nucleótido modificado, en particular por un derivado de un nucleótido de guanina. De manera preferente, cap 5' se une al extremo 5' mediante un enlace 5'-5'-trifosfato. Un cap 5' puede estar metilado, por ejemplo m7GpppN, donde N es el nucleótido 5' terminal del ácido nucleico que lleva el cap 5', típicamente el extremo 5' de un ARN. El 5'-cap de origen natural es m7GpppN.

ARN inmunoestimulador: Un ARN inmunoestimulador (isARN) en el contexto de la invención típicamente puede ser un ARN que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria innata. Éste usualmente no tiene un marco de lectura abierto y, por tanto, no proporciona un péptido-antígeno o inmunógeno, pero provoca una respuesta inmunitaria innata, por ejemplo por enlace a una clase específica de receptor tipo Toll (TLR) u otros receptores adecuados. Sin embargo, por supuesto también los ARNm que tienen un marco de lectura abierto y que codifican para un péptido/proteína puede inducir una respuesta inmunitaria innata y, por tanto, pueden ser ARN inmunoestimuladores.

Secuencia Poli(A): Una secuencia poli(A), también llamada cola poli(A) o cola 3'-poli(A), se entiende típicamente como una secuencia de nucleótidos adenina, por ejemplo de hasta 400 nucleótidos de adenina, por ejemplo de aproximadamente 20 a aproximadamente 400, de manera preferente de aproximadamente 50 a aproximadamente 400, de manera más preferente de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, aun de manera más preferente de aproximadamente 50 a aproximadamente 250, de manera mucho más preferente de aproximadamente 60 a aproximadamente 250 nucleótidos de adenina. La secuencia poli(A) se sitúa típicamente en el extremo 3' de un ARNm. En el contexto de la presente invención, una secuencia poli(A) se puede situar dentro de un ARNm o de cualquier otra molécula de ácido nucleico, por ejemplo un vector, por ejemplo un vector que sirve como plantilla para la generación de un ARN, preferentemente un ARNm, por ejemplo por transcripción del vector.

Poliadenilación: La poliadenilación se entiende típicamente como la adición de una secuencia poli(A) a una secuencia de ácido nucleico, tal como una molécula de ARN, por ejemplo un ARNm prematuro. La poliadenilación se puede inducir por una llamada señal de poliadenilación. Esta señal se sitúa preferentemente dentro de un tramo de nucleótidos en el extremo 3' de una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ARN, que se poliadenila. Una señal de poliadenilación comprende típicamente un hexámero que consiste en adenina y nucleótidos uracilo/timina, preferentemente la secuencia de hexámero AAUAAA. Otras secuencias, de manera preferente secuencias de hexámero, también son concebibles. La poliadenilación aparece típicamente durante el procesamiento de un pre-ARNm (también llamado ARNm prematuro). Típicamente, la maduración del ARN (de pre-ARNm a ARNm maduro) comprende la etapa de poliadenilación.

Región 3' no traducida (3'UTR): Una 3'UTR es típicamente la parte de un ARNm entre la región de codificación de la proteína (es decir el marco de lectura abierto) y la secuencia poli(A) del ARNm. Una 3'UTR del ARNm no se traduce en una secuencia de aminoácidos. La secuencia 3'UTR es codificada generalmente

por el gen que se transcribe en el ARNm respectivo durante el proceso de expresión génica. La secuencia genómica primero se transcribe en el ARNm pre-maduro, que comprende intrones opcionales. El ARNm pre-maduro luego se procesa adicionalmente en ARNm maduro en un proceso de maduración. Este proceso de maduración comprende las etapas de cap 5', empalme del ARNm pre-maduro para escindir intrones opcionales y modificaciones del extremo 3', tal como poliadenilación del extremo 3' del ARNm pre-maduro y escisiones de endo o exonucleasa opcionales, etc. En el contexto de la presente invención, una 3'UTR corresponde a la secuencia de un ARNm maduro que se sitúa 3' al codón de parada de la región que codifica la proteína, preferentemente inmediatamente 3' al codón de parada de la región que codifica a la proteína, y que se extiende al lado 5' de la secuencia poli(A), de manera preferente al nucleótido inmediatamente 5' de la secuencia poli(A). El término "corresponde a" significa que la secuencia 3'UTR puede ser una secuencia de ARN, tal como en la secuencia de ARNm, utilizada para definir la secuencia 3'UTR, o una secuencia de ADN que corresponde a tal secuencia de ARN. En el contexto de la presente invención, el término "3'UTR de un gen", tal como "3'UTR de un gen de alfa- o beta-globina", es la secuencia que corresponde a la 3'UTR del ARNm maduro derivado de este gen, es decir el ARNm obtenido por transcripción del gel y la maduración de la ARNm pre-maduro. El término "3'UTR de un gen" abarca la secuencia de ADN y la secuencia de ARN de la 3'UTR.

Región 5' no traducida (5'UTR): Una 5'UTR se entiende típicamente como una sección particular de un ARN mensajero (ARNm). Se sitúa 5' del marco de lectura abierto del ARNm. Típicamente, la 5'UTR comienza con el sitio de inicio de transcripción y termina un nucleótido antes del codón de inicio del marco de lectura abierto. La 5'UTR puede comprender elementos para controlar la expresión génica, también llamados elementos reguladores. Tales elementos reguladores pueden ser, por ejemplo, sitios de unión ribosómicos o un Tracto de Oligopirimidina 5'-terminal. La 5'UTR se puede modificar pos-transcripcionalmente, por ejemplo por la adición de cap 5'. En el contexto de la presente invención, una 5'UTR corresponde a la secuencia de un ARNm maduro que se sitúa entre cap 5' y el codón de inicio. Preferentemente, la 5'UTR corresponde a la secuencia que se extiende de un nucleótido situado 3' a la cap 5', de manera preferente el nucleótido situado inmediatamente 3' a cap 5', a un nucleótido situado 5' al codón de inicio de la región de codificación de proteína, de manera preferente al nucleótido situado inmediatamente 5' al codón de inicio de la región de codificación de proteína. El nucleótido situado inmediatamente 3' a la cap 5' de un ARNm maduro corresponde típicamente al sitio de inicio transcripcional. El término "corresponde a" significa que la secuencia 5'UTR puede ser una secuencia de ARN, tal como en la secuencia ARNm utilizada para definir la secuencia 5'UTR, o una secuencia de ADN que corresponde a tal secuencia de ARN. En el contexto de la presente invención, el término "5'UTR de un gen", tal como "5'UTR de un gen TOP", es la secuencia que corresponde a la 5'UTR del ARNm maduro derivado de este gen, es decir el ARNm obtenido por transcripción del gen y maduración del ARNm pre-maduro. El término "5'UTR de un gen" abarca la secuencia de ADN y la secuencia de ARN de la 5'UTR.

Tracto de Oligopirimidina 5'-Terminal (TOP): El tracto de Oligopirimidina 5'-terminal (TOP) es típicamente un tramo de nucleótidos de pirimidina situados en la región 5'-terminal de una molécula de ácido nucleico, tal como la región 5'-terminal de ciertas moléculas de ARNm o la región 5'-terminal de una entidad funcional, por ejemplo la región transcrita de ciertos genes. La secuencia inicia con una citidina, que usualmente corresponde al sitio de inicio transcripcional y sigue usualmente con un tramo de aproximadamente 3 a 30 nucleótidos de pirimidina. Por ejemplo, el TOP puede comprender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o aún más nucleótidos. El tramo de pirimidina y con ello el 5' TOP termina en un nucleótido 5' al primer nucleótido de purina situado aguas abajo del TOP. El ARN mensajero que contiene un tracto de oligopirimidina 5'-terminal se denomina frecuentemente 5' TOP ARNm. Por consiguiente, los genes que proporcionan tales ARN mensajeros son referidos como genes TOP. Por ejemplo, se han descubierto secuencias TOP en genes y ARNm que codifican factores de alargamiento de péptidos y proteínas ribosómicas.

Motivo TOP: En el contexto de la presente invención, un motivo TOP es una secuencia de ácidos nucleicos que corresponde a un 5'TOP como se define anteriormente. Así, un motivo TOP en el contexto de la presente invención preferentemente es un tramo de nucleótidos de pirimidina con una longitud de 3-30 nucleótidos. De manera preferente, el motivo TOP consiste en al menos 3 nucleótidos de pirimidina, en especial al menos 4 nucleótidos de pirimidina, de manera especialmente preferente al menos 5 nucleótidos de pirimidina y en particular al menos 6 nucleótidos, con particular preferencia al menos 7 nucleótidos, con total preferencia al menos 8 nucleótidos de pirimidina, comenzando el tramo de los nucleótidos de pirimidina preferentemente en su extremo 5' con un nucleótido de citosina. En los genes TOP y los ARNm TOP, el motivo TOP comienza preferentemente en su extremo 5' con el sitio de inicio transcripcional y termina con un nucleótido 5' al primer residuo de purina en el gen del ARNm. Un motivo TOP en el sentido de la presente invención se sitúa preferentemente en el extremo 5' de una secuencia que representa una 5'UTR o en el extremo 5' de una secuencia que codifica una 5'UTR. Así, preferentemente un tramo de 3 o más nucleótidos de pirimidina se denomina "motivo TOP" en el sentido de la presente invención si este tramo se sitúa en el extremo 5' de una secuencia respectiva, tal como la molécula artificial de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, del elemento 5'UTR de la molécula artificial de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o de la secuencia de ácidos nucleicos que se deriva de la 5'UTR de un gen TOP como se describe aquí. En otras

palabras, un tramo de 3 o más nucleótidos de pirimidina que no está en el extremo 5' de una 5'UTR o de un elemento 5'UTR, pero está en cualquier lugar dentro de una 5'UTR o de un elemento 5'UTR preferentemente no es un "motivo TOP".

5 Gen TOP: Los genes TOP se caracterizan típicamente por la presencia de un tracto de oligopirimidina 5'-terminal. Además, la mayoría de genes TOP se caracterizan por una regulación de traducción asociada al crecimiento. Sin embargo, también son conocidos genes TOP con una regulación traduccional específica de tejido. Como se ha definido anteriormente, la 5'UTR de un gen TOP corresponde a la secuencia de una 5'UTR de un ARNm maduro derivado de un gen TOP, que se extiende preferentemente del nucleótido situado en 3' al cap 5' al nucleótido situado 5' al codón de inicio. Una 5'UTR de un gen TOP no comprende típicamente ninguno de los codones de inicio, preferentemente no AUG aguas arriba (uAUG) o no marcos de lectura abiertos aguas arriba (uORF). Aquí, los AUG aguas arriba y los marcos de lectura abiertos aguas arriba se entienden típicamente como AUG y marcos de lectura abiertos presentes en 5' del codón de inicio (AUG) del marco de lectura abierto a ser traducido. Las 5'UTR de los genes TOP son generalmente más cortas. Las longitudes de las 5'UTRs de los genes TOP pueden variar entre 20 nucleótidos hasta 500 nucleótidos y son típicamente inferiores a aproximadamente 200 nucleótidos, preferentemente inferiores a aproximadamente 150 nucleótidos, de manera más preferente inferiores a aproximadamente 100 nucleótidos. 5'UTR ilustrativas de los genes TOP en el sentido de la presente invención son las secuencias de ácidos nucleicos que se extienden del nucleótido en posición 5 al nucleótido situado inmediatamente 5' al codón de inicio (por ejemplo ATG) en las secuencias de acuerdo con las SEQ ID No. 1-1363, 1395, 1421 y SEQ ID No. 14221-1363 de la solicitud de patente PCT/EP2012/002448WO2013/143700 u homólogos o variantes de los mismos. En este contexto, un fragmento particularmente preferido de un 5'UTR de un gen TOP es un 5'UTR de un gen TOP que carece del motivo 5'TOP. El término "5'UTR de un gen TOP" se refiere preferiblemente a la 5'UTR de un gen TOP natural.

25 ARN de referencia no modificado: ARN correspondiente a la secuencia de ARN de tipo salvaje tal como está presente en la naturaleza. Por ejemplo, un ARNm de referencia no modificado corresponde a una secuencia de ARNm que comprende nucleótidos naturales, incluidos nucleótidos que comprenden modificaciones naturales y/o regiones no traducidas naturales, como la estructura 5'-CAP natural m7GpppN, opcionalmente la 5'-UTR natural, si está presente en la secuencia de ARNm de tipo salvaje, el marco de lectura abierto de tipo salvaje, opcionalmente el 3'-UTR natural si está presente en la secuencia de ARNm que se produce naturalmente y una secuencia poli A con aproximadamente 30 adenosinas.

35 Transfección: El término 'transfección' se refiere a la introducción de moléculas de ácido nucleico, tal como moléculas de ADN o ARN (por ejemplo ARNm), en células, preferiblemente en células eucariotas. En el contexto de la presente invención, el término 'transfección' abarca cualquier método conocido por el experto para introducir moléculas de ácido nucleico en las células, preferiblemente en células eucariotas, tal como en células de mamífero. Tales métodos abarcan, por ejemplo, electroporación, lipofección, por ejemplo basado en lípidos catiónicos y/o liposomas, precipitación de fosfato de calcio, transfección basada en nanopartículas, transfección basada en virus o transfección basada en polímeros catiónicos, tal como DEAE-dextrano o polietilimina, etc. De manera preferente, la introducción no es viral.

40 Portador/portador polimérico: Un portador en el contexto de la invención puede ser típicamente un compuesto que facilita el transporte y/o la formación de un complejo con otro compuesto (carga). Un portador polimérico es típicamente un portador que se forma en un polímero. Un portador se puede asociar a su carga por interacción covalente o no covalente. Un portador puede transportar ácidos nucleicos, por ejemplo ARN o ADN, a las células diana. El portador puede - para algunas realizaciones - ser un componente catiónico.

45 Componente catiónico: El término "componente catiónico" se refiere típicamente a una molécula cargada que está cargada positivamente (catión) a un pH típico de 1 a 9, de manera preferente un pH de o inferior a 9 (por ejemplo de 5 a 9), de o por debajo de 8 (por ejemplo de 5 a 8), de o por debajo de 7 (por ejemplo de 5 a 7), de manera preferente a pH fisiológico, por ejemplo de 7,3 a 7,4. Por consiguiente, un componente catiónico puede ser cualquier compuesto o polímero cargado positivamente, de manera preferente un péptido o proteína catiónica cargado positivamente bajo condiciones fisiológicas, en particular bajo condiciones fisiológicas *in vivo*. Un "péptido o proteína catiónica" puede contener al menos un aminoácido cargado positivamente o más de un aminoácido cargado positivamente, por ejemplo seleccionado de Arg, His, Lys u Orn. Así, los componentes "policatiónicos", que tienen más de una carga positiva bajo las condiciones dadas, también están dentro del alcance.

55 Vacuna: Una vacuna se entiende típicamente como un material profiláctico o terapéutico que proporciona al menos un antígeno, preferiblemente un inmunógeno. El antígeno o inmunógeno se puede derivar de cualquier material adecuado para la vacunación. Por ejemplo, el antígeno o inmunógeno se puede derivar de un patógeno, tal como de bacterias o partículas virales, etc., o de un tumor o tejido canceroso. El antígeno o

inmunógeno estimula el sistema inmunitario adaptativo del cuerpo para proporcionar una respuesta inmunitaria adaptativa.

5 Vehículo: Un vehículo se entiende típicamente como un material adecuado para almacenar, transportar y/o administrar un compuesto, tal como un compuesto farmacéuticamente activo. Por ejemplo, puede ser un líquido fisiológicamente aceptable adecuado para almacenar, transportar y/o administrar un compuesto farmacéuticamente activo.

Descripción detallada de la invención

10 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un ácido ribonucleico (ARN) modificado para uso médico como se define en las reivindicaciones, donde el ARN comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica al menos un péptido o proteína, donde el ARN comprende al menos una modificación que aumenta la expresión de la proteína o péptido codificado. Dicha al menos una modificación comprende una modificación del contenido de G/C en su región de codificación en comparación con su región de codificación de tipo salvaje, donde se conserva la secuencia de aminoácidos traducida de la región de codificación de tipo salvaje. La expresión de dicha proteína o péptido codificada se incrementa adicionalmente por la administración del ARN modificado mediante inyección neumática. En este contexto, el aumento en la producción de proteínas debido a al menos una modificación del ARN se denomina aquí "aumento de la expresión de proteínas asociado a la modificación".

20 El aumento de la producción de proteínas debido a la inyección neumática del ARN se denomina aquí "aumento de la expresión de proteínas asociado a la inyección", independientemente de si se usa un ARN modificado o un ARN de referencia no modificado.

25 El término "aumento de la expresión de la proteína asociado a la modificación" se refiere a una situación en la que la cantidad total de proteína que se produce a partir del ARN modificado, medido durante un período de tiempo específico, aumenta en comparación con la cantidad total de proteína producida a partir de un ARN de referencia no modificado que carece de la modificación o en una situación en la que el nivel de proteína que se produce a partir del ARN modificado medido en un punto de tiempo específico aumenta en comparación con el nivel de proteína producido a partir de un ARN de referencia no modificado que carece de la modificación.

30 El término "aumento de la expresión de proteínas asociado a la inyección" se refiere a una situación en la que la cantidad total de proteína que se produce a partir de un ARN administrado mediante inyección neumática medida durante un período de tiempo específico aumenta en comparación con la cantidad total de proteína producida a partir del mismo ARN administrado por inyección con aguja convencional o en una situación en la que el nivel de proteína que se produce a partir de un ARN administrado por inyección neumática medido en un punto de tiempo específico aumenta en comparación con el nivel de proteína producido a partir del mismo ARN administrado con aguja convencional inyección.

35 De acuerdo con la invención, la al menos una modificación del ARN modificado y la administración por inyección neumática tienen un efecto sinérgico en la expresión de la proteína o péptido codificado por el ARN modificado. En otros términos, el aumento de la expresión que se obtiene empleando la inyección neumática para administrar el ARN modificado a un sujeto/tejido en comparación con la expresión que se obtiene empleando la inyección con aguja convencional para administrar un ARN de referencia no modificado a un sujeto/tejido es más mayor que la suma del aumento de expresión obtenido usando el ARN modificado en comparación con un ARN de referencia no modificado, administrándose ambos de la misma manera ("aumento de la expresión de proteína asociado a la modificación") y el aumento de expresión obtenido para un ARN (no modificado) administrado por inyección neumática en comparación con el mismo ARN (sin modificar) administrado por medios distintos a la inyección neumática, en particular por inyección con aguja convencional ("aumento de la expresión de proteínas asociado a la inyección").

45 En este contexto, los inventores sorprendentemente han descubierto que la administración de un ARN modificado, que comprende al menos una modificación que aumenta la expresión proteica de la proteína codificada, mediante inyección neumática incrementa la expresión de la proteína codificada mucho más de lo esperado. Se esperaba que la administración por inyección neumática tuviera el mismo efecto en la expresión de proteínas para un ARN modificado y para un ARN de referencia no modificado.

50 En el contexto de la presente invención, la "expresión de la proteína asociada a la modificación" puede aumentarse en un momento específico después del inicio de la expresión o la producción total de proteínas durante un cierto período de tiempo tras el inicio de la expresión puede aumentar cuando se compara con un ARN de referencia no modificado. Por tanto, el nivel de proteína observado en un cierto momento del tiempo después del inicio de la expresión (o después de la inyección, respectivamente, del ARN modificado), por

ejemplo 6, 12, 24, 48 o 72 horas después de la inyección, o la cantidad total de proteína producida en un lapso de tiempo de por ejemplo 6, 12, 24, 48 o 72 horas, es preferiblemente más alto que el nivel de proteína observado en el mismo momento después del inicio de la expresión (o después de la inyección) o que la cantidad de proteína total producida dentro del mismo período de tiempo para un ARN de referencia no modificado.

Preferiblemente, la modificación del ARN sola (es decir, sin la administración del ARN modificado mediante inyección neumática, pero utilizando, por ejemplo, inyección con aguja convencional) conduce a una expresión de la proteína codificada que es al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, incluso más preferiblemente al menos 10 veces, con total preferencia al menos 50 veces la producción de proteína observada para un ARN de referencia no modificado correspondiente.

La "expresión de la proteína asociada a la inyección" puede incrementarse en un momento específico después del iniciación de la expresión (después de la inyección del ARN) o la producción total de proteínas durante un cierto período de tiempo después del inicio de la expresión puede aumentar cuando se compara con la inyección con aguja convencional del ARN. Por tanto, el nivel de proteína observado en un cierto momento de tiempo después del inicio de la expresión (o después de la inyección, respectivamente, del ARN), por ejemplo 6, 12, 24, 48 o 72 horas después de la inyección, o la cantidad total de proteína producida en un lapso de tiempo de por ejemplo 6, 12, 24, 48 o 72 horas es preferiblemente más alto que el nivel de proteína observado en el mismo momento después del inicio de la expresión (o después de la inyección) o que la cantidad total de proteína producida dentro del mismo período de tiempo para el mismo ARN inyectado por un método convencional, por ejemplo mediante inyección con aguja.

Preferiblemente, la inyección neumática aumenta la producción de proteína a partir de un ARN de referencia no modificado solo en un grado menor, por ejemplo 1,5 veces o 2 veces.

De acuerdo con la invención, la expresión de una proteína codificada por un ARN que comprende al menos una modificación y que comprende al menos un marco de lectura abierto se incrementa adicionalmente (de forma sinérgica) por inyección neumática. Por tanto, la expresión de la proteína aumenta aún más en comparación con una referencia, tal como un ARN que tiene la misma modificación que se administra por inyección con aguja convencional. Preferiblemente, la producción de proteína obtenida por inyección neumática del ARN modificado de acuerdo con la invención se incrementa al menos 5 veces, más preferiblemente 10 veces, incluso más preferiblemente 50 veces e incluso más preferiblemente 100 veces en comparación con un ARN de referencia no modificado que se administra por medios convencionales, en particular por inyección con aguja convencional. Por tanto, el aumento en la producción de proteína obtenida por inyección neumática del ARN modificado de acuerdo con la invención es al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, incluso más preferiblemente al menos 5 veces y con total preferencia al menos 10 veces en comparación con el aumento en la expresión de proteínas obtenida por inyección de un ARN de referencia no modificado. Preferiblemente, esto es así para la producción de proteínas en un momento de tiempo posterior al inicio de la expresión o para la producción total de proteínas en un período de tiempo determinado, por ejemplo en un período de tiempo de 6, 12, 24, 48 o 72 horas después del inicio de la expresión o post inyección del ARN.

El término "inyección neumática" tal como se usa aquí se refiere a un método de inyección sin aguja donde un fluido que contiene al menos un ARN modificado y opcionalmente excipientes adecuados adicionales es forzado a atravesar un orificio, generando así una corriente de líquido ultrafino de alta presión que es capaz de penetrar en la piel de los mamíferos y, dependiendo de la configuración de la inyección, tejido subcutáneo o tejido muscular. En principio, la corriente líquida provoca un agujero en la piel a través del cual la corriente líquida es empujada hacia el tejido diana. Preferiblemente, la inyección neumática se usa para la inyección intradérmica, subcutánea o intramuscular del ARN modificado según la invención.

El tejido diana o, más bien, la capa de tejido a la que se administra el fluido mediante inyección neumática depende de varios parámetros, tales como las características específicas de la corriente de líquido que se emplea, así como de parámetros físicos que definen el tipo particular de piel (y tejido subyacente) al que se administra el fluido. Por ejemplo, la densidad de las fibras de colágeno y la elasticidad general del tejido a tratar pueden influir en la penetración lograda por el chorro de líquido. Varios parámetros físicos influyen en el resultado obtenido por inyección neumática. Las distintas capas de tejido que están separadas por barreras mecánicas (como la fascia superficial) pueden abordarse específicamente seleccionando una corriente líquida adecuada para penetrar con suficiente profundidad en la piel o el tejido subyacente sin penetrar dicha barrera mecánica, que está dispuesta debajo de la capa direccionada. Por ejemplo, la administración intradérmica se logra mediante la aplicación de una corriente líquida que penetra en la dermis sin alterar la fascia superficial. El fluido administrado se distribuye en la dermis horizontalmente.

5 Varios parámetros que definen el chorro de líquido pueden tener un impacto en la eficiencia de la inyección y, en particular, en la profundidad de penetración, que se traduce en apuntar a una determinada capa de tejido, respectivamente. Uno de estos parámetros es la presión con la cual la corriente de líquido golpea la superficie de la piel. Esta presión depende, entre otros factores, de la velocidad de salida del chorro (es decir, la velocidad a la que el chorro abandona la boquilla del aparato de inyección), así como de la distancia entre la boquilla y la piel y el medio (aire, líquido) que constituye el espacio entre la boquilla y la piel. Típicamente, la velocidad del chorro (y la presión ejercida por el chorro) se reduce a medida que el chorro sale de la boquilla y cruza dicho espacio. La penetración de la piel depende además del diámetro del chorro, que está determinado principalmente por las dimensiones de la boquilla que se emplea. En particular, los resultados comparables en términos de penetración de tejido y suministro de fluido pueden obtenerse mediante diferentes combinaciones de parámetros.

Con el fin de penetrar en la piel, la velocidad de salida del chorro de la corriente líquida que comprende el ARN es preferiblemente al menos 60 m/s, más preferiblemente al menos 80 m/s, incluso más preferiblemente al menos 100 m/s y con total preferencia al menos 150 m/s.

15 La corriente líquida que comprende el ARN que se usa en la inyección neumática es típicamente muy fina y se selecciona de manera que la penetración de la piel sea factible. Preferiblemente, el diámetro del chorro de líquido se selecciona según el tejido diana deseado. El diámetro del chorro de líquido se regula preferiblemente por el orificio de la boquilla, es decir, el diámetro del chorro de líquido aumenta al aumentar el diámetro del orificio de la boquilla. Preferiblemente, el diámetro del chorro de líquido corresponde al diámetro del orificio, de modo que el diámetro del chorro de líquido es igual o ligeramente mayor que el diámetro del orificio de la boquilla. Típicamente, a una velocidad de salida del chorro constante, la profundidad de penetración alcanzada en el tejido será mayor para diámetros de chorro mayores.

En una realización de la invención, el diámetro del orificio está entre 20 μm y 600 μm , preferiblemente entre 100 μm y 300 μm , más preferiblemente entre 120 μm y 250 μm .

25 En una realización preferida adicional, el diámetro del orificio está entre 20 μm y 150 μm , preferiblemente entre 30 μm y 130 μm , más preferiblemente entre 40 μm y 110 μm , incluso más preferiblemente entre 50 μm y 100 μm .

En otra realización, el diámetro del orificio está entre 70 μm y 300 μm , preferiblemente entre 80 μm y 200 μm , más preferiblemente entre 90 μm y 180 μm , incluso más preferiblemente entre 100 μm y 150 μm .

30 Preferiblemente, el tiempo de inyección (es decir, el tiempo entre el primer contacto del chorro con la piel diana y el momento del cese del chorro) es inferior a 1,0 segundos, más preferiblemente inferior a 0,7 segundos e incluso más preferiblemente inferior a 0,3 segundos. Más preferiblemente, el tiempo de inyección es inferior a 0,1 segundos.

35 En una realización preferente, el proceso de inyección neumática comprende al menos dos fases caracterizadas por diferentes velocidades de chorro. Preferiblemente, la inyección neumática comienza con una primera fase donde se selecciona una primera velocidad de chorro para garantizar la penetración en el tejido. Dicha velocidad del primer chorro depende en gran medida de la velocidad del chorro de salida, es decir, la velocidad a la que el chorro de líquido sale de la boquilla del dispositivo. Dicha primera velocidad se adapta además a la profundidad de inyección deseada. Posteriormente, se emplea una segunda velocidad de chorro en una segunda fase, apropiada para suministrar el fluido al tejido diana. Dicha segunda velocidad de chorro es típicamente más baja que la primera velocidad y se elige para no exceder la capacidad de absorción del tejido.

En una realización preferida, la inyección neumática del ARN modificado de acuerdo con la invención comprende tres fases:

45 La fase de penetración inicial se caracteriza por la presión más alta con respecto al perfil de presión de todo el proceso de inyección neumática (por lo que también se denomina fase de presión máxima). La fase de penetración dura preferiblemente menos de 50 ms, más preferiblemente menos de 10 ms, incluso más preferiblemente menos de 5 ms. Más preferiblemente, la fase de penetración dura menos de 1 ms.

50 Después de la fase de presión máxima, la presión se reduce en la fase de administración, mientras se mantiene un nivel suficiente para inyectar la corriente de líquido en el tejido diana. Es preferible que el nivel de presión sea constante o que disminuya solo lentamente durante la fase de suministro. Preferiblemente, la fase de administración dura menos de 0,8 segundos, más preferiblemente menos de 0,5 segundos, incluso más preferiblemente la fase de administración dura de 0,01 a 0,3 segundos, con total preferencia de 0,01 a 0,1

segundos.

5 La etapa final del proceso de inyección neumática de acuerdo con esta realización de la invención se caracteriza por una caída de la presión que actúa sobre el líquido que comprende el ARN modificado hasta niveles alrededor del nivel de presión atmosférica (fase de caída). Típicamente, la presión cae bruscamente después de la fase de suministro. La fase de caída dura preferiblemente menos de 0,3 segundos, más preferiblemente menos de 0,2 segundos, incluso más preferiblemente menos de 50 milisegundos, con total preferencia menos de 10 milisegundos.

10 Dependiendo del sujeto a tratar, del tejido diana y de la aplicación específica se selecciona en consecuencia el volumen del líquido que comprende el ARN modificado. En una realización preferente de la invención, el volumen de líquido administrado está entre 0,05 μl y 1.000 μl , preferiblemente entre 0,1 μl y 500 μl , más preferiblemente entre 0,2 μl y 200 μl . Con total preferencia, el volumen del líquido que comprende el ARN modificado es de 100 μl .

15 En este contexto, el volumen de líquido que comprende el ARN modificado está preferiblemente entre 0,2 y 200 μl , y con total preferencia es 100 μl si el ARN modificado se inyecta vía intradérmica por inyección neumática.

Además, el volumen de líquido que comprende el ARN modificado está preferiblemente entre 100 y 2.000 μl y con total preferencia es 500 μl si el ARN modificado se inyecta vía intramuscular por inyección neumática.

20 Si el líquido que comprende el ARN modificado se inyecta vía subcutánea mediante inyección neumática, el volumen de líquido comprendiendo que el ARN modificado está preferiblemente entre 100 y 2.000 μl y con total preferencia es 500 μl .

25 En el sentido de la presente invención, puede emplearse cualquier dispositivo para la inyección neumática, siempre que sea capaz de generar un chorro de líquido que sea adecuado para el suministro tal como se define aquí. No hay limitación en cuanto a los medios por los cuales se acelera el líquido. Por ejemplo, pueden emplearse sistemas que usan resortes para expulsar el líquido, así como sistemas que usan gas u otros propulsores. Además, se puede usar un chorro de líquido constante, preferiblemente con al menos dos velocidades distintas en al menos dos fases tal como se describe aquí. Alternativamente, se puede usar un micro chorro pulsado. Preferiblemente, se utilizan sistemas de inyección a presión que están disponibles comercialmente, como Stratis, Tropis (ambos de Pharmajet), Vitajet, Biojector 2000 o Bioject Zetajet (los tres de Bioject Medical Technologies Inc.), Glide (de Glide Pharma), Medijector Vision (de Antares), Sumavel DosePro (de Zogenix), SQ Pen (de Bepak) e Injex (de Equidyne). El ARN modificado se inyecta utilizando un sistema que preferiblemente permite un suministro preciso y reproducible de una dosis preseleccionada. Preferiblemente, el dispositivo asegura una tensión adecuada de la piel para que el chorro de líquido se inyecte en la piel. En una realización preferente, un dispositivo como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2013/090315, cuya descripción se incluye aquí en su totalidad. Preferiblemente, el ARN modificado se inyecta utilizando un dispositivo que comprende al menos uno de los componentes individuales del dispositivo de inyección sin aguja como se muestra en cualquiera de las Figuras 1 a 17C del documento WO 2013/090315, preferiblemente un componente seleccionado del grupo consistente en un resorte principal compresible, un botón de accionamiento, un resorte para tensar la piel, un cuerpo de émbolo, un sello y un martillo. Más preferiblemente, el ARN modificado se inyecta usando un dispositivo como se describe en cualquiera de las Figuras 1 a 10 del documento WO 2013/090315, donde el resorte principal puede moverse lateralmente lejos de un extremo de jeringa del dispositivo de inyección cuando se aplica presión a la boquilla de la jeringa sin aguja antes de la inyección. En una realización particularmente preferente, el ARN modificado se inyecta utilizando un dispositivo Tropis (Pharmajet).

45 Según la invención, un ARN que comprende al menos una modificación y que comprende al menos un marco de lectura abierto se administra por inyección de neumática vía intradérmica, intramuscular o subcutánea. En una realización preferente adicional, el ARN modificado se administra vía intradérmica, realizándose la inyección neumática utilizando una boquilla con un diámetro entre 20 μm y 150 μm , preferiblemente entre 30 μm y 130 μm , más preferiblemente entre 40 μm y 110 μm , incluso más preferiblemente entre 50 μm y 100 μm y la velocidad de salida del chorro es preferiblemente al menos 80 m/s, más preferiblemente al menos 100 m/s, incluso más preferiblemente al menos 150 m/s y con total preferencia al menos 190 m/s.

50 En una realización preferente, el ARN modificado se administra vía intradérmica utilizando el dispositivo TROPIS (Pharmajet).

Típicamente, la administración exitosa de un líquido a la dermis de un mamífero puede evaluarse por la formación de una roncha (también denominada ampolla) en el sitio de inyección. Preferiblemente, el diámetro

total es de al menos 5 mm, más preferiblemente de al menos 7 mm, incluso más preferiblemente de al menos 9 y con total preferencia de al menos 10 mm.

5 En el significado de la presente invención, el término "ARN modificado" comprende cualquier tipo de molécula de ácido ribonucleico que está modificada de manera que la cantidad de proteína o péptido producido a partir de dicho ARN modificado, medida en un momento de tiempo específico o durante un período de tiempo específico, aumenta en comparación con el ARN que carece de la modificación ("ARN de referencia no modificado"). Este aumento en la expresión se denomina aquí "aumento de la expresión de proteínas asociado a la modificación" tal como se definió anteriormente.

10 Según la invención, se proporciona una molécula de ARN modificada para uso médico como se define en las reivindicaciones, que se caracteriza por el aumento de la expresión de la proteína codificada en comparación con un ARN respectivo que carece de la modificación ("ARN de referencia no modificado"). Dicho ARN "modificado" se caracteriza por al menos una modificación del contenido de G/C en su región de codificación en comparación con la respectiva región de codificación de tipo salvaje, donde se conserva la secuencia de aminoácidos traducida de dicha región de codificación de tipo salvaje. Con el fin de evaluar la producción de proteínas *in vivo* por un ARN modificado, la expresión de la proteína codificada se determina después de la inyección del ARN modificado en las células/tejidos diana y se compara con la expresión de proteínas del ARN de referencia no modificado. Métodos cuantitativos para determinar la expresión de proteínas son conocidos en la técnica (por ejemplo Western-Blot, ELISA, espectrometría de masas). Particularmente útil en este contexto es la determinación de la expresión de proteínas reporteras, como luciferasa o fosfatasa alcalina secretada (SEAP). Por tanto, el ARN modificado o el ARN de referencia no modificado se inyectan en el tejido diana, por ejemplo mediante inyección con aguja convencional o inyección neumática, preferiblemente vía intradérmica, intramuscular o subcutánea. Varias horas o varios días (por ejemplo 6, 12, 24, 48 o 72 horas) después del inicio de la expresión o después de la inyección del ARN, el tejido del sitio de inyección se recoge y se lisa. A continuación, se pueden emplear los lisados para detectar y cuantificar la proteína expresada (y así determinar la eficiencia de la expresión de la proteína) utilizando varios métodos, por ejemplo Western-Blot, ELISA, espectrometría de masas o por medición de la fluorescencia o la luminiscencia.

30 Por tanto, cuando la expresión de la proteína de un ARN modificado se compara con la expresión de la proteína de un ARN de referencia no modificado en un momento específico (por ejemplo 6, 12, 24, 48 o 72 horas después del inicio de la expresión o después de la inyección del ARN), ambos ARN se inyectan por separado en animales de ensayo, se recoge el tejido de los sitios de inyección después de un momento específico, los lisados de proteínas se preparan de acuerdo con el protocolo particular ajustado al método de detección específico (por ejemplo Western Blot, ELISA, etc. como se conoce en la técnica) y la proteína se detecta mediante el método de detección elegido y se cuantifica.

35 Si se va a medir la cantidad total de proteína durante un período de tiempo específico, el tejido se puede recoger después de momentos después de la inyección del ARN (por ejemplo 6, 12, 24, 48 y 72 horas después del inicio de la expresión o después de la inyección del ARN; normalmente de diferentes animales de ensayo), y la cantidad de proteína por tiempo se puede determinar tal como se explicó anteriormente. Para calcular la cantidad de proteína acumulada se puede utilizar un método matemático para determinar la cantidad total de proteína, por ejemplo el área bajo la curva (AUC) se puede determinar de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$40 \quad AUC = \int_a^b f(x) d(x)$$

Con el fin de calcular el área bajo la curva para la cantidad total de proteína, se calcula la integral de la ecuación de la curva de expresión de cada punto final (a y b).

45 Según la invención, una molécula de ARN se modifica estructuralmente para potenciar la expresión de la proteína codificada ("aumento asociado a la modificación de la expresión de la proteína"). Así, dicha molécula de ARN está al menos modificada con respecto a su contenido de G/C en su región de codificación en comparación con la región de codificación de tipo salvaje respectiva, donde se conserva la secuencia de aminoácidos traducida de dicha región de codificación de tipo salvaje. Las modificaciones adicionales no están limitadas a ninguna estructura particular, siempre que la expresión de la proteína codificada se incremente en comparación con un ARN de referencia no modificado como se define aquí. En la técnica se conocen diversas modificaciones de ARN que pueden aplicarse a un ARN dado en el contexto de la presente invención.

Modificaciones químicas:

El ARN modificado puede comprender además modificaciones químicas que comprenden modificaciones de esqueleto, así como modificaciones de azúcar o modificaciones de bases.

En este contexto, la molécula de ARN modificada como se define aquí puede contener análogos/modificaciones de nucleótidos, por ejemplo modificaciones de esqueleto, modificaciones de azúcar o modificaciones de bases.

5 Una modificación de esqueleto en relación con la presente invención es una modificación donde los fosfatos del esqueleto de los nucleótidos contenidos en una molécula de ácido nucleico como se define aquí se modifican químicamente. Una modificación de azúcar en relación con la presente invención es una modificación química del azúcar de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico como se define aquí. Además, una modificación de bases en relación con la presente invención es una modificación química de los residuos bases

10 de los nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico. En este contexto, los análogos o modificaciones de nucleótidos se seleccionan preferiblemente de análogos de nucleótidos que son aplicables para la transcripción y/o la traducción.

Modificaciones de azúcar:

15 Los nucleósidos y nucleótidos modificados, que pueden incorporarse en el ARN modificado tal como se describe aquí, pueden modificarse en el resto azúcar. Por ejemplo, el grupo 2'-hidroxilo (OH) puede modificarse o reemplazarse con varios sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes. Ejemplos de modificaciones del grupo 2'-hidroxilo "oxi" incluyen, pero no se limitan a, alcoxi o ariloxi (-OR, por ejemplo R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}$; ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) donde el 2'-hidroxilo está unido por ejemplo por un puente metileno al carbono 4' del mismo

20 azúcar ribosa; y grupos amino (-O-amino, donde el grupo amino, por ejemplo NRR, puede ser alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino) o aminoalcoxi.

Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno, amino (por ejemplo NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); o el grupo amino se

25 puede unir al azúcar a través de un enlazador, comprendiendo el enlazador uno o más de los átomos C, N y O.

El grupo azúcar también puede contener uno o más carbonos con la configuración estereoquímica opuesta a la del correspondiente carbono de la ribosa. Por tanto, un ARN modificado puede incluir nucleótidos que contienen, por ejemplo, arabinosa como el azúcar.

30 Modificaciones de esqueleto:

El esqueleto fosfato puede modificarse adicionalmente en los nucleósidos y nucleótidos modificados que pueden incorporarse en el ARN modificado como se describe aquí. Los grupos fosfato del esqueleto pueden modificarse reemplazando uno o más de los átomos de oxígeno con un sustituyente diferente. Además, los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir la sustitución completa de un grupo fosfato no modificado

35 con un fosfato modificado como se describe aquí. Ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, fosforotioato, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, hidrogenofosfonatos, fosforamidatos, alquil o aril fosfonatos y fosfotriésteres. En los fosforoditioatos ambos oxígenos no enlazados se han reemplazado por azufre. El enlazador de fosfato también puede modificarse sustituyendo un enlace de oxígeno con nitrógeno (fosforoamidatos puenteados), azufre (fosforotioatos puenteados) y carbono (fosfonatos

40 enlazados con metileno).

Modificaciones de bases:

Los nucleósidos y nucleótidos modificados que pueden incorporarse en el ARN modificado como se describe aquí pueden modificarse adicionalmente en los residuos nucleobase. Ejemplos de nucleobases encontrados en el ARN incluyen, entre otros, adenina, guanina, citosina y uracilo. Por ejemplo, los nucleósidos y nucleótidos

45 aquí descritos pueden estar químicamente modificados en la cara de la ranura principal. En algunas realizaciones, las principales modificaciones químicas de la ranura pueden incluir un grupo amino, un grupo tiol, un grupo alquilo o un grupo halo.

En realizaciones particularmente preferentes de la presente invención, los análogos/modificaciones de nucleótidos se seleccionan de modificaciones de bases, que se seleccionan preferentemente de 2-amino-6-cloropurinribósido-5'-trifosfato, 2-aminopurinribósido-5'-trifosfato; 2-aminoadenosin-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxicitidintrifosfato, 2-tiocitidin-5'-trifosfato, 2-tiouridin-5'-trifosfato, 2'-fluorotimidin-5'-trifosfato, 2'-O-metilinosin-5'-trifosfato, 4-tiouridin-5'-trifosfato, 5-aminoallicitidina-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridin-5'-trifosfato, 5-bromocitidin-5'-trifosfato, 5-bromouridin-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato, 5-yodocitidin-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato, 5-yodouridin-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato, 5-metilcitidin-5'-trifosfato, 5-metiluridin-5'-trifosfato, 5-metil-2'-

55 trifosfato, 5-yodo-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato, 5-metiluridin-5'-trifosfato, 5-metil-2'-

5 desoxicitidin-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato, 6-azacitidin-5'-trifosfato, 6-azauridin-5'-trifosfato, 6-cloropurinribósido-5'-trifosfato, 7-deazaadenosin-5'-trifosfato, 7-deazaguanosin-5'-trifosfato, 8-azaadenosin-5'-trifosfato, 8-azidoadenosin-5'-trifosfato, bencimidazol-ribósido-5'-trifosfato, N1-metiladenosin-5'-trifosfato, N1-metilguanosin-5'-trifosfato, N6-metiladenosin-5'-trifosfato-5'-trifosfato, N6-metiladenosin-5'-trifosfato, O6-metilguanosin-5'-trifosfato, pseudouridin-5'-trifosfato o puromicin-5'-trifosfato, xantosin-5'-trifosfato. Se da particular preferencia a los nucleótidos para las modificaciones de bases seleccionados del grupo de nucleótidos modificados bases consistente en 5-metilcitidin-5'-trifosfato, 7-deazaguanosin-5'-trifosfato, 5-bromocitidin-5'-trifosfato y pseudouridin-5'-trifosfato.

10 En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen piridin-4-ona ribonucleósido, 5-aza-uridina, 2-tio-5-azauridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetiluridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propiniluridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometilpseudouridina, 5-taurinometil-2-tiouridina, 1-taurinometil-4-tiouridina, 5-metiluridina, 1-metilpseudouridina, 4-tio-1-metil-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metilpseudouridina, 1-metil-1-deazapseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deazapseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tiouridina, 4-metoxipseudouridina y 4-metoxi-2-tio-pseudouridina.

20 En algunas formas de realización, los nucleósidos modificados incluyen 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metilcitidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroxiacetilcitidina, 1-metilpseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tiocitidina, 2-tio-5-metilcitidina, 4-tiopseudoisocitidina, 4-tio-1-metilpseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-azazebularina, 5-metilzebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tiozebularina, 2-metoxicitidina, 2-metoxi-5-metilcitidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metilpseudoisocitidina.

25 En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deazaadenina, 7-deaza-8-azaadenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxi-isopentenil)adenosina, 2-metil-N6-(cis-hidroxi-isopentenil)-adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metil-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltoadenina y 2-metoxiadenina.

30 En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen inosina, 1-metilinosina, wiosina, wibutosina, 7-deazaguanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tioguanosina, 6-tio-7-deazaguanosina, 6-tio-7-deaza-8-azaguanosina, 7-metilguanosina, 6-tio-7-metilguanosina, 7-metilinosina, 6-metoxiguanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxoguanosina, 7-metil-8-oxoguanosina, 1-metil-6-tioguanosina, N2-metil-6-tioguanosina y N2,N2-dimetil-6-tioguanosina.

35 En algunas realizaciones, el nucleótido puede modificarse en la cara principal de ranura y puede incluir reemplazar el hidrógeno en C-5 del uracilo con un grupo metilo o halo.

En realizaciones específicas, un nucleósido modificado es 5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)citidina, 5'-O-(1-tiofosfato)guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)uridina o 5'-O-(1-tiofosfato)pseudouridina.

40 En otras realizaciones específicas, el ARN modificado puede comprender modificaciones de nucleósidos seleccionadas de 6-azacitidina, 2-tiocitidina, α -tiocitidina, pseudo-isocitidina, 5-aminoaliluridina, 5-yodouridina, N1-metil-pseudouridina, 5,6-dihidrouridina, α -tiouridina, 4-tiouridina, 6-azauridina, 5-hidroxi-uridina, desoxitimidina, 5-metiluridina, pirrolocitidina, inosina, α -tioguanosina, 6-metilguanosina, 5-metilcitidina, 8-oxoguanosina, 7-deazaguanosina, N1-metil-adenosina, 2-amino-6-cloropurina, N6-metil-2-aminopurina, pseudo-isocitidina, 6-cloropurina, N6-metiladenosina, α -tioadenosina, 8-azidoadenosina, 7-deaza-adenosina.

Modificación de lípidos:

45 De acuerdo con una realización adicional, el ARN modificado tal como se define aquí puede contener una modificación de lípidos. Tal ARN modificado con lípidos típicamente comprende un ARN como se define aquí. Esta molécula de ARN modificada con lípidos como se define aquí comprende además típicamente al menos un conector unido covalentemente a esa molécula de ARN y al menos un lípido unido covalentemente con el enlazador respectivo. Alternativamente, la molécula de ARN modificada con lípidos comprende al menos una molécula de ARN como se define aquí y al menos un lípido (bifuncional) unido covalentemente (sin enlazador) a esa molécula de ARN. De acuerdo con una tercera alternativa, la molécula de ARN modificada con lípidos comprende una molécula de ARN como se define aquí, al menos un conector enlazado covalentemente a esa molécula de ARN y al menos un lípido unido covalentemente al enlazador respectivo, y también al menos un lípido (bifuncional) unido covalentemente (sin enlazador) a esa molécula de ARN. En este contexto, se prefiere particularmente que la modificación de lípidos esté presente en los extremos terminales de una secuencia de

ARN lineal.

Modificación del extremo 5' del ARN modificado:

De acuerdo con otra realización preferente de la invención, la molécula de ARN modificado como se define aquí puede estar modificada por adición de la estructura denominada "5'-CAP".

- 5 Un 5'-cap es una entidad, típicamente una entidad nucleotídica modificada, que generalmente "tapa" el extremo 5' de un ARNm maduro. Un 5'-cap puede estar formado típicamente por un nucleótido modificado, en particular un derivado de un nucleótido guanina. Preferiblemente, la 5'-cap está unida al terminal 5' a través de un enlace 5'-5'-trifosfato. La 5'-cap puede estar metilada, por ejemplo m7GpppN, siendo N el nucleótido 5' terminal del ácido nucleico que lleva la cap 5', típicamente el extremo 5' de un ARN. m7GpppN es la estructura 5'-cap que se produce naturalmente en el ARNm transcrito por la polimerasa II y, por tanto, no se considera una modificación comprendida en el ARN modificado según la invención. Esto significa que el ARN modificado de acuerdo con la presente invención puede comprender un m7GpppN como 5'-cap, pero adicionalmente el ARN modificado comprende al menos una modificación adicional como se define aquí.

- 15 Otros ejemplos de estructuras 5'-cap incluyen glicerilo, residuo desoxi no básico inverso (resto), 4',5 metilen nucleótido, 1-(beta-D-eritrofuranosil)nucleótido, 4'-tionucleótido, nucleótido carbocíclico, 1,5-anhidrohexitol nucleótido, nucleótidos L, nucleótido alfa, nucleótido base modificado, treo-pentofuranosil nucleótido, nucleótido acíclico 3',4'-seconucleótido, 3,4-dihidroxibutil nucleótido acíclico, 3,5-dihidroxipil nucleótido acíclico, 3'-3'-residuo nucleótido invertido, 3'-3'-residuo nucleótido invertido no básico, 3'-2'-residuo nucleótido invertido, 3'-2'-residuo invertido no básico, 1,4-butanodiol fosfato, 3'-fosforamidato, hexilfosfato, aminohexilfosfato, 3'-fosfato, 3'-fosforotioato, fosforoditioato, o grupos metilfosfonato con o sin puentes. Estas estructuras 5'-cap modificadas se consideran al menos una modificación comprendida en el ARN modificado de acuerdo con la presente invención.

- 25 Estructuras 5'-cap modificadas particularmente preferentes son CAP1 (metilación de la ribosa del nucleótido adyacente de m7G), CAP2 (metilación de la ribosa del segundo nucleótido aguas abajo del m7G), CAP3 (metilación de la ribosa del 3er nucleótido aguas abajo del m7G), CAP4 (metilación de la ribosa del 4º nucleótido aguas abajo del m7G), ARCA (análogo anti-reverso CAP, ARCA modificado (por ejemplo ARCA modificado con fosfotioato), inosina, N1-metilguanosa, 2'-fluoroguanosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoguanosina, 2-aminoguanosina, LNA-guanosina y 2-azidoguanosina.

Modificación de secuencia del marco de lectura abierto:

- 30 *Modificación del contenido de G/C:*

- El contenido de G / C de la región de codificación, que codifica al menos un péptido o proteína del ARN modificado como se define aquí, se modifica, en particular aumenta, en comparación con el contenido de G/C de su región de codificación particular de tipo salvaje, es decir de la región de codificación no modificada. La secuencia de aminoácidos codificada de la región de codificación preferiblemente no está modificada en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada de la región de codificación de tipo salvaje particular.

- 40 La modificación del contenido de G/C de la región de codificación del ARN modificado tal como se define aquí se basa en el hecho de que la secuencia de cualquier región de ARNm a traducir es importante para la traducción eficiente de ese ARNm. Así, la composición y la secuencia de varios nucleótidos es importante. En particular, las secuencias de ARNm que tienen un mayor contenido de G (guanosa) / C (citosina) son más estables que las secuencias de ARNm que tienen un mayor contenido de A (adenosina) / U (uracilo). De acuerdo con la invención, los codones de la región de codificación varían por tanto en comparación con su región de codificación de tipo salvaje, al tiempo que se conserva la secuencia de aminoácidos traducida, de manera que incluyen una mayor cantidad de nucleótidos G/C. Con respecto al hecho de que varios codones codifican para uno y el mismo aminoácido (la denominada degeneración del código genético), se pueden determinar los codones más favorables para la estabilidad (el llamado uso alternativo de codones).

- 45 Dependiendo del aminoácido a ser codificado por la región de codificación del ARN modificado como se define aquí, existen varias posibilidades de modificar la secuencia de ARN, por ejemplo la región codificante, en comparación con su región de codificación de tipo natural. En el caso de aminoácidos codificados por los codones que contienen exclusivamente nucleótidos G o C, no es necesaria modificación del codón. Así, los codones para Pro (CCC o CCG), Arg (CGC o CGG), Ala (GCC o GCG) y Gly (GGC o GGG) no requieren modificación, puesto que ninguna A o U está presente.

En contraste, los codones que contienen nucleótidos A y/o U se pueden modificar por sustitución de otros codones que codifican los mismos aminoácidos pero no contienen A y/o U. Por ejemplo

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

- 5 En otros casos, aunque los nucleótidos A o U no se pueden eliminar de los codones, es, sin embargo, posible disminuir el contenido de A y U utilizando codones que tienen un contenido menor de nucleótidos A y/o U. Ejemplos de éstos son:

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

- 25 En el caso de los codones para Met (AUG) y Trp (UGG), por otra parte, no existe posibilidad de modificación de secuencia sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada.

- Las sustituciones enumeradas anteriormente se pueden utilizar ya sea individualmente o en todas las combinaciones posibles para incrementar el contenido G/C del ARN modificado como se define aquí, comparada con región de codificación de tipo natural particular (es decir la secuencia original). De esta manera, por ejemplo, todos los codones para Thr que aparecen en la secuencia de tipo natural se pueden modificar a ACC (o ACG).
 30

- De manera preferente, el contenido de G/C de la región codificadora del ARN modificado como se define aquí se incrementa en al menos el 7%, de manera más preferente al menos 15%, particularmente de manera preferente al menos 20%, comparado con el contenido G/C de la región de codificación de tipo natural. De acuerdo con una realización específica, al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, de manera más preferente al menos 70%, de manera aún más preferente al menos 80% y de manera mucho más preferente al menos un 90%, 95% o aún 100% de los codones sustituibles en la región codificante que codifica al menos un péptido o proteína, que comprende un antígeno patogénico o un fragmento, variante o derivado del mismo, se sustituyen, incrementado así el contenido de G/C de dicha región de codificación.
 35

- 40 En este contexto, es particularmente preferible incrementar el contenido de G/C de la región de codificación del ARN modificado como se define aquí al máximo (es decir 100% de los codones sustituibles), comparado con la región codificante de tipo natural.

Optimización de codón

- 45 De acuerdo con la invención, una modificación preferida adicional de la región codificante que codifica al menos un péptido o proteína del ARN modificado como se define aquí se basa en el descubrimiento de que la eficiencia de traducción también está determinada por una frecuencia diferente en la aparición de ARNt en las células. Por tanto, si los llamados "codones raros" están presentes en la región codificante de la secuencia de ARN de tipo salvaje en mayor extensión, el ARNm se traduce en un grado significativamente más pobre que en el caso de codones que modifican para ARNt relativamente más "frecuentes".

- 50 En este contexto, la región codificante abierto del ARN modificado preferentemente puede modificarse en comparación con la región de codificación de tipo natural correspondiente de forma que al menos un codón de la secuencia de tipo natural que codifica para un ARNt que es relativamente raro en las células se cambia por un codón que codifica para un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y lleva el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro. Mediante esta modificación, la región codificante abierto del ARN modificado como se define aquí se modifica de forma que los codones por los cuales los ARNt que se presentan

frecuentemente están disponibles pueden reemplazar los codones que corresponden a ARNt raros. En otras palabras, de acuerdo con la invención, mediante tal modificación todos los codones de la región codificante de tipo natural que codifican para un ARNt que es relativamente raro en la célula pueden en cada intercambiarse por un codón que codifica un ARNt que es relativamente frecuente en la célula y que lleva el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.

Los ARNt que son relativamente frecuentes en la célula y aquellos que, al contrario, son relativamente raros son conocidos por el experto en la materia; véase, por ejemplo, Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666. Son particularmente preferentes los codones que utilizan para el aminoácido particular el ARNt que se produce con mayor frecuencia, por ejemplo el codón Gly, que utiliza el ARNt que se produce con mayor frecuencia en la célula (humana).

De acuerdo con la invención, es particularmente preferente aunar un contenido de G/C secuencial que se incrementa, en particular se maximiza, en la región de codificación del ARN modificado como se define aquí con los codones "frecuentes" sin modificar la secuencia de aminoácidos del péptido o proteína codificada por la región codificante de la secuencia de ARN. Esta realización preferente permite proporcionar una secuencia de ARN traducida y estabilizada (modificada) de manera particularmente eficiente como se define aquí.

Modificación del extremo 3' del ARN modificado:

Además, en el ARN modificado que comprende al menos un marco de lectura abierto a administrar por inyección neumática, la región 3' de la región de codificación puede modificarse, por ejemplo por inserción o adición de tramos de repeticiones múltiples de residuos adenina o citosina. En una realización preferente de la invención, el extremo 3' de una molécula de ARN se modifica por la adición de una serie de nucleótidos adenina ("cola poli (A)").

La longitud de la cola poli(A) tiene un impacto importante en la eficiencia de traducción del constructo respectivo. Para ser traducido de manera eficiente, la cola poli(A) de los ARNm suministrados de forma exógena debe consistir en al menos 20 residuos de aminoácidos. Además, se ha descrito que la expresión del ARNm se correlaciona positivamente con la longitud de la cola poli(A) (revisado en Tavernier y col., J Control Release. 2011 Mar 30; 150 (3): 238-47. PMID: 20970469). En este contexto, Holtkamp y col. demostraron que una cola poli(A) que mide 120 nucleótidos, en comparación con una más corta, mejoraba la estabilidad del ARNm y la eficiencia de traducción (Holtkamp y col., Blood. Diciembre 15; 108 (13): 4009-17. PMID: 16940422). En una realización de la invención, el ARN modificado que se usa para inyección neumática comprende (opcionalmente en combinación con otras modificaciones) una cola poli(A), donde la cola poli(A) comprende al menos 30, preferiblemente más de 50, más preferiblemente más de 100, incluso más preferiblemente más de 200 nucleótidos adenina. Con total preferencia, el ARN comprende una cola poli(A) de 64 nucleótidos adenina.

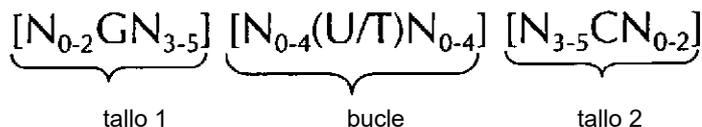
En realizaciones específicas, una cola poli(A) sólo se considera como al menos una modificación comprendida en el ARN modificado de acuerdo con la presente invención si la cola poli(A) es más larga que 30 adenosinas, preferiblemente más de 50 adenosinas, más preferiblemente más larga que 100 adenosinas e incluso más preferiblemente más de 200 adenosinas.

En otras realizaciones específicas, la modificación con una cola poli(A) no se considera como al menos una modificación del ARN modificado de acuerdo con la presente invención. Esto significa que el ARN modificado de acuerdo con la invención puede comprender una cola poli(A) como se definió anteriormente, pero adicionalmente comprende al menos una modificación adicional como se define aquí.

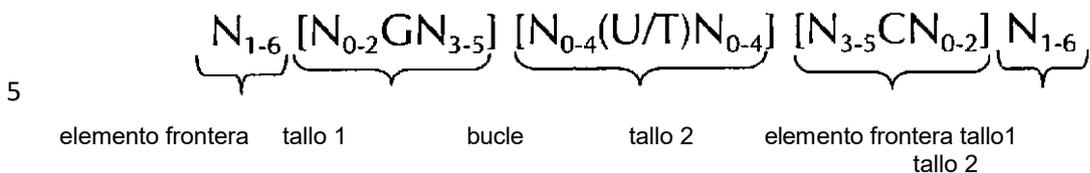
En una realización preferente, el ARN modificado que comprende al menos un marco de lectura abierto y que se usa para la inyección neumática comprende (opcionalmente en combinación con otras modificaciones) una secuencia poli(C) en la región 3' de la región de codificación del ARN. Una secuencia poli(C) es típicamente un tramo de múltiples nucleósidos de citosina, típicamente de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos de citidina, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de citidina, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 nucleósidos de citidina o incluso más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 o incluso aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleósidos de citidina. Una secuencia poli(C) puede estar localizada preferiblemente en 3' de la región codificante comprendida en un ácido nucleico. En una realización preferente específica de la presente invención, la secuencia poli(C) está ubicada 3' de una secuencia poli(A).

En una realización preferente adicional, el ARN modificado de acuerdo con la invención comprende o codifica para un tallo-bucle de histona en su extremo 3' como al menos una modificación. En el contexto de la presente invención, un secuencia de tallo-bucle de histona se selecciona preferiblemente de al menos una de las siguientes fórmulas (I) o (II):

fórmula (I) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (II) (secuencia tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



donde:

10 el elemento frontera de tallo 1 o tallo 2 N_{1-6} es una secuencia consecutiva de 1 a 6, preferentemente de 2 a 6, de manera más preferente de 2 a 5, aún de manera más preferente de 3 a 5, de manera mucho más preferente de 4 a 5 o 5 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo;

15 tallo 1 $[N_{0-2}GN_{3-5}]$ es un complementario inverso o parcialmente inverso al elemento tallo 2 y es una secuencia consecutiva de entre 5 a 7 nucleótidos; siendo N_{0-2} una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo y donde G es guanosina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una citidina o un análogo de la misma, con la condición de que su citidina de nucleótido complementaria en el tallo 2 se reemplace por guanosina;

20

la secuencia bucle $[N_{0-4}(U/T)N_{0-4}]$ se sitúa entre los elementos tallo 1 y tallo 2 y es una secuencia consecutiva de 3 a 5 nucleótidos, de manera más preferente de 4 nucleótidos; donde cada N_{0-4} es independientemente una secuencia consecutiva de 0 a 4, de manera preferente de 1 a 3, de manera más preferente de 1 a 2 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde U/T representa uridina u opcionalmente timidina;

25

tallo 2 $[N_{3-5}CN_{0-2}]$ es complementaria inversa o parcialmente inversa con el elemento tallo 1 y es una secuencia consecutiva entre 5 a 7 nucleótidos; donde N_{3-5} es una secuencia consecutiva de 3 a 5, de manera preferente de 4 a 5, de manera más preferente de 4 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; donde N_{0-2} es una secuencia consecutiva de 0 a 2, de manera preferente de 0 a 1, de manera más preferente de 1 N, donde cada N se selecciona independientemente de un nucleótido seleccionado de A, U, T, G y C o un análogo de nucleótido del mismo; y donde C es citidina o un análogo de la misma, y se puede reemplazar opcionalmente por una guanosina o un análogo de la misma con la condición de que su guanosina de nucleótido complementaria en el tallo 1 se reemplace por citidina;

30

35

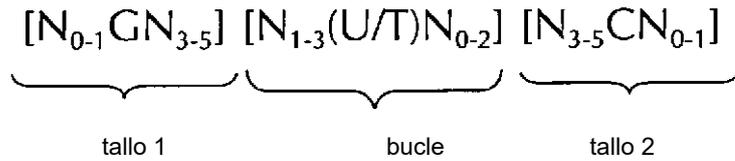
donde

donde tallo y tallo2 son capaces de apareamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria inversa, pudiendo ocurrir el apareamiento de bases entre tallo1 y tallo2, por ejemplo, por apareamiento de bases de Watson-Crick de nucleótidos A y U/T o G y C o por apareamiento de bases no Watson-Crick, por ejemplo apareamiento de bases oscilante, apareamiento de bases Watson-Crick inverso, apareamiento de bases de Hoogsteen, Hoogsteen inverso o son capaces de apareamiento de bases entre sí formando una secuencia complementaria parcialmente inversa, pudiendo ocurrir un apareamiento de bases incompleto entre tallo1 y tallo2 en base a que una o más bases en un tallo no tengan una base complementaria en la secuencia complementaria inversa del otro tallo.

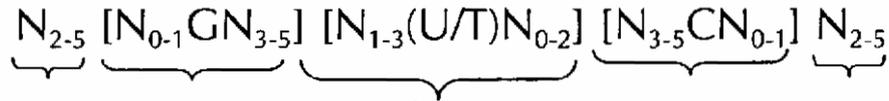
40

45 De acuerdo con una realización preferente adicional, el ARN modificado según la presente invención puede comprender o codificar para al menos una secuencia de tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las siguientes fórmulas específicas (Ia) o (IIa):

fórmula (Ia) (secuencia tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (IIa) (secuencia tallo-bucle con elementos frontera de tallo):

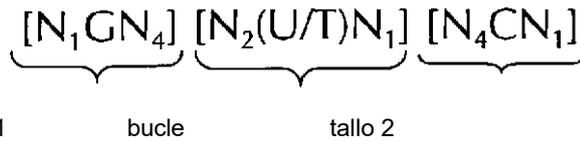


5 elemento frontera tallo 1 bucle tallo 2 elemento frontera tallo 2

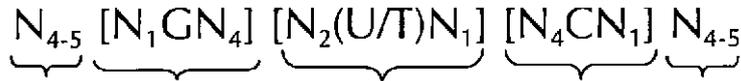
donde N, C, G, T y U son como se definen anteriormente.

De acuerdo con una realización particularmente preferida adicional, el ARN modificado puede comprender o codificar para al menos una secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las siguientes fórmulas específicas (Ib) o (IIb):

fórmula (Ib) (secuencia de tallo-bucle sin elementos frontera de tallo):



fórmula (IIb) (secuencia de tallo-bucle con elementos frontera de tallo):



15 elemento frontera tallo 1 bucle tallo 2 elemento frontera tallo 2

donde N, C, G, T y U son como se definen anteriormente.

De acuerdo con una realización aún más preferida, el ARN modificado según la presente invención puede comprender o codificar al menos una secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las siguientes fórmulas específicas (Ic) a (Ih) o (IIc) a (IIh), mostradas alternativamente en su estructura tallo-bucle y como una secuencia lineal que representa las secuencias de tallo-bucle de histona como se generan de acuerdo con el Ejemplo 1:

25 fórmula (Ic): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoarios y protozoarios sin elementos frontera de tallo):



NGNNNNNNUNNNNNCN
 (secuencia lineal) (SEQ ID NO: 1)

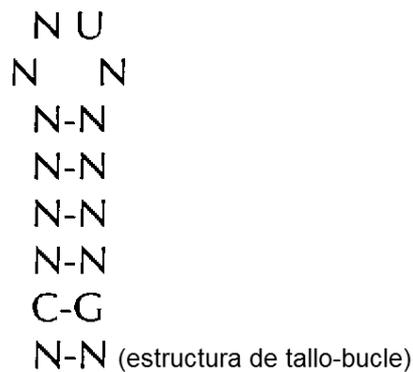
fórmula (Ilc): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoarios y protozoarios con elementos frontera de tallo):



5

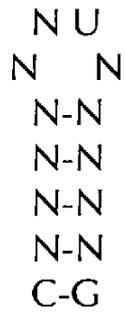
N^*N^*NNNNGNNNNNNUNNNNNNCNNNN^*N^*N^*
 (secuencia lineal) (SEQ ID NO: 2)

fórmula (Id): (sin elementos frontera de tallo)



NCNNNNNNUNNNNNGN
 (secuencia lineal) (SEQ ID NO: 3)

10 fórmula (IId): (con elementos frontera de tallo)



N*N*NNNN-NNNN*N*N* (estructura de tallo-bucle)

N*N*NNNNNCNNNNNNNUNNNNNNGNNNN*N*N*
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 4)

fórmula (Ie): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de protozario sin elementos frontera de tallo)



DGNNNNNNUNNNNNCH
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 5)

5

fórmula (Ile): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de protozario con elementos frontera de tallo)



N*N*NNND-HNNN*N*N* (estructura de tallo-bucle)

N*N*NNNDGNNNNNNUNNNNNCHNNN*N*N*
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 6)

fórmula (If): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoario sin elementos frontera de tallo)

NU
N N
Y-V
Y-N
B-D
N-N
G-C
N-N (estructura de tallo-bucle)

NGNBYYNNUNVNDNCN
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 7)

fórmula (II_f): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de metazoario con elementos frontera de tallo)

NU
N N
Y-V
Y-N
B-D
N-N
G-C

N*N*NNNN-NNNN*N*N* (estructura de tallo-bucle)

N*N*NNNNGNBYYNNUNVNDNCNNNN*N*N*
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 8)

5

fórmula (II_g): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de vertebrado sin elementos frontera de tallo)

NU
D H
Y-A
Y-B
Y-R
H-D
G-C
N-N (estructura de tallo-bucle)

NGHYYYDNUHABRDCN
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 9)

fórmula (II_g): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de vertebrado con elementos frontera de tallo)

N U
D H
Y-A
Y-B
Y-R
H-D
G-C

N*N*HNNN-NNNN*N*H* (estructura de tallo-bucle)

N*N*HNNNGHYYYDNUHABRDCNNNN*N*H*
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 10)

fórmula (Ih): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de ser humano (Homo sapiens) sin elementos frontera de tallo)

Y U
D H
U-A
C-S
Y-R
H-R
G-C
D-C (estructura de tallo-bucle)

5

DGHYCUDYUHASRRCC
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 11)

fórmula (IIh): (secuencia consenso de tallo-bucle de histona de ser humano (Homo sapiens) con elementos frontera de tallo)

Y U
D H
U-A
C-S
Y-R
H-R
G-C

N*H*AAHD-CVHB*N*H* (estructura de tallo-bucle)

N*H*AAHDGHYCUDYUHASRRCCVHB*N*H*
(secuencia lineal) (SEQ ID NO: 12)

10

15 donde en cada una de las fórmulas anteriores (Ic) a (Ih) o (IIc) a (IIh): N, C, G, A, T y U son como se definen anteriormente; cada U se puede reemplazar por T; cada G o C (altamente) conservada en los elementos tallo 1 y 2 se puede reemplazar por su base de nucleótidos complementaria C o G, con la condición de que su nucleótido complementario en el tallo correspondiente se reemplace por su nucleótido complementario en paralelo; y/o G, A, T, U, C, R, Y, M, K, S, W, H, B, V, D, y N son bases de nucleótidos como se definen en la siguiente Tabla:

abreviatura	Bases de Nucleótidos	observaciones
G	G	Guanina

abreviatura	Bases de Nucleótidos	observaciones
A	A	Adenina
T	T	Timina
U	U	Uracilo
C	C	Citosina
R	G o A	Purina
Y	T/U o C	Pirimidina
M	A o C	Amino
K	G o T/U	Ceto
S	G o C	Fuerte (uniones 3H)
W	A o T/U	Débil (uniones 2H)
H	A o C o T/U	No G
B	G o T/U o C	No A
V	G o C o A	No T/U
D	G o A o T/U	No C
N	G o C o T/U o A	Cualquier base
*	Presente o no	La base puede estar o no presente

5 En este contexto se prefiere particularmente que la secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las fórmulas (I) o (Ia) a (Ih) o (II) o (IIa) a (IIh) de la presente invención se seleccione de una secuencia tallo-bucle de histona de origen natural, con especial preferencia de secuencias tallo-bucle de histona de protozoarios o metazoarios y aún de manera particularmente de secuencias tallo-bucle de histona de vertebrados y de manera mucho más preferida de mamífero, especialmente de secuencias tallo-bucle de histona humanas.

10 De acuerdo con una realización particularmente preferida, la secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las fórmulas específicas (I) o (Ia) a (Ih) o (II) o (IIa) a (IIh) de la presente invención es una secuencia tallo-bucle de histona que comprende en cada posición de nucleótidos el nucleótido que se presenta más frecuentemente o cualquiera que sea el más frecuente o el segundo nucleótido que se presenta mucho más frecuentemente en las secuencias tallo-bucle de histona de origen natural en los metazoarios y protozoarios, protozoarios, metazoarios, vertebrados y seres humanos. En este contexto se prefiere particularmente que al menos el 80%, de manera preferente al menos el 85% o de manera mucho más
15 preferente al menos el 90% de todos los nucleótidos correspondan al nucleótido que se presenta más frecuentemente en las secuencias tallo-bucle de histona de origen natural.

En una realización particular adicional, la secuencia tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las fórmulas específicas (I) o (Ia) a (Ih) de la presente invención se selecciona de las siguientes secuencias tallo-bucle de histona (sin elementos frontera de tallo):

- 20 VGYYYHHTHRVRCB (SEQ ID NO: 13 de acuerdo con la fórmula (Ic))
 SGYYTTYTMARRRCS (SEQ ID NO: 14 de acuerdo con la fórmula (Ic))
 SGYYCTTTMAGRRCs (SEQ ID NO: 15 de acuerdo con la fórmula (Ic))
 DGNBNNBNTHTVNNCH (SEQ ID NO: 16 de acuerdo con la fórmula (Ie))
 RGNBNNYHBTDRDNNCY (SEQ ID NO: 17 de acuerdo con la fórmula (Ie))
 25 RGNDBYHYTHRDHNCY (SEQ ID NO: 18 de acuerdo con la fórmula (Ie))
 VGYYYTYHTRVRCB (SEQ ID NO: 19 de acuerdo con la fórmula (If))
 SGYYCTTYTMAGRRCs (SEQ ID NO: 20 de acuerdo con la fórmula (If))
 SGYYCTTTMAGRRCs (SEQ ID NO: 21 de acuerdo con la fórmula (If))
 GGYCTTYTHAGRRC (SEQ ID NO: 22 de acuerdo con la fórmula (Ig))
 30 GGCYCTTYTMAGRCC (SEQ ID NO: 23 de acuerdo con la fórmula (Ig))
 GGCTCTTTMAGRCC (SEQ ID NO: 24 de acuerdo con la fórmula (Ig))
 DGHYCTDYTHASRRCC (SEQ ID NO: 25 de acuerdo con la fórmula (Ih))

GGCYCTTTTHAGRGCC (SEQ ID NO: 26 de acuerdo con la fórmula (Ih))

GGCYCTTTTMAGRGCC (SEQ ID NO: 27 de acuerdo con la fórmula (Ih))

Además en este contexto, las siguientes secuencias tallo-bucle de histona (con elementos frontera de tallo) de acuerdo con una de las fórmulas específicas (II) o (IIa) a (IIh) son particularmente preferentes:

- 5 H*H*HHVVGYYYYHHTHRVRCBVHH*N*N* (SEQ ID NO: 28 de acuerdo con la fórmula (IIc))
M*H*MHMSGYTYTYTMARRRCSMCH*H*H* (SEQ ID NO: 29 de acuerdo con la fórmula (IIc))
M*M*MMMSGYCTTTTMAGRRCSACH*M*H* (SEQ ID NO: 30 de acuerdo con la fórmula (IIc))
N*N*NNNDGNNBNNTHTVNNNCHNHN*N*N* (SEQ ID NO: 31 de acuerdo con la fórmula (IIe))
N*N*HHNRGNNNYHBTHRDNNCYDHH*N*N* (SEQ ID NO: 32 de acuerdo con la fórmula (IIe))
- 10 N*H*HHVRGNDBYHYTHRDHNCYRHH*H*H* (SEQ ID NO: 33 de acuerdo con la fórmula (IIe))
H*H*MHMVGYYTYHTRVRCBVMH*H*N* (SEQ ID NO: 34 de acuerdo con la fórmula (IIf))
M*M*MMMSGYCTTYTMAGRRCSMCH*H*H* (SEQ ID NO: 35 de acuerdo con la fórmula (IIf))
M*M*MMMSGYCTTTTMAGRRCSACH*M*H* (SEQ ID NO: 36 de acuerdo con la fórmula (IIf))
H*H*MAMGGYCTTYTHAGRRCCVHN*N*M* (SEQ ID NO: 37 de acuerdo con la fórmula (IIg))
- 15 H*H*AAMGGCYCTTYTMAGRGCCVCH*H*M* (SEQ ID NO: 38 de acuerdo con la fórmula (IIg))
M*M*AAMGGCTCTTTTMAGRGCCMCY*M*M* (SEQ ID NO: 39 de acuerdo con la fórmula (IIg))
N*H*AAHDGHYCTDYTHASRRCCVHB*N*H* (SEQ ID NO: 40 de acuerdo con la fórmula (IIh))
H*H*AAMGGCYCTTTTHAGRGCCVMY*N*M* (SEQ ID NO: 41 de acuerdo con la fórmula (IIh))
H*M*AAAGGCYCTTTTMAGRGCCRMV*H*M* (SEQ ID NO: 42 de acuerdo con la fórmula (IIh))
- 20 De acuerdo con una realización preferida adicional, el ARN modificado comprende o codifica al menos una secuencia tallo-bucle de histona que tiene al menos aproximadamente un 80%, de manera preferente al menos aproximadamente 85%, de manera más preferente al menos aproximadamente 90%, o de manera aún más preferente al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos no conservados a 100% conservados de las secuencias tallo-bucle de histona de acuerdo con al menos una de las fórmulas específicas (I) o (Ia) a (Ih) o (II) o (IIa) a (IIh) o con una secuencia tallo-bucle de histona de origen natural.
- 25

Un ejemplo preferido particular para una secuencia tallo-bucle de histona es la secuencia de acuerdo con la SEC ID No: 43 (CAAAGGCTCTTTTCAGAGCCACCA) o la secuencia de ARN correspondiente de acuerdo con la SEC ID No: 44 (CAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCA).

Modificación UTR:

- 30 Preferentemente, el ARN modificado según la invención tiene al menos una secuencia de modificada 5' y/o 3' (modificación UTR). Estas modificaciones en las regiones no traducidas 5' y/o 3' (UTR) tienen el efecto de incrementar la vida media del ARN en el citosol o pueden incrementar la eficiencia de traducción y así mejorar la expresión del péptido o de la proteína codificada. Estas secuencias UTR pueden tener un 100% de identidad de secuencia con las secuencias de origen natural que se presentan en los virus, bacterias y eucariotas, pero
- 35 también pueden ser parcial o completamente sintéticas. Las secuencias no traducidas (UTR) del gen de (alfa-) o beta-globina, por ejemplo de *Homo sapiens* o *Xenopus laevis*, se pueden mencionar como ejemplo de secuencias de estabilización que se pueden utilizar para un ácido nucleico estabilizado. Otro ejemplo de secuencia de estabilización tiene la fórmula general (C/U)CCAN_xCCC(U/A)Py_xUC(C/U)CC, que está contenida en las 3'-UTR de los ARN muy estables que codifican (alfa-)globina, colágeno tipo(1), 15-lipoxigenasa o tirosina hidroxilasa (véase, Holcik et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 2410 a 2414). Particularmente preferida
- 40 en el contexto de la presente invención es la UTR mutada de (alfa-) globina que comprende la siguiente secuencia GCCCGaTGGG CCTCCCAACG GGCCCTCCTC CCCTCCTTGC ACCG (SEQ ID No. 45) (el nucleótido subrayado muestra la mutación en comparación con la secuencia de tipo salvaje), que también se denomina aquí "muag". Tales secuencias UTR introducidas por supuesto se pueden utilizar individualmente o
- 45 en combinación entre sí y también en combinación con otras modificaciones de secuencia conocidas por el experto en la técnica.

Preferiblemente, las señales de desintegración se eliminan de las regiones no traducidas 3' (3' UTR) de un

ARN de acuerdo con la invención. Específicamente, los elementos ricos en uridilato adenilato (ARE) se reemplazan por el 3'UTR de un ARNm estable (por ejemplo ARNm de α - β -globina) (revisado en Tavernier et al., J Control Release. 2011 Mar 30; 150 (3): 238 -47. PMID: 20970469).

5 En este contexto, se demuestra que la 3'UTR de un ARNm de α -globina puede ser un factor importante para la estabilidad bien conocida del ARNm de α -globina (Rodgers y col., Regulated α -globina mRNA decay is a cytoplasmic event proceeding through 3'-to-5' exosome-dependent decapping, RNA, 8, páginas 1526-1537, 2002). La 3'UTR de un ARNm de α -globina está implicada aparentemente en la formación de un complejo de ribonucleoproteína específico, el α -complejo, cuya presencia se relaciona con estabilidad del ARNm *in vitro* (Wang y col., An mRNA stability complex functions with poli(A)-binding protein to stabilize mRNA *in vitro*, Molecular and Cellular biology, Vol 19, No. 7, Julio de 1999, páginas 4552-4560).

En este contexto, se prefiere particularmente que las UTR 5' y/o 3' del gen que comprenden el marco de lectura abierto contenido en el ARN modificado de acuerdo con la invención se eliminen en el ARN modificado. Por tanto, el ARN modificado de acuerdo con la invención comprende preferiblemente UTR que son heterólogas al marco de lectura abierto si está presente en el ARN modificado.

15 En una realización preferente, en un ARN modificado que se administra mediante inyección neumática y que comprende al menos un marco de lectura abierto está presente una combinación de dos o más de las modificaciones descritas anteriormente. En una realización particularmente preferente, se modifica un ARN que comprende al menos un marco de lectura abierto introduciendo una 3'UTR (heteróloga), una cola poli(A), una
20 secuencia poli(C) y un tallo-bucle de histonas. Preferiblemente, la 3'UTR aquí es la UTR mutada de (alfa-) globina que comprende la secuencia GCCCGaTGG CCTCCCAACG GGCCCTCCTC CCCTCCTTGC ACCG (SEQ ID NO. 45; muag; el nucleótido subrayado muestra la mutación en comparación con la secuencia de tipo salvaje), la cola poli(A) consta de 64 nucleótidos de adenina, la secuencia poli(C) consta de 30 nucleótidos de citosina y el tallo-bucle de histona tiene una estructura seleccionada de una de las fórmulas (I) o (II),
25 preferiblemente la secuencia de ARN de acuerdo con la SEC. ID No. 44 (CAAAGGCUCUUUCAGAGCCACCA). Más preferiblemente, el ARN en esta realización específica comprende las modificaciones de secuencia que se muestran en la Fig. 4 (SEQ ID NO. 46; ver también Ejemplo 1).

Mediante una realización adicional, el ARN modificado según la invención comprende preferiblemente al menos uno de los siguientes elementos estructurales: un elemento de región no traducida 5'- y/o 3' (elemento UTR),
30 en particular un elemento 5'-UTR, que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'-UTR de un gen TOP o de un fragmento, homólogo o variante del mismo, o un elemento 5'- y/o 3'-UTR que puede derivarse de un gen que proporciona un ARNm estable o de un homólogo, fragmento o variante del mismo; una estructura tallo-bucle de histona, preferiblemente un tallo-bucle de histona en su región no traducida 3'; una estructura 5'-cap; una cola poli-A; o una secuencia poli(C).

35 En una realización preferente del primer aspecto de la presente invención, el ARN modificado de acuerdo con la invención comprende al menos un elemento 5'- o 3'-UTR. En este contexto, un elemento UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'- o 3'-UTR de cualquier gen natural o que se deriva de un fragmento, homólogo o variante de la 5'- o 3'-UTR de un gen. Preferiblemente, el elemento 5'- o 3'-UTR usado de acuerdo con la presente invención es heterólogo a la región codificante del ARN modificado
40 de acuerdo con la invención. Incluso si se prefieren los elementos 5'- o 3'-UTR derivados de genes naturales, también se pueden usar elementos UTR obtenidos por ingeniería sintética en el contexto de la presente invención.

En una realización particularmente preferente del primer aspecto de la presente invención, la secuencia del ARN modificado según la invención comprende al menos un elemento de la región no traducida 5' (elemento 5'UTR) que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen TOP o de un fragmento, homólogo o variante de la 5'UTR de un gen TOP.

Se prefiere particularmente que el elemento 5'UTR no comprenda un motivo TOP o un 5'TOP, como se definió anteriormente.

50 En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del elemento 5'UTR, que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP termina en su extremo 3' con un nucleótido ubicado en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aguas arriba del codón de inicio (por ejemplo A(U/T)G) del gen o del ARNm del que se deriva. Por tanto, el elemento 5'UTR no comprende ninguna parte de la región codificante de la proteína. Así, preferiblemente, la única parte codificante de la proteína del ARN modificado de acuerdo con la invención la proporciona la región codificante.

La secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen TOP se deriva de un gen TOP eucariótico, preferiblemente un gen TOP animal o vegetal, más preferiblemente de un gen TOP de cordado, incluso más preferiblemente un gen TOP vertebrado, con mayor preferencia un gen TOP de mamífero, tal como un gen TOP humano.

5 Por ejemplo, el elemento 5'UTR se selecciona preferentemente de elementos 5'-UTR que comprenden o consisten en una secuencia de ácido nucleico derivada de una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID No. 1 -1363, SEQ ID No. 1395, SEQ ID No. 1421 y SEQ ID No. 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, a partir de los homólogos de SEQ ID No. 1-1363, SEQ ID No. 1395, SEQ ID No. 1421 y SEQ ID No. 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de una variante de la misma, o
10 preferiblemente de una secuencia de ARN correspondiente. El término "homólogos de las SEQ ID No. 1-1363, SEQ ID No. 1395, SEQ ID No. 1421 y SEQ ID No. 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700" se refiere a secuencias de otras especies que no son homo sapiens que son homólogas a las secuencias de acuerdo con las SEQ ID No. 1 -1363, SEQ ID No. 1395, SEQ ID NO. 1421 y SEQ ID No. 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700.

15 En una realización preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una secuencia de ácido nucleico que se extiende desde la posición de nucleótido 5 (es decir, el nucleótido que se encuentra en la posición 5 en la secuencia) hasta la posición de nucleótido inmediatamente 5' al codón de inicio (ubicado en el extremo 3' de las secuencias), por ejemplo la posición del nucleótido inmediatamente 5' respecto a la secuencia ATG, de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID No. 1 -1363, SEQ ID NO. 1395, SEQ ID NO. 1421 y SEQ ID NO. 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de homólogos de las SEQ ID No. 1 - 1363, SEQ ID No. 1395, SEQ ID No. 1421 y SEQ ID No. 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de una variante de la misma, o una secuencia de ARN correspondiente. Es particularmente preferente que el elemento 5'UTR se derive de una secuencia de ácido nucleico que se extiende desde la posición del nucleótido inmediatamente 3' al 5'TOP hasta la posición del nucleótido inmediatamente 5' al codón de inicio (ubicado en el extremo 3' de las secuencias), por ejemplo la posición del nucleótido inmediatamente 5' respecto a la secuencia ATG de una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID No. 1 - 1363, SEQ ID No. 1395, SEQ ID No. 1421 y SEQ ID No. 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de los homólogos de las SEQ ID No. 1 - 1363, SEQ ID No. 1395, SEQ ID No. 1421 y SEQ ID No. 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, de una variante de la misma, o una
20 secuencia de ARN correspondiente.

En una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP que codifica para una proteína ribosomal o de una variante de una 5'UTR de un gen TOP que codifica para una proteína ribosomal. Por ejemplo, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las SEQ ID No: 67, 170, 193, 244, 259, 554, 650, 675, 700, 721, 913, 1016, 1063, 1120, 1138 y 1284-1360 de la solicitud de patente WO2013/143700, una secuencia de ARN correspondiente, un homólogo de la misma o una variante de la misma como se describe aquí, preferiblemente sin el motivo 5'TOP. Como se describió anteriormente, la secuencia que se extiende desde la posición 5 al nucleótido inmediatamente 5' al ATG (que se encuentra en el extremo 3' de las secuencias) corresponde a la 5'UTR de dichas secuencias.
35

Preferiblemente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP que codifica para una proteína ribosomal grande (RPL) o un homólogo o variante de una 5'UTR de un TOP gen que codifica para una proteína ribosomal grande (RPL). Por ejemplo, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 5'UTR de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID No: 67, 259, 1284-1318, 1344, 1346, 1348-1354, 1357, 1358, 1421 y 1422 de la solicitud de patente WO2013/143700, una secuencia de ARN correspondiente, un homólogo de la misma o una variante de la misma como se describe aquí, preferiblemente sin el motivo 5'TOP.
40

En una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen Large 32 de la proteína ribosomal, preferiblemente de un gen Large 32 (L32) de proteína ribosomal de vertebrado, más preferiblemente de un gen Large 32 (L32) de proteína ribosomal de mamífero, con mayor preferencia de un gen Large 32 (L32) de proteína ribosomal humana, o de una variante de la 5'UTR de un gen Large 32 de proteína ribosomal, preferiblemente de una proteína ribosomal de vertebrado gen Large32 (L32), más preferiblemente de un gen Large32 (L32) de proteína ribosomal de mamífero, más preferiblemente de un gen Large32 (L32) de proteína ribosomal humana, donde preferiblemente el elemento 5'UTR no comprende el 5'TOP de dicho gen.
50
55

Por consiguiente, en una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en

una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 40%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 60%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 90%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente el 95%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 55 (5'-UTR de la proteína ribosomal humana Large 32 que carece del tracto oligopirimidina terminal 5': GGCGCTCCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCCTTCTCGGCATC; correspondiente a la SEQ ID No. 1368 de la solicitud de patente W02013/143700) o preferiblemente a una secuencia de ARN correspondiente, o en la que al menos un elemento 5'UTR comprende o consiste en un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 40%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 60%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 90%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente el 95%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 55 o más preferiblemente de una secuencia de ARN correspondiente, donde, preferiblemente, el fragmento es como se describe anteriormente, es decir un tramo continuo de nucleótidos que representan al menos el 20%, etc., de la 5'UTR de longitud completa. Preferiblemente, el fragmento tiene una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos o más, preferiblemente de al menos aproximadamente 30 nucleótidos o más, con mayor preferencia de al menos aproximadamente 40 nucleótidos o más. Preferentemente el fragmento es un fragmento funcional tal como se describe aquí.

En algunas realizaciones, el ARN modificado de acuerdo con la invención comprende un elemento 5'UTR que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen TOP de vertebrado, tal como un mamífero, por ejemplo un gen TOP humano, seleccionado de RPSA, RPS2, RPS3, RPS3A, RPS4, RPS5, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPS10, RPS11, RPS12, RPS13, RPS14, RPS15, RPS15A, RPS16, RPS17, RPS18, RPS19, RPS20, RPS21, RPS23, RPS24, RPS25, RPS26, RPS27, RPS27A, RPS28, RPS29, RPS30, RPL3, RPL4, RPL5, RPL6, RPL7, RPL7A, RPL8, RPL9, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL17, RPL18, RPL18A, RPL19, RPL21, RPL22, RPL23A, RPL24, RPL26, RPL27, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL31, RPL32, RPL34, RPL35, RPL35A, RPL36, RPL36A, RPL37, RPL37A, RPL38, RPL39, RPL40, RPL41, RPLP0, RPLP1, RPLP2, EEF1A1, EEF1B2, EEF1D, EEF1G, EEF2, EIF3E, EIF3F, EIF3H, EIF2S3, EIF3C, EIF3K, EIF3EIP, EIF4A2, PABPC1, HNRNPA1, TPT1, TUBB1, UBA52, NPM1, ATP5G2, GNB2L1, NME2, UQCRB, o de un homólogo o variante de los mismos, donde preferentemente el elemento 5'UTR no comprende un motivo TOP o el 5'TOP de dichos genes, y donde opcionalmente el elemento 5'UTR comienza en su extremo 5' con un nucleótido ubicado en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aguas abajo del tracto de oligopirimidina 5' terminal (TOP), y donde, además, opcionalmente, el elemento 5'UTR, que se deriva de una 5'UTR de un gen TOP termina en su extremo 3' con un nucleótido ubicado en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aguas arriba del codón de inicio (A(U/T)G del gen del que se deriva.

En otras realizaciones particularmente preferentes, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen Large32 de proteína ribosomal (RPL32), un gen Large35 de proteína ribosomal (RPL35), un gen de proteína ribosomal Large21 (RPL21), una ATP sintasa, un transportador H⁺, un complejo mitocondrial F1, una subunidad alfa 1, gen de músculo cardíaco (ATP5A1), un gen de hidroxisteroide (17-beta) deshidrogenasa 4 (HSD17B4), un gen andrógeno 1 inducido (AIG1), un gen Vlc de la subunidad citocromo c oxidasa de vertebrados (COX6C) o un gen N-acilesfingosina-amidohidrolasa (ceramidasa ácida) 1 (ASAH1) o de una variante de los mismos, preferiblemente de un gen de proteína 32 ribosomal de vertebrado (RPL32), un gen 35 de la proteína ribosómica vertebrada Large (RPL35), un gen 21 de la proteína ribosomal vertebrada (RPL21), una ATP sintasa de vertebrado, H⁺ transportador, complejo F1 mitocondrial, subunidad alfa 1, gen del músculo cardíaco (ATP5A1) gen, un hidroxisteroide de vertebrado (1 gen 7-beta) deshidrogenasa 4 (HSD1 7B4), un gen 1 inducido por andrógenos inducidos por andrógenos (AIG1), un gen Vic de la subunidad citocromo c oxidasa de vertebrados (COX6C), o un gen vertebrado N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1 gen (ASAH1) o de una variante del mismo, más preferiblemente de una proteína ribosomal de mamífero gen 32 grande (RPL32), un gen de una proteína ribosómica Large35 (RPL35), un gen de proteína ribosómica Large21 (RPL21), una ATP sintasa de mamífero, un transportador de H⁺, complejo mitocondrial F1, subunidad alfa 1, un gen de músculo cardíaco (ATP5A1), un gen de hidroxisteroide (17-beta) deshidrogenasa 4 de mamífero (HSD17B4), un gen inducido por andrógeno 1 de mamífero (AIG1), un gen Vlc de la subunidad de citocromo c oxidasa de mamífero (COX6C) o un gen N-acilesfingosina-amidohidrolasa 1 de mamífero (ácido ceramidasa) (ASAH1) o de una variante de los mismos, con mayor preferencia de un gen Large32 de proteína ribosomal humana (RPL32), un gen Large35 de proteína ribosomal humana (RPL35), un gen Large21 de proteína ribosomal humana (RPL21), una ATP sintasa humana, un transportador de H⁺, complejo mitocondrial F1, subunidad alfa 1, un gen de músculo cardíaco (ATP5A1), un gen de hidroxisteroide humano (17-beta) deshidrogenasa 4 (HSD17B4), un gen inducido por andrógeno 1 humano (AIG1), un gen de subunidad citocromo c oxidasa humana (COX6C) o un gen de N-acilesfingosina-

amidohidrolasa 1 humana (ácido ceramidas) (ASAH1) o de una variante de los mismos, donde preferiblemente el elemento 5'UTR no comprende el 5'TOP de dicho gen.

En una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 5'UTR de un gen de hidroxisteroide (17-beta) deshidrogenasa 4 (HSD17B4), preferiblemente un gen hidroxisteroide vertebrado (17-beta) deshidrogenasa 4 (HSD17B4), más preferiblemente de un gen de hidroxisteroide (1-beta) deshidrogenasa 4 de mamífero (HSD17B4), con mayor preferencia un gen de hidroxisteroide (1-beta) deshidrogenasa humana (HSD17B4). En una realización preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 40%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 60%, preferiblemente de al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 90%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 95%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 99% con la 5'UTR comprendida en la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 54. Preferiblemente, la 5'UTR comprende o consiste en la 5'UTR comprendida en la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 54.

Por consiguiente, en una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 40%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 60%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 90%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 95%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 1368, o con las SEQ ID No. 1412-1420 de la solicitud de patente WO2013/143700, o una secuencia de ARN correspondiente, o donde al menos un elemento 5'UTR comprende o consiste en un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 40%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 60%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 90%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente el 95%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 1368 o SEQ ID No. 1412-1420 de la solicitud de patente WO2013/143700, donde preferiblemente el fragmento es como se describe anteriormente, es decir un tramo continuo de nucleótidos representando al menos el 20%, etc., de la 5'UTR de longitud completa. Preferiblemente, el fragmento tiene una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos o más, preferiblemente de al menos aproximadamente 30 nucleótidos o más, más preferiblemente de al menos aproximadamente 40 nucleótidos o más. Preferentemente el fragmento es un fragmento funcional tal como se describe aquí.

Así, en una realización particularmente preferente, el elemento 5'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 40%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 60%, preferiblemente de al menos aproximadamente el 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 90%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 95%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 56 (5'-UTR de ATP5A1 sin el tracto de oligopirimidina 5' terminal: GCGGCTCGGCCATTTTGTCCCAGTCAGTCCGGAGCCTGCGGCTGCACAAGTACCGCCTGCG-GAGTAACTGCAAAG; correspondiente a la SEQ ID No. 1414 de la solicitud de patente WO2013/143700) o preferiblemente con una secuencia de ARN correspondiente, o donde al menos un elemento 5'UTR comprende o consiste en un fragmento de una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente 40%, preferiblemente de al menos aproximadamente 50%, preferiblemente de al menos aproximadamente 60%, preferiblemente de al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente de al menos aproximadamente 90%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente el 95%, incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 26 o más preferiblemente una secuencia de ARN correspondiente, donde preferiblemente el fragmento es como se describe anteriormente, es decir, un tramo continuo de nucleótidos que representan al menos el 20%, etc., de la 5'UTR de longitud completa. Preferiblemente, el fragmento tiene una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos o más, preferiblemente de al menos aproximadamente 30 nucleótidos o más, más preferiblemente de al menos aproximadamente 40 nucleótidos o más. Preferentemente el fragmento es un fragmento funcional tal como se describe aquí.

En una realización preferente adicional, el ARN modificado según la invención comprende además al menos un elemento 3'UTR, que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico derivada de la 3'UTR de un gen de cordado, preferiblemente un gen de vertebrado, más preferiblemente un gen de mamífero, más

preferiblemente un gen humano, o de una variante de la 3'UTR de un gen de cordado, preferiblemente de un gen de vertebrado, más preferiblemente de un gen de mamífero, con mayor preferencia de un gen humano.

5 El término "elemento 3'UTR" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 3'UTR o de una variante de una 3'UTR. Un elemento 3'UTR en el sentido de la presente invención puede representar la 3'UTR de un ARNm. Así, en el sentido de la presente invención, preferiblemente, un elemento 3'UTR puede ser el 3'UTR de un ARNm, preferiblemente de un ARNm artificial, o puede ser la plantilla de transcripción para un 3'UTR de un ARNm. Por tanto, un elemento 3'UTR es preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la 3'UTR de un ARNm, preferiblemente a la 3'UTR de un ARNm artificial, tal como un ARNm obtenido por transcripción de un constructo de vector modificado genéticamente. Preferiblemente, el elemento 3'UTR cumple la función de una 3'UTR o codifica una secuencia que cumple la función de una 3'UTR.

Preferiblemente, el ARNm de la invención comprende un elemento 3'UTR que puede derivarse de un gen que se relaciona con un ARNm con una vida media mejorada (que proporciona un ARNm estable), por ejemplo un elemento 3'UTR como se define y describe a continuación.

15 En una realización particularmente preferida, el elemento 3'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 3'UTR de un gen seleccionado del grupo consistente en un gen de albúmina, un gen de α -globina, un gen de β -globina, un gen de tirosina-hidroxilasa, un gen de lipoxigenasa y un gen de colágeno alfa, tal como un gen de colágeno alfa 1 (I), o de una variante de una 3'UTR de un gen seleccionado del grupo consistente en un gen de albúmina, un gen de α -globina, un gen de β -globina, un gen de tirosina-hidroxilasa, un gen de lipoxigenasa y un gen de colágeno alfa, tal como un gen de colágeno alfa 1 (I) según la SEQ ID No. 1369-1 390 de la solicitud de patente WO2013/143700. En una realización particularmente preferente, el elemento 3'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 3'UTR de un gen de albúmina, preferiblemente un gen de albúmina de vertebrado, más preferiblemente un gen de albúmina de mamífero, más preferiblemente gen de albúmina humana según la SEQ ID No. 57.

3'UTR de albúmina humana SEQ ID No. 57:

30 CATCACATTT AAAAGCATCT CAGCCTACCA TGAGAATAAG AGAAAGAAAA TGAAGATCAA AAGCTTATTC ATCTGTTTTT CTTTTTCGTT GGTGTAAAGC CAACACCCTG TCTAAAAAAC ATAAATTTCT TTAATCATTT TGCCTCTTTT CTCTGTGCTT CAATTAATAA AAAATGGAAA GAATCT (correspondiente a la SEQ ID No: 1369 de la solicitud de patente WO2013/143700).

En este contexto, se prefiere particularmente que el ARN modificado de acuerdo con la invención comprenda un elemento 3'-UTR que comprenda una secuencia de ARN correspondiente derivada de los ácidos nucleicos de acuerdo con las SEQ ID No. 1369-1390 de la solicitud de patente WO2013/143700 o de un fragmento, homólogo o variante del mismo.

35 En este contexto, se prefiere particularmente que el elemento 3'-UTR del ARNm de la invención comprenda o consista en una secuencia de ARN correspondiente de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 58:

3'UTR de albúmina7

40 CATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCA TCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTGTTGCC TCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAA CCT (SEQ ID No. 58 correspondiente a la SEQ ID No. 1376 de la solicitud de patente WO2013/143700).

45 En este contexto, se prefiere particularmente que el elemento 3'-UTR del ARNm de la invención comprenda o consista en una secuencia de ARN correspondiente de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No.58.

En otra realización particularmente preferente, el elemento 3'UTR comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una 3'UTR de un gen de α -globina, preferiblemente un gen de α - o β -globina de vertebrado, más preferiblemente un un gen de α - o β -globina de mamífero, con mayor preferencia un gen de un gen de α - o β -globina humana de acuerdo con la SEC ID No.59-61:

50 3'-UTR de hemoglobina de Homo sapiens, alfa 1 (HBA1)

GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTGGGCCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTCCTGCAC
CCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (SEQ ID No:59 correspondiente a la SEQ ID
No. 1370 de la solicitud de patente WO2013/143700)

3'-UTR de hemoglobina de Homo sapiens, alfa 2 (HBA2)

5 GCTGGAGCCTCGGTAGCCGTTCTCCTGCCCCGTGGGCCTCCCAACGGGGCCCTCCTCCCCTCCTTGCA
CCGGCCCTCCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (SEQ ID No: 60 correspondiente a la SEQ ID
No. 1371 de la solicitud de patente WO2013/143700)

3'-UTR de hemoglobina de Homo sapiens, beta (HBB)

10 GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAATACTAACTGGGGG
ATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTT ATTTTCATTGC (SEQ ID No: 61
correspondiente a la SEQ ID No. 1372 de la solicitud de patente WO2013/143700)

Por ejemplo, el elemento 3'UTR puede comprender o consistir en el centro, la porción de unión a un complejo α de 3'UTR de un gen de α -globina, tal como un gen de globina humana, preferiblemente de acuerdo con la SEC ID No.62:

15 Centro, porción de unión a complejo α de la 3'UTR de un gen de α -globina (también denominado aquí "muag")

GCCCGATGGGCCTCCCAACGGGGCCCTCCTCCCCTCCTTGCACCG (SEQ ID NO. 62 correspondiente a la
SEQ ID No. 1393 de la solicitud de patente WO2013/143700).

20 En este contexto, se prefiere particularmente que el elemento 3'-UTR del ARN modificado de acuerdo con la invención comprenda o consista en una secuencia de ARN correspondiente de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEQ ID No. 62 o un homólogo, fragmento o variante de la misma.

25 El término "una secuencia de ácido nucleico que se deriva de la 3'UTR de un gen (...)" se refiere preferiblemente a una secuencia de ácido nucleico que se basa en la secuencia 3'UTR de un gen o de una parte del mismo, tal como en la 3'UTR de un gen de albúmina, de α -globina, de β -globina, de tirosina-hidroxilasa, de lipoxigenasa o de colágeno alfa, como colágeno alfa 1 (I), preferiblemente de un gen de albúmina o de una parte del mismo. Este término incluye secuencias correspondientes a la secuencia 3'UTR completa, es decir, la secuencia 3'UTR de longitud completa de un gen, y secuencias correspondientes a un fragmento de la secuencia 3'UTR de un gen, como un gen de albúmina, de α -globina, de β -globina, de tirosina-hidroxilasa, de lipoxigenasa o de colágeno alfa, como colágeno alfa 1 (I), preferiblemente de un gen de albúmina.

30 El término "una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una variante de la 3'UTR de un gen (...)" se refiere preferiblemente a una secuencia de ácido nucleico que se basa en una variante de la secuencia de la 3'UTR de un gen, como una variante de la 3'UTR de un gen de albúmina, de α -globina, de β -globina, de tirosina-hidroxilasa, de lipoxigenasa o de colágeno alfa, como colágeno alfa 1 (I), o en una parte del mismo como se describe anteriormente. Este término incluye secuencias correspondientes a la secuencia completa de la variante de la 3'UTR de un gen, es decir, la secuencia de la variante 3'UTR de longitud completa de un gen, y secuencias correspondientes a un fragmento de la secuencia de la variante 3'UTR de un gen. Un fragmento en este contexto consiste preferiblemente en un tramo continuo de nucleótidos correspondiente a un tramo continuo de nucleótidos de la variante de longitud completa 3'UTR que representa al menos el 20%, preferiblemente al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, incluso más preferiblemente al menos el 60%, incluso más preferiblemente al menos el 70%, incluso más preferiblemente al menos el 80%, y lo más preferiblemente al menos el 90% de la variante de longitud completa de la 3'UTR. Tal fragmento de una variante en el sentido de la presente invención es preferiblemente un fragmento funcional de una variante como se describe aquí.

45 Preferiblemente, el al menos un elemento 5'UTR y el al menos un elemento 3'UTR actúan sinérgicamente para aumentar la producción de proteínas a partir del ARN modificado de acuerdo con la invención como se describe anteriormente. Más preferiblemente, el al menos un elemento 5'UTR y/o el al menos un elemento 3'UTR actúan sinérgicamente junto con la inyección neumática del ARN modificado para aumentar la producción de proteínas.

50 En otras realizaciones específicas, el ARN modificado de acuerdo con la invención puede comprender, además de la al menos una modificación, una secuencia de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o un motivo IRES, que puede separar varios marcos de lectura abiertos, por ejemplo si el ARN modificado codifica dos o más péptidos o proteínas. Una secuencia IRES puede ser particularmente útil si el ARNm es un ARN bi o multi-

cistrónico.

5 Tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, el término "ARN" no es limitante y se refiere a cualquier ácido ribonucleico. Por tanto, el término ARN se aplica igualmente a los ácidos ribonucleicos que funcionan como ARN codificantes, por ejemplo como ARN viral, replicón o ARNm o a constructos de ARN artificial de cualquier tipo.

En una realización preferente, el ARN modificado no es un ARN pequeño de interferencia (ARNsi) o un ARN de horquilla corta (ARNhc). Preferiblemente, el RNA modificado no es un siRNA o shRNA contra un gen de resistencia, preferiblemente un gen de resistencia a múltiples fármacos, tal como MDR1/P-gp.

10 De acuerdo con la invención, el ARN comprende al menos una modificación que aumenta la expresión del péptido o proteína codificada por la región codificante del ARN. Dicha modificación es una modificación del contenido de G/C en su región codificante en comparación con la respectiva región de tipo salvaje, donde la secuencia de aminoácidos traducida de dicha región de tipo salvaje se mantiene. En una realización preferente, el ARN de acuerdo con la invención comprende al menos otro tipo distinto de modificación que aumenta la expresión del péptido o proteína codificada por la región codificante del ARN. Preferiblemente, el ARN de acuerdo con la invención comprende al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce tipos distintos de modificaciones. Alternativamente, o en combinación con otros tipos de modificaciones, una modificación específica como se define aquí, tal como una 3'UTR, una secuencia de bucle de histona o una secuencia poli C también puede estar presente en más de una copia en el ARN modificado según la invención. Esto es así en particular para los ARN bi o multicistrónicos. Un ARN modificado de acuerdo con la invención puede comprender combinaciones de varias modificaciones distintas y puede así caracterizarse por un enriquecimiento en GC en combinación con cualquiera de, por ejemplo, una 5'UTR, una secuencia poli C, una secuencia poli A, una 3'UTR o un tallo-bucle de histona, donde cada modificación distinta puede estar presente en forma de una sola copia por ARN o en forma de múltiples copias por ARN.

Las realizaciones preferidas del ARN de acuerdo con la invención pueden por tanto comprender, por ejemplo,

25 5' – región codificadora – tallo-bucle de histona – 3'; o

5' – región codificadora – tallo-bucle de histona – secuencia poli(A)/(C) – 3'; o

5' – región codificadora – secuencia poli(A)/(C) - tallo-bucle de histona – 3'; o

5' – región codificadora – tallo-bucle de histona – señal de poliadenilación – 3'; o

5' – región codificadora – señal de poliadenilación– tallo-bucle de histona – 3'; o

30 5' – región codificadora – región codificadora - tallo-bucle de histona – señal de poliadenilación - 3'; o

5' – región codificadora – tallo-bucle de histona – tallo-bucle de histona – secuencia de poli(A)/(C) – 3'; o

5' – región codificadora – tallo-bucle de histona – tallo-bucle de histona – señal de poliadenilación – 3'; o

5' – región codificadora – secuencia de poli(A)/(C) - secuencia de poli(A)/(C) - tallo-bucle de histona – 3'; etc.

35 donde la región de codificación comprende o consiste preferiblemente en una secuencia enriquecida con GC como se define aquí, y donde un elemento 5'UTR está presente preferiblemente en el lado 5' de la región codificadora y/o un elemento 3'UTR está presente preferiblemente entre el extremo 3' de la región codificante y el terminal 3' del ARN.

Una realización específica del ARN modificado puede comprender, por ejemplo, cualquiera de las combinaciones de características estructurales y modificaciones que se enumeran a continuación:

40 5' - región codificante - secuencia poli(A) - 3' ;

5' - región codificante - secuencia poli(A) - secuencia poli(C) - 3' ;

5' - región codificante - secuencia poli(A) - secuencia poli(C) – tallo bucle de histona - 3' ;

- 5' - región codificante - 3'UTR - secuencia poli(A) - 3';
- 5' - región codificante - 3'UTR - secuencia poli(A) - secuencia poli(C) - 3';
- 5' - región de codificación - 3'UTR - secuencia poli (A) - secuencia poli (C) - histona stem-loop - 3';
- 5' - 5'UTR - región codificante - secuencia poli(A) - 3';
- 5 5' - 5'UTR - región codificante - secuencia poli(A) - secuencia poli(C) - 3';
- 5' - 5'UTR - región codificante - secuencia poli(A) - secuencia poli(C) – tallo-bucle de histona - 3';
- 5' - región de codificación - 3'UTR - secuencia poli(A) - 3';
- 5' - 5'UTR - región codificante - 3'UTR - secuencia poli(A) - secuencia poli(C) - 3';
- 5' - 5'UTR - región codificante - 3'UTR - secuencia poli(A) - secuencia poli(C) – tallo bucle de histona - 3';
- 10 donde la región de codificación comprende o consiste preferiblemente en una secuencia enriquecida con GC como se define aquí.

Proteínas codificadas:

- 15 En una realización preferida, el ARN modificado comprende al menos un marco de lectura abierto, que codifica una proteína o péptido terapéutico. En otra realización, un antígeno es codificado por al menos un marco de lectura abierto, tal como un antígeno patógeno, un antígeno tumoral, un antígeno alergénico o un antígeno autoinmune. En este caso, la administración del ARN modificado que codifica el antígeno se utiliza en un enfoque de vacunación genética contra una enfermedad que involucra dicho antígeno.

En una realización alternativa, un anticuerpo está codificado por al menos un marco de lectura abierto del ARN modificado de acuerdo con la invención.

- 20 En una realización preferida, el ARN modificado de acuerdo con la invención no comprende un gen reporter o un gen marcador. Preferiblemente, el ARN modificado de acuerdo con la invención no codifica, por ejemplo, luciferasa; proteína verde fluorescente (GFP) y sus variantes (como eGFP, RFP o BFP); α -globina; hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT); β -galactosidasa; galactoquinasa; fosfatasa alcalina; fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) o un gen de resistencia (como un gen de resistencia a neomicina, puromicina, higromicina y zeocina). En una realización preferida, el ARN modificado de acuerdo con la invención no codifica luciferasa. En otra realización, el ARN modificado de acuerdo con la invención no codifica GFP o una variante del mismo.

Antígenos

Antígenos patógenos:

- 30 El ARN modificado de acuerdo con la presente invención puede codificar una proteína o un péptido que comprende un antígeno patógeno o un fragmento, variante o derivado del mismo. Dichos antígenos patógenos se derivan de organismos patógenos, en particular organismos patógenos bacterianos, virales o protozoológicos (multicelulares), que provocan una reacción inmunológica en un sujeto, en particular un sujeto mamífero, más particularmente un ser humano. Más específicamente, los antígenos patógenos son
- 35 preferiblemente antígenos de superficie, por ejemplo proteínas (o fragmentos de proteínas, por ejemplo, la porción exterior de un antígeno de superficie) ubicadas en la superficie del virus o del organismo bacteriano o protozoológico.

- 40 Los antígenos patogénicos son antígenos de péptido o proteína derivados de un patógeno asociado a una enfermedad infecciosa, preferiblemente seleccionados de antígenos derivados de los patógenos *Acinetobacter baumannii*, *Anaplasma* genus, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma duodenale*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Ascaris lumbricoides*, *Aspergillus* genus, *Astroviridae*, *Babesia* genus, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bartonella henselae*, virus BK, *Blastocystis hominis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia* genus, *Borrelia* spp, *Brucella* genus, *Brugia malayi*, familia *Bunyaviridae*, *Burkholderia cepacia* y otras especies de *Burkholderia*, *Burkholderia mallei*,

Burkholderia pseudomallei, familia de Caliciviridae, Campylobacter genus, Candida albicans, Candida spp, Chlamydia trachomatis, Chlamydomphila pneumoniae, Chlamydomphila psittaci, CJD prion, Clonorchis sinensis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Clostridium perfringens, Clostridium spp, Clostridium tetani, Coccidioides spp, coronavirus, Corynebacterium diphtheriae, Coxiella burnetii, virus de fiebre hemorrágica de Crimean-Congo, Cryptococcus neoformans, Cryptosporidium genus, Citomegalovirus (CMV), virus del Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4), Dientamoeba fragilis, Ebolavirus (EBOV), Echinococcus genus, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia ewingii, Ehrlichia genus, Entamoeba histolytica, Enterococcus genus, Enterovirus genus, Enteroviruses, principalmente virus Coxsackie A y Enterovirus 71 (EV71), Epidermophyton spp, Virus Epstein-Barr (EBV), Escherichia coli O157:H7, O111 y O104:H4, Fasciola hepatica y Fasciola gigantica, FFI prion, superfamilia Filarioidea, Flavivirus, Francisella tularensis, Fusobacterium genus, Geotrichum candidum, Giardia intestinalis, Gnathostoma spp, GSS prion, virus Guanarito, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Henipavirus (virus Hendra virus Nipah), Virus de Hepatitis A, Virus de Hepatitis B (HBV), Virus de Hepatitis C (HCV), Virus de Hepatitis D, Virus de Hepatitis E, virus Herpes simple 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), Histoplasma capsulatum, VIH (Virus de inmunodeficiencia humana), Hortaea werneckii, bocavirus humano (HBoV), herpesvirus 6 humano (HHV-6) y herpesvirus 7 humano (HHV-7), metapneumovirus humano (hMPV), virus del papiloma humano (HPV), virus de parainfluenza (HPIV), virus de encefalitis Japonesa, virus JC, virus Junín, Kingella kingae, Klebsiella granulomatis, Kuru prion, virus Lassa, Legionella pneumophila, Leishmania genus, Leptospira genus, Listeria monocytogenes, Virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Machupo, Malassezia spp, virus Marburg, virus Measles, Metagonimus yokagawai, Microsporidia phylum, virus Molluscum contagiosum (MCV), virus Mumps, Mycobacterium leprae y Mycobacterium lepromatosis, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium ulcerans, Mycoplasma pneumoniae, Naegleria fowleri, Necator americanus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Nocardia asteroides, Nocardia spp, Onchocerca volvulus, Orientia tsutsugamushi, familia de Orthomyxoviridae (Influenza), Paracoccidioides brasiliensis, Paragonimus spp, Paragonimus westermani, Parvovirus B19, Pasteurella genus, Plasmodium genus, Pneumocystis jirovecii, Poliovirus, Virus de la rabia, Virus sincitial respiratorio (RSV), Rinovirus, rinovirus, Rickettsia akari, Rickettsia genus, Rickettsia prowazekii, Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, virus de la fiebre Rift Valley, Rotavirus, Virus de la rubéola, virus Sabia, género Salmonella, Sarcoptes scabiei, SARS coronavirus, género Schistosoma, género Shigella, virus Sin Nombre, Hantavirus, Sporothrix schenckii, Staphylococcus genus, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Strongyloides stercoralis, Taenia genus, Taenia solium, Virus de encefalitis transmitido por garrapatas (TBEV), Toxocara canis o Toxocara cati, Toxoplasma gondii, Treponema pallidum, Trichinella spiralis, Trichomonas vaginalis, Trichophyton spp, Trichuris trichiura, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Ureaplasma urealyticum, virus zóster de varicela (VZV), Virus zóster de varicela (VZV), Viruela mayor o Viruela menor, vCJD prion, Virus de encefalitis equina venezolana, Vibrio cholerae, virus del Nilo Occidental, Virus de encefalitis equina Occidental, Wuchereria bancrofti, Virus de fiebre amarilla, Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis, y Yersinia pseudotuberculosis.

En este contexto, son particularmente preferente antígenos de los patógenos seleccionados de virus de la gripe, virus sincitial respiratorio (RSV), virus de herpes simple (HSV), virus de papiloma humano (HPV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), Plasmodium, Staphylococcus aureus, virus del Dengue, Chlamydia trachomatis, Citomegalovirus (CMV), virus de hepatitis B (HBV), Mycobacterium tuberculosis, virus de la rabia y virus de fiebre amarilla.

En una realización preferida, el ARN modificado de acuerdo con la invención codifica una proteína o péptido del virus de la rabia o un fragmento antigénico de la misma. Preferiblemente, el ARN modificado de acuerdo con la invención codifica una proteína o péptido antigénico seleccionado del grupo que consiste en glicoproteína G (RAV-G), nucleoproteína N (RAV-N), fosfoproteína P (RAV-P), proteína de la matriz M (RAV) -M) o ARN polimerasa L (RAV-L) del virus de la rabia, o un fragmento, variante o derivado del mismo.

En otra realización preferida, el ARN modificado de acuerdo con la invención codifica una proteína o péptido del virus sincitial respiratorio (RSV) o un fragmento antigénico de los mismos. Preferiblemente, el ARN modificado de acuerdo con la invención codifica una proteína o péptido antigénico seleccionado del grupo que consiste en la proteína de fusión F, la glicoproteína G, la proteína hidrófoba corta SH, la proteína de la matriz M, la nucleoproteína N, la polimerasa grande L, la proteína M2-1, la proteína M2-2, la fosfoproteína P, la proteína no estructural NS1 o la proteína no estructural NS2 del virus sincitial respiratorio (RSV), o un fragmento, variante o derivado de los mismos.

Antígenos tumorales:

En una realización adicional, el ARN modificado de acuerdo con la presente invención puede codificar una proteína o un péptido que comprende un péptido o proteína que comprende un antígeno tumoral, un fragmento, variante o derivado de dicho antígeno tumoral, preferiblemente donde el antígeno tumoral es un antígeno específico de melanocitos, un antígeno de cáncer de testículo o un antígeno específico de tumor,

- preferiblemente un antígeno CT-X, un antígeno CT no X, un compañero de unión para un antígeno de CT-X o un socio de unión para un antígeno CT no X o un antígeno específico de tumor, más preferiblemente un antígeno CT-X, un compañero de unión para un antígeno CT no X o un antígeno específico de tumor o un fragmento, variante o derivado de dicho antígeno tumoral; y donde cada una de las secuencias de ácido nucleico codifica un péptido o proteína diferente; y donde al menos una de las secuencias de ácido nucleico codifica para 5T4, 707-AP, 9D7, AFP, AlbZIP HPG1, alfa-5-beta-1-integrina, alfa-5-beta-6-integrina, alfa-actinina-4/m, alfa-metilacil-coenzima A racemasa, ART-4, ARTC1/m, B7H4, BAGE-1, BCL-2, bcr/abl, beta-catenina / m, BING-4, BRCA1 / m, BRCA2 / m , CA 1 5-3 / CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, calreticulina, CAMEL, CASP-8/m, catepsina B, catepsina L, CD19, CD20, CD22, CD25, CDE30, CD33 , CD4, CD52, CD55, CD56, CD80, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, proteína similar a coactosina, collage XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, ciclina B1, ciclina D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3 , ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP , GnT- V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, hepsina, Her2/neu, HERV-K-MEL, HLA-A*0201-R171, HLA-A11/m, HLA-A2/m, HNE, homeobox NKX3.1, HOM-TES-14 / SCP-1, HOM-TE S-85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1 R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, receptor de laminina inmaduro, kalikreína-2, kalikreína-4, Ki67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC-1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE- A3, MAGE-A4, MAGE-A6 , MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B1 6, MAGE-B1 7 , MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D1, MAGE-D2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H1, MAGEL2, mamaglobina A, MART-1/melan-A, MART-2, MART-2/m, matriz de proteína 22, MC1R, M-CSF, ME1/m, mesotelina, MG50/PXDN, MMP11, MN/CA IX-antígeno, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, miosina clase I/m, NA88-A, N-acetilglucosaminiltransferasa V, Neo-PAP, Neo-PAP/m , NFYC / m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-1, NY-ESO-B, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS-9/m, osteocalcina, osteopontina, p15, p190 minor bcr-abl, p53, p53/m, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PAP, PART-1, PATE, PDEF, Pim-1-Quinasa, Pin-1, Pml/PARalfa, POTE, PRAME, PRDX5/m, prosteína, proteinasa-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD168, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp17, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP-1, survivina, survivina-2B, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGFbeta ,TGFbetaRII, TGM-4, TPI/m, TRAG-3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, tirosinasa, UPA, VEGFR1, VEGFR-2/FLK-1, WT1 y un idiotipo de inmunoglobulina de una célula sanguínea linfoide o un idiotipo de receptor de células T de una célula sanguínea linfoide, o un fragmento, variante o derivado de dicho antígeno tumoral; preferiblemente survivina o un homólogo de la misma, un antígeno de la familia MAGE o una pareja de unión de la misma o un fragmento, variante o derivado de dicho antígeno tumoral.
- 35 Particularmente preferidos en este contexto son los antígenos tumorales NY-ESO-1, 5T4, MAGE-C1, MAGE-C2, survivina, Muc-1, PSA, PSMA, PSCA, STEAP y PAP.

En este contexto, se prefiere particularmente que al menos un ARN modificado administrado por inyección neumática según la invención codifique una de las siguientes combinaciones de antígenos:

- Muc-1, PSA, PSMA, PSCA y STEAP
- 40
- Muc-1, PSA, PSMA, PSCA y PAP
 - Muc-1, PSA, PSMA, STEAP y PAP
 - Muc-1, PSA, PSCA, STEAP y PAP
 - Muc-1, PSMA, PSCA, STEAP y PAP
 - PSA, PSMA, PSCA, STEAP y PAP
- 45
- Muc-1, PSA, PSMA, PSCA, STEAP y PAP.

En otra realización, se prefiere particularmente que al menos un ARN modificado administrado por inyección neumática según la invención codifique una de las siguientes combinaciones de antígenos:

- NY-ESO-1, 5T4, MAGE-C1, MAGE-C2 y Survivina
- NY-ESO-1, 5T4, MAGE-C1, MAGE-C2 y Muc-1

- NY-ESO-1, 5T4, MAGE-C1, Survivina y Muc-1
 - NY-ESO-1, 5T4, MAGE-C2, Survivina y Muc-1
 - NY-ESO-1, MAGE-C1, MAGE-C2, Survivina y Muc-1
 - 5T4, MAGE-C1, MAGE-C2, Survivina y Muc-1
- 5 • NY-ESO-1, 5T4, MAGE-C1, MAGE-C2, Survivina y Muc-1.

En una realización preferente, el ARN modificado administrado por inyección neumática codifica una proteína o un péptido, que comprende una proteína terapéutica o un fragmento, variante o derivado de la misma.

10 Las proteínas terapéuticas como se definen aquí son péptidos o proteínas beneficiosos para el tratamiento de cualquier enfermedad hereditaria o adquirida, o que mejoran la condición de un individuo. En particular, las proteínas terapéuticas desempeñan un papel importante en la creación de agentes terapéuticos que podrían modificar y reparar errores genéticos, destruir células cancerígenas o células infectadas con patógenos, tratar trastornos del sistema inmunológico, tratar trastornos metabólicos o endocrinos, entre otras funciones. Por ejemplo, la eritropoyetina (EPO), una hormona proteica, se puede utilizar para tratar a pacientes con deficiencia de eritrocitos, que es una causa común de complicaciones renales. Además, las proteínas adyuvantes, los anticuerpos terapéuticos están incluidos en las proteínas terapéuticas y también la terapia de reemplazo hormonal, que por ejemplo se emplea en la terapia femenina en la menopausia. En enfoques más recientes, las células somáticas de un paciente se utilizan para reprogramarlas en células madre pluripotentes, que reemplazan la terapia de células madre en disputa. También estas proteínas utilizadas para la reprogramación de células somáticas o usadas para diferenciar las células madre se definen aquí como proteínas terapéuticas.

15 Además, las proteínas terapéuticas se pueden usar para otros fines, por ejemplo para la curación de heridas, la regeneración de tejidos, la angiogénesis, etc.

20 Por tanto, las proteínas terapéuticas se pueden usar para diversos fines, incluido el tratamiento de diversas enfermedades tales como enfermedades infecciosas, neoplasias (por ejemplo cáncer o enfermedades tumorales), enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos, enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas, enfermedades del sistema nervioso, enfermedades del sistema circulatorio, enfermedades del sistema respiratorio, enfermedades del sistema nervioso, del sistema digestivo, enfermedades de la piel y tejido subcutáneo, enfermedades del sistema musculoesquelético y tejido conectivo y enfermedades del sistema genitourinario, independientemente de si son heredadas o adquiridas.

30 En este contexto, las proteínas terapéuticas particularmente preferidas que se pueden usar, entre otras, en el tratamiento de trastornos metabólicos o endocrinos se seleccionan entre: esfingomielinasa ácida (enfermedad de Niemann-Pick), adipotida (obesidad), agalsidasa-beta (galactosidasa humana A) (Enfermedad de Fabry previene la acumulación de lípidos que podrían conducir a complicaciones renales y cardiovasculares), alglucosidasa (enfermedad de Pompe (enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II)), alfa-galactosidasa A (alfa-GAL A, agalsidasa alfa) (enfermedad de Fabry), alfa-glucosidasa (Enfermedad de almacenamiento de glucógeno (GSD), Morbus Pompe), alfa-L-iduronidasa (mucopolisacaridosis (MPS), síndrome de Hurler, síndrome de Scheie), alfa-N-acetilglucosaminidasa (síndrome de Sanfilippo), anfiregulina (cáncer, trastorno metabólico), angiopoyetina ((Ang1, Ang2, Ang3, Ang4, ANGPTL2, ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL5, ANGPTL6, ANGPTL7) (angiogénesis, estabilización de vasos), Betacellulina (trastorno metabólico), Beta-glucuronidasa (síndrome de Sly), proteína morfogenética ósea BMP (BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP10, BMP15) (efecto regenerativo, afecciones relacionadas con los huesos, enfermedad renal crónica (ERC)), proteína CLN6 (enfermedad CLN6 - Infancia tardía atípica, tardía Variante de inicio, Juvenil Temprano, Lipofuscinosis Ceroides Neuronales (NCL), Factor de crecimiento epidérmico (EGF) (cicatrización de heridas, regulación del crecimiento celular, proliferación y diferenciación), Epigen (trastorno metabólico), Epiregulina (trastorno metabólico), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, FGF-15, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-19, FGF-20, FGF-21, FGF-22, FGF-23) (cicatrización de heridas, angiogénesis, trastornos endocrinos, regeneración de tejidos), Galsulfasae (Mucopolisacaridosis VI), Grelina (síndrome del intestino irritable (SII), obesidad, síndrome de Prader-Willi, diabetes mellitus tipo II), Glucocerebrosidasa (enfermedad de Gaucher), GM-CSF (efecto regenerativo, producción de glóbulos blancos, cáncer), factor de crecimiento de unión a heparina de tipo EGF (HB-EGF) (cicatrización de heridas, hipertrofia cardíaca y desarrollo y función del corazón), factor de crecimiento de hepatocitos HGF (efecto regenerativo, cicatrización de heridas), hepcidina (trastornos del metabolismo del hierro, beta-talasemia), albúmina humana (Disminución de la producción de albúmina (hipoproteinemia), aumento de la pérdida de albúmina (síndrome nefrótico), hipovolemia, hiperbilirrubinemia, Idursulfasa (Iduronato-2-sulfatasa) (Mucopolisacaridosis II (síndrome de Hunter)), Integrinas $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ y $\alpha 5\beta 1$ (macromoléculas de matriz de enlace y proteinasas,

40

45

50

55

angiogénesis), luduronato sulfatasa (síndrome de Hunter), Laronidasa (formas de mucopolisacaridosis I de Hurler y Hurler-Scheie), N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (rhASB); galsulfasa, arilsulfatasa A (ARSA), arilsulfatasa B (ARSB)) (deficiencia de arilsulfatasa B, síndrome de Maroteaux-Lamy, mucopolisacaridosis VI), N-acetilglucosamina-6-sulfatasa (síndrome de Sanfilippo), factor de crecimiento nervioso (NGF, Derivado del Cerebro) Factor (BDNF), Neurotrofina-3 (NT-3) y Neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (efecto regenerativo, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis coronaria, obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, síndromes coronarios agudos, demencia, depresión, esquizofrenia, autismo, síndrome de Rett, anorexia nerviosa, bulimia nerviosa, cicatrización de heridas, úlceras cutáneas, úlceras corneales, enfermedad de Alzheimer), neuregulina (NRG1, NRG2, NRG3, NRG4) (trastorno metabólico, esquizofrenia), neuropilina (NRP) 1, NRP-2) (angiogénesis, guía de axón, supervivencia celular, migración), Obestatina (síndrome del intestino irritable (SII), obesidad, síndrome de Prader-Willi, diabetes mellitus tipo II), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF (PDFF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D) (efecto regenerativo, cicatrización de heridas, trastorno en angiogénesis, arteriosclerosis, fibrosis, cáncer, receptores de TGF beta (endoglina, receptor de TGF-beta 1, receptor de TGF-beta 2, receptor de TGF-beta 3) (fibrosis renal, enfermedad renal, diabetes, enfermedad renal en etapa terminal (ERT), angiogénesis), trombopoyetina (THPO) (factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (MGDF)) (trastornos plaquetarios, plaquetas para donación, recuperación de recuentos de plaquetas después de la quimioterapia mielosupresora), factor de crecimiento transformante (TGF (TGF-a, TGF-beta) (TGFbeta1, TGFbeta2 y TGFbeta3)) (efecto regenerativo, curación de heridas, inmunidad, cáncer, cardiopatía, diabetes, síndrome de Marfan, síndrome de Loeys-Dietz), VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y PlGF) (efecto regenerativo, angiogénesis, cicatrización de heridas, cáncer, permeabilidad), Nesiritida (insuficiencia cardíaca congestiva descompensada aguda), tripsina (úlceras de decúbito, úlcera varicosa, desbridamiento de la escara, herida dehiscente), quemadura solar, íleo meconial), hormona adrenocorticotrófica (ACTH) ("enfermedad de Addison, Carcinoma de células pequeñas, Adrenoleucodistrofia, Hiperplasia suprarrenal congénita, Síndrome de Cushing, Síndrome de Nelson, Espasmos infantiles, Péptido atrio-natriurético (ANP) (trastornos endocrinos), Colecistocinina (diversa), Gastrina (hipogastrinemia), Leptina (Diabetes, hipertrigliceridemia, obesidad), oxitocina (estimulación de la lactancia materna, no progresión del parto), somatostatina (tratamiento sintomático del síndrome carcinoide, hemorragia aguda de las várices y acromegalia, poliquistosis hepática y renal, acromegalia y síntomas causados por tumores neuroendocrinos), vasopresina (hormona antidiurética) (diabetes insípida), calcitonina (osteoporosis posmenopáusica, hipercalcemia, enfermedad de Paget, metástasis óseas, dolor del miembro fantasma, estenosis espinal), exenatida (diabetes tipo 2 resistente al tratamiento con metformina y una sulfonilurea), hormona de crecimiento (HG), somatotropina (fallo de crecimiento debido a deficiencia de GH o insuficiencia renal crónica, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Turner, pérdida del SIDA o caquexia con terapia antiviral), insulina (Diabetes mellitus, cetoacidosis diabética, hiperpotasemia), factor de crecimiento similar a la insulina 1 IGF-1 (Fallo de crecimiento en niños con delección del gen GH o deficiencia primaria grave de IGF1, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad cardiovascular, insuficiencia cardíaca), Mecasermina rionfabato, análogo de IGF-1 (falta de crecimiento en niños con delección del gen GH o deficiencia primaria grave de IGF1, enfermedad neurodegenerativa, enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca), Mecasermina, análogo de IGF-1 (falta de crecimiento en niños con Supresión del gen GH o deficiencia primaria grave de IGF1, enfermedad neurodegenerativa, enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardíaca), Pegvisomant (Acromegalia), Pramlintida (Diabetes mellitus, en combinación con insulina), Teriparatida (hormona paratiroidea humana residuos 1-34) (osteoporosis severa), Becaplermina (complemento de desbridamiento para las úlceras diabéticas), dibotermína alfa (proteína morfogenética ósea 2) (cirugía de fusión espinal, reparación de lesión ósea), acetato de histrelina (hormona liberadora de gonadotropina); GnRH) (pubertad precoz), octreotida (acromegalia, alivio sintomático de los tumores de adenoma secretor de VI P y metástasis de los carcinoides) y palifermina (factor de crecimiento de queratinocitos; KGF) (mucosidad oral grave en pacientes sometidos a quimioterapia, cicatrización de heridas), (entre paréntesis la enfermedad particular para la cual se utiliza la proteína terapéutica en el tratamiento). Se entiende que estas y otras proteínas son terapéuticas, ya que están destinadas a tratar al sujeto reemplazando su producción endógena defectuosa de una proteína funcional en cantidades suficientes. Por consiguiente, tales proteínas terapéuticas son típicamente mamíferas, en particular proteínas humanas.

Para el tratamiento de trastornos sanguíneos, enfermedades del sistema circulatorio, enfermedades del sistema respiratorio, cáncer o enfermedades tumorales, enfermedades infecciosas o inmunodeficiencias después de las proteínas terapéuticas, se pueden usar: Alteplasa (activador tisular del plasminógeno; tPA) (embolia pulmonar, infarto de miocardio, ictus isquémico agudo, oclusión de los dispositivos de acceso venoso central), anistreplasa (trombolisis), antitrombina III (AT-III) (deficiencia hereditaria de AT-III, tromboembolismo), bivalirudina (reduce el riesgo de coagulación sanguínea en la angioplastia coronaria y trombocitopenia inducida por heparina), Darbepoetina alfa (Tratamiento de la anemia en pacientes con insuficiencia renal crónica e insuficiencia renal crónica (diálisis +/-)), Drotrecogina-alfa (proteína C activada) (sepsis grave con alto riesgo de muerte), eritropoyetina, epoetina-alfa, eritropoyetina, ertropoyetina (anemia por enfermedad crónica, miledisplasia, anemia por insuficiencia renal o quimioterapia, preparación preoperatoria), Factor IX (Hemofilia B), Factor VIIIa (hemorragia en pacientes con hemofilia A o B e inhibidores del factor VIII o factor IX), Factor VIII (hemofilia A), Lepirudina (trombocitopenia inducida por heparina), Concentrado de proteína C (Trombosis

venosa, Purpura fulminans), Reteplasa (eliminación de miteína de tPA) (Manejo del infarto agudo de miocardio, mejoría de la función ventricular), Estreptoquinasa (Infarto de miocardio transmural evolutivo agudo, embolia pulmonar, trombosis venosa profunda, trombosis o embolia arterial, oclusión de la cánula arteriovenosa, cánula de Tenecte, infarto de miocardio), urocinasa (embolia pulmonar), angiostatina (cáncer), inmunotoxina anti-CD22 (recaída de leucemia mieloide aguda CD33+), denileucina difitox (linfoma cutáneo de células T (CCD)), inmunocianina (cáncer de vejiga y próstata), MPS (Metalopanstimulina) (Cáncer), Aflibercept (Cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer colorrectal metastásico (mCRC, cáncer metastásico refractario a las hormonas, degeneración macular húmeda), Endostatina (cáncer, enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y la enfermedad de Crohn, retinopatía diabética, psoriasis y endometriosis), colagenasa (desbridamiento de úlceras dérmicas crónicas y áreas severamente quemadas, contractura de Dupuytren, enfermedad de Peyronie), desoxi-ribonucleasa I humana, Dornasa (Fibrosis quística; disminuye las infecciones del tracto respiratorio en pacientes seleccionados con FVC superior al 40% de lo previsto), hialuronidasa (utilizada como adyuvante para aumentar la absorción y dispersión de los fármacos inyectados, particularmente anestésicos en cirugía oftálmica y ciertos agentes de imagen), papaína (desecho de tejido necrótico o licuefacción de la muda en lesiones agudas y crónicas, como úlceras por presión, úlceras varicosas y diabéticas, quemaduras, heridas postoperatorias, heridas de quistes pilonidales, carbuncles y otras heridas), L-Asparaginasa (leucemia linfocítica aguda, que requiere una asparagina exógena para la proliferación), Peg-asparaginasa (leucemia linfocítica aguda, que requiere asparagina exógena para la proliferación), Rasburicasa (pacientes pediátricos con leucemia, linfoma y tumores sólidos que están en tratamiento contra el cáncer que puede causar el síndrome de lisis tumoral), gonadotropina coriónica humana (HCG) (Reproducción asistida), Hormona estimulante del folículo humano (FSH) (Reproducción asistida), Lutropina -alfa (Infertilidad con deficiencia de la hormona luteinizante), Prolactina (Hipoprolactinemia, deficiencia de prolactina en suero, disfunción ovárica en mujeres, ansiedad, disfunción eréctil arteriogénica, eyaculación precoz, oligozoospermia, astenospermia, hipofunción de vesículas seminales, hipoandrogenia), Inhibidor de proteinasa (deficiencia de antitripsina congénita), lactasa (gases, distensión abdominal, calambres y diarrea debido a la incapacidad de digerir la lactosa), enzimas pancreáticas (lipasa, amilasa, proteasa) (fibrosis quística, pancreatitis crónica, insuficiencia pancreática, post-Billroth II, cirugía de bypass geriátrica, obstrucción del conducto pancreático, esteatorrea, mala digestión, gases, distensión abdominal), adenosina desaminasa (pegademase bovina, PEG-ADA) (enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave debida a deficiencia de adenosina desaminasa), abatacept (artritis reumatoide (especialmente cuando es refractaria a la inhibición de TNF)), Alefacept (psoriasis en placas), Anakinra (artritis reumatoide), Etanercept (artritis reumatoide, Artritis reumatoide de curso poliarticular juvenil, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, psoriasis en placas, espondilitis anquilosante), antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL-1), Anakinra (inflamación y degradación de cartilago asociada a artritis reumatoide), Thimilina (enfermedades neurodegenerativas, reumatismo, anorexia nerviosa), antagonista de TNF-alfa (trastornos autoinmunes como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, hidradenitis supurativa, asma refractaria), enfuvirtida (infección por VIH-1) y timosina a1 (hepatitis B y C). (Entre paréntesis la enfermedad particular para la cual se utiliza la proteína terapéutica en el tratamiento).

Además, las proteínas adyuvantes o inmunoestimulantes también se incluyen en el término proteínas terapéuticas. Las proteínas adyuvantes o inmunoestimulantes se pueden usar en este contexto para inducir, alterar o mejorar una respuesta inmunitaria en un individuo para tratar una enfermedad particular o para mejorar la condición del individuo.

En este contexto, las proteínas adyuvantes pueden seleccionarse de mamíferos, en particular proteínas adyuvantes humanas, que típicamente comprenden cualquier proteína o péptido humano que es capaz de provocar una respuesta inmune innata (en un mamífero), por ejemplo como una reacción de la unión de un ligando TLR exógeno a un TLR. Más preferiblemente, las proteínas adyuvantes humanas se seleccionan del grupo consistente en proteínas que son componentes y ligandos de las redes de señalización de los receptores de reconocimiento de patrones que incluyen TLR, NLR y RLH, incluidas TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11; NOD1, NOD2, NOD3, NOD4, NOD5, NALP1, NALP2, NALP3, NALP4, NALP5, NALP6, NALP7, NALP7, NALP7, NALP1, NALP8, RIG-I, MDA5 y LGP2, transductores de señal de la señalización TLR que incluyen proteínas adaptadoras que incluyen, por ejemplo, Trif y Cardif; componentes de la señalización Small-GTPasas (RhoA, Ras, Rac1, Cdc42, Rab, etc.), componentes de la señalización PIP (PI3K, Src-quinasa, etc.), componentes de la señalización dependiente de MyD88 (MyD88, IRAK1, IRAK2, IRAK4, TRAF6, etc.), componentes de la señalización independiente de MyD88 (TICAM1, TICAM2, TRAF6, TBK1, IRF3, TAK1, IRAK1, etc.); quinasa activadas, por ejemplo Akt, MEKK1, MKK1, MKK3, MKK4, MKK6, MKK7, ERK1, ERK2, GSK3, PKC quinasa, PKD quinasa, GSK3 quinasa, JNK, p38MAPK, TAK1, IKK y TAK1; factores de transcripción activados, incluyendo por ejemplo NF-κB, c-Fos, c-Jun, c-Myc, CREB, AP-1, Elk-1, ATF2, IRF-3, IRF-7.

Las proteínas adyuvantes humanas de mamíferos, en particular, pueden seleccionarse además del grupo consistente en proteínas de choque térmico, tales como HSP10, HSP60, HSP65, HSP70, HSP75 y HSP90, gp96, Fibrinógeno, Typlll repet el dominio extra A de fibronectina; o componentes del sistema del complemento

que incluyen C1q, MBL, C1r, C1s, C2b, Bb, D, MASP-1, MASP-2, C4b, C3b, C5a, C3a, C4a, C5b, C6, C7, C8, C9, CR1, CR2, CR3, CR4, C1qR, C1INH, C4bp, MCP, DAF, H, I, P y CD59, o genes diana inducidos que incluyen, por ejemplo, Beta-Defensina, proteínas de superficie celular; o proteínas adyuvantes humanas que incluyen trif, ligando fit-3, Gp96 o fibronectina, etc., o cualquier especie homóloga de cualquiera de las proteínas adyuvantes humanas anteriores.

Proteínas adyuvantes de mamífero, en particular humanas pueden comprender además citoquinas que inducen o potencian una respuesta inmune innata, incluyendo IL-1 alfa, IL1 beta, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, TNFalfa, IFNalfa, IFNbeta, IFNgamma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF; quimiocinas que incluyen IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 alfa, RANTES, Eotaxin, CCL21; citoquinas que se liberan de macrófagos, incluyendo IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF-alfa; así como IL-1 R1 e IL-1 alfa.

Las proteínas terapéuticas para el tratamiento de trastornos sanguíneos, enfermedades del sistema circulatorio, enfermedades del sistema respiratorio, enfermedades de cáncer o tumorales, enfermedades infecciosas o inmunodeficiencias o proteínas adyuvantes son típicamente proteínas de origen mamífero, preferiblemente de origen humano, dependiendo del animal a tratar. Un sujeto humano, por ejemplo, preferiblemente se trata con una proteína terapéutica de origen humano.

Las proteínas adyuvantes patógenas típicamente comprenden una proteína adyuvante patógena que es capaz de provocar una respuesta inmune innata (en un mamífero), más preferiblemente seleccionada de proteínas adyuvantes patógenas derivadas de bacterias, protozoos, virus u hongos, etc., proteínas (adyuvantes), proteínas protozoarias (adyuvantes) (por ejemplo proteínas similares a profilina de *Toxoplasma gondii*), proteínas víricas (adyuvantes) o proteínas fúngicas (adyuvantes), etc.

Particularmente, las proteínas bacterianas (adyuvantes) pueden seleccionarse del grupo consistente en proteínas o chaperones de choque térmico bacteriano, incluyendo Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100; OmpA (proteína de membrana externa) de bacterias gramnegativas; porinas bacterianas, incluyendo OmpF; toxinas bacterianas, incluyendo toxina pertussis (PT) de *Bordetella pertussis*, toxina adenilato ciclasa pertussis CyaA y CyaC de *Bordetella pertussis*, PT-9K/129G mutante de toxina pertussis, toxina adenilato ciclasa pertussis CyaA y CyaC de *Bordetella pertussis*, toxina del tétanos, toxina del cólera (CT), enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT), subunidad B de la enterotoxina termolábil (LTB) *Escherichia coli* enterotoxina lábil mutantes con toxicidad reducida, incluyendo LTK63, LTR72; modulina soluble en fenol; proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP) de *Helicobacter pylori*; Proteína surfactante D; Lipoproteína de proteína A de la superficie externa de *Borrelia burgdorferi*, Ag38 (antígeno de 38 kDa) de *Mycobacterium tuberculosis*; proteínas de fimbriae bacterianas; Enterotoxina CT de *Vibrio cholerae*, Pilin de pili de bacterias gram negativas y proteína A surfactante; etc., o cualquier especie homóloga de cualquiera de las proteínas bacterianas (adyuvantes) anteriores.

Las proteínas bacterianas (adyuvantes) también pueden comprender flagelinas bacterianas. En el contexto de la presente invención, las flagelinas bacterianas pueden seleccionarse entre las flagelinas de organismos que incluyen, sin limitarse a, *Agrobacterium*, *Aquifex*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Caulobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Lachnospiraceae*, *Legionella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Roseburia*, *Salmonella*, *Serpulina*, *Serratia*, *Shigella*, *Treponema*, *Vibrio*, *Wolinella*, *Yersinia*, más preferiblemente de flagelinas de las especies que incluyen, sin limitación, *Agrobacterium tumefaciens*, *Aquifex pyrophilus*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bartonella bacilliformis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Borrelia burgdorferi*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Caulobacter crescentus*, *Clostridium botulinum* strain Bennett clon 1, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Rhizobium meliloti*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Roseburia cecicola*, *Roseburia hominis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella bongori*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Serpulina hyodysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Treponema phagedenis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Wolinella succinogenes* y *Yersinia enterocolitica*.

Las proteínas protozoarias (adyuvantes) son un ejemplo adicional de proteínas adyuvantes patógenas. Las proteínas protozoarias (adyuvantes) pueden seleccionarse en este contexto de cualquier proteína protozoaria que tenga propiedades adyuvantes, más preferiblemente del grupo consistente en, sin limitarse a, Tc52 de *Trypanosoma cruzi*, PFTG de *Trypanosoma gondii*, proteínas de choque térmico de protozoo, LelF de *Leishmania* spp., perfil similar a proteína de *Toxoplasma gondii*, etc.

Las proteínas virales (adyuvantes) son otro ejemplo de proteínas adyuvantes patógenas. En este contexto, las proteínas virales (adyuvantes) pueden seleccionarse de cualquier proteína viral que tenga propiedades adyuvantes, más preferiblemente del grupo consistente en, sin limitarse a, glicoproteína de fusión del virus

sincitial respiratorio (proteína F), proteína de envoltura del virus MMT, proteína del virus de leucemia del ratón, proteína hemaglutinina del virus del sarampión de tipo salvaje, etc.

5 Las proteínas fúngicas (adyuvantes) son también un ejemplo más de proteínas adyuvantes patógenas. En el contexto de la presente invención, las proteínas fúngicas (adyuvantes) pueden seleccionarse de cualquier proteína fúngica que tenga propiedades adyuvantes, más preferiblemente del grupo consistente en proteína inmunomoduladora fúngica (FIP; LZ-8), etc.

Finalmente, las proteínas adyuvantes pueden además seleccionarse del grupo que consiste en hemocianina de lapa californiana (KLH), OspA, etc.

10 En una realización adicional, pueden usarse proteínas terapéuticas para la terapia de reemplazo hormonal, particularmente para la terapia de la mujer en la menopausia. Estas proteínas terapéuticas se seleccionan preferiblemente de estrógenos, progesterona o progestinas, y a veces testosterona.

15 Además, las proteínas terapéuticas pueden usarse para reprogramar células somáticas en células madre pluri- u omnipotentes. Para este propósito, se describen varios factores, particularmente Oct-3/4, familia de genes Sox (Sox1, Sox2, Sox3 y Sox1 5), familia Klf (Klf1, Klf2, Klf4 y Klf5), familia Myc (c-myc , L-myc y N-myc), Nanog y LIN28.

Como se mencionó anteriormente, también los anticuerpos terapéuticos se definen aquí como proteínas terapéuticas. Estos anticuerpos terapéuticos se seleccionan preferiblemente de anticuerpos que se usan, *inter alia*, para el tratamiento de cáncer o enfermedades tumorales, por ejemplo 131I-tositumomab (linfoma folicular, linfomas de células B, leucemias), 3F8 (neuroblastoma), 8H9, abagovomab (cáncer de ovario), adecatumumab (cáncer de próstata y de mama), afutuzumab (linfoma), alacizumab pegol, Alemtuzumab (Leucemia linfocítica de células B crónica, linfoma de células T), Amatuximab, AME-133v (linfoma folicular, cáncer), AMG 102 (carcinoma de células renales avanzado), Anatumomab mafenatox (carcinoma pulmonar de células no pequeñas), Apolizumab (tumores sólidos, leucemia, linfoma no Hodgkin, Linfoma), Bavixumab (cáncer, infecciones virales), Bectumomab (Linfoma no Hodgkin), Belimumab (Linfoma no Hodgkin), Bevacizumab (Cáncer de colon, cáncer de mama, cerebro y sistema nervioso central, cáncer de pulmón, Carcinoma hepatocelular, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, sarcoma, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de estómago, carcinoma de células renales metastásicas, cáncer de riñón, glioblastoma, cáncer de hígado, retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular, degeneración macular), Bivatuzumab mertansine (carcinoma de células escamosas), Blinatumomab, Brentuximab vedotin (cánceres hematológicos), Cantuzumab (cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer pancreático, CPCNP), Cantuzumab mertansine (cáncer colorrectal), Cantuzumab ravtansine (Cánceres), Capromab pendetide (cáncer de próstata), Carlumab, Catumaxomab (cáncer de ovario, neoplasias de las trompas de Falopio, neoplasias peritoneales), Cetuximab (cáncer colorrectal metastásico y cáncer de cabeza y cuello), Citatuzumab bogatox (cáncer de ovario y otros tumores sólidos), Cixutumumab (tumores sólidos), Clivatuzumab tetraxetan (cáncer de páncreas), CNTO 328 (linfoma no Hodgkin de células B, mieloma múltiple, enfermedad de Castleman, cáncer de ovario), CNTO 95 (melanoma), Conatumumab, Dacetuzumab (cánceres hematológicos), Dalotuzumab, Denosumab (mieloma, tumor de células gigantes de hueso, cáncer de mama) , Cáncer de próstata, osteoporosis), Detumomab (linfoma), Drozitumab, Ecomeximab (melanoma maligno), Edrecolomab (carcinoma colorrectal), Elotuzumab (mieloma múltiple), Elsilimomab, Enavatuzumab, Ensituximab, Epratuzumab (Enfermedades autoinmunes, Lupus eritematoso sistémico, Linfoma no Hodgkin, Leucemia), Ertumaxomab (Cáncer de mama), Ertumaxomab (Cáncer de mama), Etaracizumab (Melanoma, Cáncer de próstata, Cáncer de mama, Cáncer de ovario), Farletuzumab (cáncer de ovario), FBTA05 (leucemia mielocítica crónica), Ficlaturuzumab (cáncer), Figitumumab (carcinoma adrenocortical, carcinoma pulmonar de células no pequeñas), Flanvotumab (Melanoma), Galiximab (linfoma de células B), Galiximab (linfoma no Hodgkin), Ganitumab, GC1008 (Carcinoma avanzado de células renales; Melanoma maligno, fibrosis pulmonar), Gemtuzumab (leucemia), Gemtuzumab ozogamicina (leucemia mielógena aguda), Girentuximab (carcinoma de células renales de células claras), Glebatumumab vedotin (melanoma, cáncer de mama), GS6624 (fibrosis ideopática pulmonar y tumores sólidos), HuC242-DM4 (cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de páncreas), HuHMFGI (cáncer de mama), HuN901 -DM1 (mieloma), Ibritumomab (linfoma recurrente o refractario de células de bajo grado, foliculares o transformadas de linfoma no Hodgkin (LNH)), Icrucumab, ID09C3 (linfoma No-Hodgkin), Indatuximab ravtansine, Inotuzumab ozogamicin, Intetumumab (tumores sólidos (cáncer de próstata, melanoma)), Ipilimumab (Sarcoma, Melanoma, cáncer de pulmón, de ovario, leucemia, Linfoma, tumores del cerebro y del sistema nervioso central, cáncer testicular, de próstata, de páncreas, de mama), Iratumumab (linfoma de Hodgkin), Labetuzumab (Cáncer colorrectal), Lexatumumab, Lintuzumab, Lorvotuzumab mertansine, Lucatumumab (Mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, Linfoma Hodgkin), Lumiliximab (leucemia linfocítica crónica), Mapatumumab (cáncer de colon, mieloma), matuzumab (cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago), MDX-060 (linfoma de Hodgkin, linfoma, linfoma), MEDI 522 (tumores sólidos, leucemia Linfoma, cáncer del intestino delgado, melanoma), Mitumomab (carcinoma de

pulmón de células pequeñas), Mogamulizumab, MORab-003 (cáncer de ovario, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer peritoneal), MORab-009 (cáncer de páncreas, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, Cáncer de la trompa de Falopio, Cáncer de la cavidad peritoneal), Moxetumomab pasudotox, MT103 (Linfoma no Hodgkin), Nacolomab tafenatox (Cáncer colorrectal),
 5 Naptumomab estafenatox (Carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales), Narnatumab, Necitumumab (carcinoma de pulmón no de células pequeñas), Nimotuzumab (carcinoma de células escamosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer nasofaríngeo, glioma), Nimotuzumab (carcinomas de células escamosas, glioma, tumores sólidos, cáncer de pulmón), Olaratumab, Onartuzumab (cáncer), Oportuzumab monatox Oregovom ab (cáncer de ovario), Oregovomab (cáncer de ovario, cáncer de trompa de Falopio, cáncer de la cavidad peritoneal), PAM4 (cáncer de páncreas), Panitumumab (cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama; Cáncer de vejiga; Cáncer de ovario), Patritumab, Pentumomab, Pertuzumab (cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata), Pritumumab (cáncer de cerebro), Racotumomab, Radretumab, Ramucirumab (tumores sólidos), Rilotumumab (tumores sólidos), Rituximab (urticaria, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, encefalitis focal crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma, leucemia linfocítica crónica), Robatumumab, Samalizumab, SGN-30 (linfoma de Hodgkin, linfoma), SGN-40 (linfoma no Hodgkin, mieloma, leucemia, leucemia linfocítica crónica), Sibrotuzumab, Siltuximab, Tabalumab (cáncer de células B), Tacatuzumab tetraxetan, Taplitumomab paptox, Tenatumomab, Teprotumumab (tumores hematológicos), TGN1412 (leucemia linfocítica crónica, artritis reumatoide), Ticilimumab (= tremelimumab), Tigatuzumab, TNX-650 (linfoma de Hodgkin), Tositumomab (linfoma folicular, linfoma de células B, leucemia, mieloma), Trastuzumab (Cáncer de mama, Cáncer de endometrio, Tumores sólidos), TRBS07 (Melanoma), Tremelimumab, TRU-016 (Leucemia linfocítica crónica), TRU-016 (Linfoma no Hodgkin), Tucotuzumab Celmoleukin, Ublituximab, Urelumab, Veltuzum (IMMU-106) (Linfoma no Hodgkin), Volociximab (Carcinoma de células renales, Cáncer de páncreas, Melanoma), Votumumab (tumores colorrectales), WX-G250 (Carcinoma de células renales), Zalutumabab (Cáncer de cabeza y cuello, Cáncer de células escamosas) y Zanolimumab (linfoma de células T); anticuerpos, que se utilizan, entre otros, para el tratamiento de trastornos inmunes, por ejemplo Efalizumab (Psoriasis), Epratuzumab (Enfermedades autoinmunes, Lupus eritematoso sistémico, Linfoma no Hodgkin, Leucemia), Etrolizumab (enfermedad inflamatoria de la glándula), Fontolizumab (enfermedad de Crohn), Ixekizumab (enfermedad autoinmunitaria), Mepolizumab (Síndrome de hipereosinofilia, asma, Gastroenteritis eosinofílica, Síndrome de Churg-Strauss, Esofagitis eosinofílica), Milatuzumab (mieloma múltiple y otras neoplasias malignas hematológicas), Inmunoglobulinas agrupadas (Inmunodeficiencias primarias), Priliximab (enfermedad de Crohn's, esclerosis múltiple), Rituximab (Urticaria, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, encefalitis focal crónica, Linfoma no Hodgkin, Linfoma, Leucemia linfocítica crónica), Rontalizumab (lupus eritematoso sistémico), Ruplizumab (enfermedades reumáticas), Sarilumab (artritis reumatoide, espondilitis anquilosante), Vedolizumab (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), Visilizumab (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), Reslizumab (inflamaciones de vías aéreas, de la piel y tracto gastrointestinal), Adalimumab (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica), Aselizumab (pacientes con lesiones graves), Atinumab (tratamiento de sistemas neurológicos), Atlizumab (artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil sistémica), Bertilimumab (trastornos alérgicos severos), Besilesomab (lesiones inflamatorias y metástasis), BMS-945429, ALD518 (cáncer y artritis reumatoide), Briakinumab (psoriasis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino, esclerosis múltiple), Brodalumab (enfermedades inflamatorias), Canakinumab (Síndromes periódicos asociados a criopirina (CAPS), artritis reumatoide, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), Certolizumab pegol (enfermedad de Crohn), Eriizumab (ataque cardíaco, accidente cerebrovascular, shock traumático), Fezakinumab (artritis reumatoide, psoriasis), Golimumab (artritis reumatoide, artritis reumatoide, artritis reumatoide) espondilitis anquilosante), Gomiliximab (asma alérgica), Infliximab (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, psoriasis en placas, Enfermedad de Bechterew, Colitis ulcerosa), Mavrilimumab (artritis reumatoide), Natalizumab (esclerosis múltiple), Ocrelizumab (esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso, cáncer hematológico), Odulimumab (prevención de rechazo en trasplante de órganos, enfermedades inmunes), Ofatumumab (leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin folicular, linfoma de células B, artritis reumatoide, esclerosis múltiple recurrente remitente, linfoma, leucemia linfocítica crónica de células B), Ozoralizumab (inflamación), Pexelizumab (reducción de efectos secundarios de cirugía cardíaca), Rovelizumab (shock hemorrágico), SBI-087 (Artritis reumatoide), SBI-087 (Lupus eritematoso sistémico), Secukinumab (uveítis, artritis reumatoide, psoriasis), Sirukumab (artritis reumatoide), Talizumab (reacción alérgica), Tocilizumab (artritis reumatoide, artritis ideopática juvenil sistémica, Enfermedad de Castleman), Toralizumab (artritis reumatoide, lupus nefritis), TRU-015 (artritis reumatoide), TRU-016 (enfermedad autoinmune e inflamación), Ustekinumab (esclerosis múltiple, psoriasis, artritis psoriásica), Ustekinumab (bloqueador IL-12/IL-23) (psoriasis de placas, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, sarcoidosis, esta última versus), Vepalimumab (inflamación), Zolimomab aritox (lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto contra huésped), Sifalimumab (SLE, dermatomiositis, polimiositis), Lumiliximab (Alergias) y Rho (D) Inmunoglobulina (enfermedad de Rhesus); o se seleccionan de anticuerpos utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, por ejemplo Afelimomab (sepsis), CR6261 (enfermedad infecciosa /gripe A), Edobacomab (sepsis causada por bacterias gramnegativas), Efungumab (infección invasiva por Candida), Exbivirumab (hepatitis B), Felvizumab (infección respiratoria del virus sincitial), Foravirumab (rabia (profilaxis), Ibalizumab (infección por VIH), Libivirumab (hepatitis B), Motavizumab (virus sincitial respiratorio (prevención)),

5 Nebacumab (sepsis), Tuvirumab (hepatitis crónica B), Urtoxazumab (diarrea causada por E. coli), Baviximab (infecciones víricas diversas), Pagibaximab (sepsis (por ejemplo, Staphylococcus), Palivizumab (prevención de la infección por virus sincitial respiratorio en pacientes pediátricos de alto riesgo), Panobacumab (infección por Pseudomonas aeruginosa), PRO 140 (infección por VIH), Rafivirumab (rabia (profilaxis)), Raxibacumab (anthrax (profilaxis y tratamiento), Regavirumab (infección por citomegalovirus), Sevirumab (infección por citomegalovirus), Suvizumab (infecciones víricas) y Tefibazumab (infección por Staphylococcus aureus);

10 anticuerpos, que se utilizan, entre otros, para el tratamiento de trastornos sanguíneos, por ejemplo Abciximab (intervención coronaria percutánea), Atorolimumab (enfermedad hemolítica del recién nacido), Eculizumab (hemoglobinuria paroxística nocturna), Mepolizumab (síndrome de hipereosinofilia, asma, gastroenteritis eosinofílica, Síndrome de Churg-Strauss, esofagitis eosinofílica) y Milatuzumab (mieloma múltiple y otras malignidades hematológicas); anticuerpos que se utilizan, entre otras, para la inmunorregulación, por ejemplo Globulina antitimocítica (rechazo agudo de trasplante renal, anemia aplásica), Basiliximab (profilaxis contra el rechazo de aloinjerto en pacientes con trasplante renal que reciben un régimen inmunosupresor que incluye ciclosporina y corticosteroides), Cedelizumab (prevención rechazo en trasplantes de órganos, tratamiento de enfermedades autoinmunes), Daclizumab (profilaxis contra rechazo agudo de aloinjerto en pacientes que reciben trasplantes renales, esclerosis múltiple), Gavilimomab (enfermedad injerto versus huésped), Inolimomab (enfermedad injerto versus huésped), Muromonab-CD3 (prevención de rechazos de trasplantes de órganos), Muromonab-CD3 (rechazo agudo de aloinjerto renal o esteroides, rechazo de aloinjerto hepático o cardíaco resistente), Odulimomab (prevención de rechazos de trasplantes de órganos, enfermedades inmunológicas) y Siplizumab (psoriasis, enfermedad injerto versus huésped (prevención));

anticuerpos utilizados para el tratamiento de la diabetes, por ejemplo Gevokizumab (diabetes), Otelixizumab (diabetes mellitus tipo 1) y Teplizumab (diabetes mellitus tipo 1);

anticuerpos que se utilizan para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo Bapineuzumab, Crenezumab, Gantenerumab, Ponezumab, R1450 y Solanezumab;

25 anticuerpos que se utilizan para el tratamiento del asma, por ejemplo Benralizumab, Enokizumab, Keliximab, Lebrizumab, Omalizumab, Oxelumab, Pascolizumab y Tralokinumab;

30 y anticuerpos que se utilizan para el tratamiento de diversos trastornos, por ejemplo Blosozumab (osteoporosis), CaroRx (caries dental), Fresolimumab (fibrosis pulmonar idiopática, glomeruloesclerosis focal segmentaria, cáncer), Fulranumab (dolor), Romosozumab (osteoporosis), Stamulumab (distrofia muscular), Tanezumab (dolor) y Ranibizumab (degeneración macular neovascular relacionada con la edad).

35 La región codificante del ARN modificado de acuerdo con la presente invención puede aparecer como un ARN mono, di o incluso multicistrónico, es decir, un ARN que transporta las secuencias codificantes de una, dos o más proteínas o péptidos. Dichas secuencias de codificación en los ARN di- o incluso multicistrónicos pueden estar separadas por al menos una secuencia de sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), por ejemplo como se describe aquí o mediante péptidos señal que inducen la escisión del polipéptido resultante que comprende varias proteínas o péptidos.

Composición farmacéutica

40 Adicionalmente, de acuerdo con otro aspecto, la presente invención también se refiere al uso del ARN modificado como se define aquí o de una composición que comprende una pluralidad de moléculas de ARN modificado como se define aquí para la preparación de una composición farmacéutica para aumentar la expresión de péptido o proteína codificados, en particular para uso en terapia génica o vacunación genética, por ejemplo para tratar una enfermedad, preferiblemente como se define aquí, por ejemplo para aplicar o administrar el ARN modificado tal como se define aquí o una composición que comprende una pluralidad de moléculas de ARN modificado tal como se define aquí a una célula (por ejemplo una célula huésped de expresión o una célula somática), un tejido o un organismo, preferiblemente en forma desnuda o complejada o como una composición farmacéutica como se describe aquí mediante inyección neumática.

50 Por consiguiente, en un aspecto particular preferente, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un ácido ARN modificado como se define aquí o una composición de la invención que comprende una pluralidad de ARN modificados como se definen aquí y opcionalmente un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración mediante inyección neumática. Dicho ARN modificado comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos una proteína o péptido terapéutico y además comprende una modificación del contenido de G/C en su región codificante en comparación con la región codificante respectiva de tipo salvaje, donde la secuencia de aminoácidos traducida de la región codificante de tipo salvaje se mantiene.

Como un primer ingrediente, la composición farmacéutica de la invención comprende al menos un ácido nucleico modificado como se define aquí.

5 Como un segundo ingrediente, la composición farmacéutica opcionalmente puede comprender al menos un componente farmacéuticamente activo adicional. Un componente farmacéuticamente activo a este respecto es un compuesto que tiene un efecto terapéutico de sanar, disminuir o evitar una indicación o enfermedad particular como se menciona aquí. Estos compuestos incluyen, sin implicar ninguna limitación, péptidos o proteínas, de preferencia como se definen aquí, ácidos nucleicos, preferentemente tal como se definen aquí, compuestos orgánicos o inorgánicos de bajo peso molecular (terapéuticamente activos) (peso molecular inferior a 5.000, con preferencia inferior a 1.000), azúcares, antígenos o anticuerpos, de preferencia como se definen aquí, agentes terapéuticos ya conocidos en la técnica anterior, células antigénicas, fragmentos celulares antigénicos, fracciones celulares; componentes de la pared celular (por ejemplo polisacáridos), patógenos modificados, atenuados o desactivados (por ejemplo químicamente o por irradiación) (virus, bacterias, etc.), adyuvantes, de preferencia como se definen aquí, etc.

15 Además, la composición farmacéutica puede comprender un portador y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. En el contexto de la presente invención, un portador farmacéuticamente aceptable típicamente incluye una base líquida o no líquida de la composición farmacéutica inventiva. El vehículo típicamente será agua libre de pirógenos, solución salina isotónica o soluciones tampón (acuosas), por ejemplo fosfato, citrato, etc., soluciones tampón. El tampón de inyección puede ser hipertónico, isotónico o hipotónico en relación al medio de referencia específico, es decir, el tampón puede tener mayor, idéntico o menor contenido en sal en relación al medio de referencia específico, donde preferentemente estas concentraciones de sales mencionadas anteriormente se pueden utilizar pero sin conducir a daño celular debido a ósmosis u otros efectos de la concentración. Medios de referencia son, por ejemplo, líquidos que se emplean en métodos "in vivo", como sangre, linfa, líquidos citosólicos u otros líquidos corporales, o por ejemplo líquidos que se puedan utilizar como medios de referencia en métodos "in vitro", tales como tampones o líquidos comunes. Estos tampones o líquidos comunes son conocidos por el experto. En particular se prefiere como base líquida una solución Ringer-Lactato.

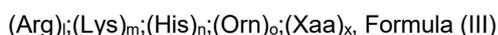
20 Sin embargo, se pueden utilizar uno o más materiales de carga o diluyentes sólidos o líquidos compatibles o compuestos encapsulantes para la composición farmacéutica, que sean adecuados para la administración a un paciente a tratar. El término "compatible" tal como se emplea aquí significa que estos constituyentes de la composición farmacéutica son capaces de mezclarse con el ARN modificado como se define aquí de forma que no existe una interacción que pueda reducir sustancialmente la efectividad farmacéutica de la composición farmacéutica bajo las condiciones típicas de uso.

Complejación

35 Además, la composición farmacéutica puede comprender un portador para el ARN modificado. Dicho portador puede ser adecuado para facilitar la disolución en líquidos fisiológicamente aceptables, el transporte y la captación celular de la molécula de ARN modificada farmacéuticamente activa. Por consiguiente, dicho portador puede ser un componente adecuado para el depósito y la administración de un ARN modificado de acuerdo con la invención. Tales componentes pueden ser, por ejemplo, vehículos o compuestos catiónicos o policatiónicos, que pueden servir como agente de transfección o complejación.

40 Agentes de transfección o complejación particularmente preferentes en este contexto son compuestos catiónicos o policatiónicos, incluyendo protamina, nucleolina, espermina o espermidina, u otros péptidos o proteínas catiónicos, tales como poli-L-lisina (PLL), poli-arginina, polipéptidos básicos, péptidos de penetración celular (CPP), incluyendo péptidos de unión a VIH, VIH-1 Tat (VIH), péptidos derivados de Tat, Penetratina, péptidos derivados o análogos de VP22 (Herpes simplex), MAP, KALA o dominios para transducción proteínica (PTD), PpT620, péptidos ricos en prolina, péptidos ricos en arginina, péptidos ricos en lisina, MPG-péptidos, Pep-1, L-oligómeros, péptidos de calcitonina, péptidos derivados de Antennapedia (en particular de *Drosophila antennapedia*), pAntp, plsl, FGF, Lactoferrina, Transportana, Buforin-2, Bac715-24, SynB, SynB(1), pVEC, péptidos derivados de hCT, SAP o histonas.

45 Además, dichos compuestos o vehículos catiónicos o policatiónicos pueden ser péptidos o proteínas catiónicos o policatiónicos, que preferiblemente comprenden o están modificados adicionalmente para comprender al menos un resto -SH. Preferiblemente, un portador catiónico o policatiónico se selecciona de péptidos catiónicos que tienen la siguiente fórmula suma (III):



donde $l + m + n + o + x = 3-300$, y l, m, n u o independientemente entre si puede ser cualquier número

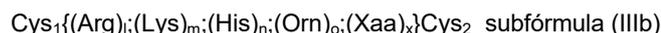
seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 y 91-100, con la condición de que el contenido total de Arg (arginina), Lys (lisina), His (histidina) y Orn (ornitina) represente al menos el 10% de todos los aminoácidos del oligopéptido; y Xaa puede ser cualquier aminoácido seleccionado de aminoácidos naturales (= de origen natural) o no naturales excepto

5 Arg, Lys, His u Orn; y x es cualquier número seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90 y 91-100, con la condición de que el contenido total de Xaa no exceda el 90% de todos los aminoácidos del oligopéptido. Cualquiera de los aminoácidos Arg, Lys, His, Orn y Xaa puede colocarse en cualquier lugar del péptido. En este contexto, se prefieren particularmente péptidos o proteínas catiónicas en el intervalo de 7-30 aminoácidos.

10 Adicionalmente, las proteínas o péptidos catiónicos o policatiónicos definidos por la fórmula $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$ (Fórmula (III)) mostrada anteriormente y que comprenden o adicionalmente se modifican para comprender al menos una porción -SH, pueden seleccionarse de, sin limitarse a, la siguiente subfórmula (IIIa):



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



Donde la fórmula empírica $\{(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x\}$ (fórmula (IV)) es como se define aquí y forma un núcleo de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la fórmula (semipéptica) (IV) y donde Cys₁ y Cys₂ son cisteínas proximales a, o terminales a $(Arg)_i;(Lys)_m;(His)_n;(Orn)_o;(Xaa)_x$.

25 Compuestos catiónicos o policatiónicos preferentes adicionales que se pueden utilizar como agente de transfección o complejación pueden incluir polisacáridos catiónicos, por ejemplo quitosano, polibreno, polímeros catiónicos, por ejemplo polietilenimina (PEI), lípidos catiónicos, por ejemplo DOTMA: cloruro de [1-(2,3-sioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DMRIE, di-C14-amidina, DOTIM, SAINT, DC-Chol, BGTC, CTAP, DOPC, DODAP, DOPE: Dioleil-fosfatidiletanol-amina, DOSPA, DODAB, DOIC, DMEPC, DOGS:

30 Dioctadecilamidoglicilespermina, DIMRI: bromuro de dimiristil-oxipropildimetilhidroxietilamonio, DOTAP: dioleiloxi-3-(trimetilamonio)-propano DC-6-14: cloruro de O,O-ditetradecanoil-N-(α -trimetilamonoacetil)-dietanolamina, CLIP1: cloruro de rac-[(2,3-dioctadeciloxipropil)(2-hidroxietil)]-dimetilamonio, CLIP6: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oximetiloxi)etil]-trimetilamonio, CLIP9: rac-[2(2,3-dihexadeciloxipropil-oxisucciniloxi)etil]-trimetilamonio, oligofectamina, o polímeros catiónicos o policatiónicos, por ejemplo poliaminoácidos

35 modificados, tales como polímeros de β -aminoácidos o poliamidas inversas, etc., polietilenos modificados, como PVP (bromuro de poli(N-etil-4-vinilpiridinio)), etc., acrilatos modificados, como pDMAEMA (metilacrilato de poli(dimetilaminoetil)), etc., amidoaminas modificadas como pAMAM (poli(amidoamina)), etc., polibeta-aminoéster modificado (PBAE), como polímeros de 1,4-butandiolacrilato-co-5-amino-1-pentanol modificados en el extremo de diamina, etc., dendrímeros, como dendrímeros de polipropilamina o dendrímeros a base de pAMAM, etc., poliiminas, como PEI: poli(etilenimina), poli(propilenimina), etc., polialilamina, polímeros basados en una estructura de azúcar, como polímeros basados en ciclodextrina, dextrano, quitosano, etc., polímeros basados en una estructura silano, como copolímeros PMOXA-PDMS, etc., polímeros en bloque consistentes en una combinación de uno o más bloques catiónicos (por ejemplo seleccionados de un polímero catiónico, como se mencionó anteriormente) y uno o más bloques hidrofílicos o hidrofóbicos (por ejemplo polietilenglicol);

40 etc.

45

En este contexto, es particular preferente que la molécula de ARN modificado esté complejada al menos parcialmente con un compuesto catiónico o policatiónico, preferentemente proteínas o péptidos catiónicos. Parcialmente significa que sólo una parte de la molécula de ARN modificado está complejado con un compuesto catiónico o policatiónico y que el resto de la molécula de ARN modificado está en forma no complejada ("libre").

50 Preferentemente, la proporción ARN modificado complejado:ARN modificado libre se selecciona en un rango de aproximadamente 5:1 (p/p) a aproximadamente de 1:10 (p/p), con mayor preferencia de aproximadamente 4:1 (p/p) a aproximadamente 1:8 (p/p), incluso con mayor preferencia de aproximadamente 3:1 (p/p) a aproximadamente 1:5 (p/p) o 1:3 (p/p) y con la máxima preferencia la proporción ácido nucleico complejado:ácido nucleico libre se selecciona de una proporción aproximadamente 1:1 (p/p).

55 Según una realización específica, la composición farmacéutica puede comprender un adyuvante. En este

- contexto, un adyuvante puede entenderse como cualquier compuesto adecuado para iniciar o aumentar una respuesta inmune del sistema inmune innato, es decir, una respuesta inmune no específica. En otras palabras, cuando se administra, la composición farmacéutica de la invención produce preferiblemente una respuesta inmune innata debido al adyuvante opcionalmente contenido en la misma. Preferiblemente, dicho adyuvante puede seleccionarse de un adyuvante conocido por el experto y adecuado para el presente caso, es decir, que soporta la inducción de una respuesta inmune innata en un mamífero, por ejemplo una proteína adyuvante como se define anteriormente o un adyuvante como se define a continuación.
- 5
- Particularmente preferidos como adyuvantes adecuados para el depósito y la administración son compuestos catiónicos o policatiónicos como se han definido anteriormente para el ARN modificado como vehículo, agente de transfección o complejación.
- 10
- Otros aditivos que se pueden incluir en la composición farmacéutica inventiva son emulsificantes, por ejemplo Tween®; agentes humectantes, por ejemplo laurilsulfato de sodio; agentes colorantes; agentes saborizantes, portadores farmacéuticos; agentes formadores de comprimidos; estabilizantes; antioxidantes; conservantes.
- 15
- La composición farmacéutica también puede contener cualquier compuesto adicional que se sabe que es inmunoestimulador debido a su afinidad de unión (como ligando) a los receptores similares a Toll humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, o debido a su afinidad de unión (como ligandos) a los receptores similares a Toll murinos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, TLR12 o TLR13.
- 20
- La composición farmacéutica puede administrarse preferiblemente vía subcutánea, intramuscular o intradérmica por inyección neumática. Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas pueden ser una suspensión acuosa u oleosa. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión.
- 25
- La composición farmacéutica comprende típicamente una "cantidad segura y efectiva" de los componentes de la composición farmacéutica inventiva, en particular del ARN modificado como se define aquí. Como se utiliza aquí, una "cantidad segura y efectiva" significa una cantidad del ARN modificado como se define aquí que como tal es suficiente para inducir una modificación positiva de una enfermedad o trastorno como se define aquí. Al mismo tiempo, sin embargo, una "cantidad segura y efectiva" es lo suficientemente pequeña como para evitar efectos secundarios serios y para permitir una relación sensible entre la ventaja y riesgo. La determinación de estos límites está típicamente dentro del alcance del juicio médico sensato.
- 30
- La presente invención proporciona además varias aplicaciones y usos del ARN modificado tal como se define aquí, de la composición que comprende una pluralidad de moléculas de ARN modificado como se definen aquí, de la composición farmacéutica que comprende el ARN modificado tal como se define aquí o de kits que lo comprenden.
- 35
- De acuerdo con un aspecto específico, la presente invención se dirige al primer uso médico del ARN modificado de la invención como se define aquí o de la composición de la invención que comprende una pluralidad de moléculas de ARN de la invención como se define en aquí como medicamento, particularmente en la terapia génica o vacunación genética, preferiblemente para el tratamiento de enfermedades como las aquí definidas.
- 40
- De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se dirige al segundo uso médico del ARN modificado inventivo como se define aquí o de la composición inventiva que comprende una pluralidad de moléculas de ARN modificado inventivas como se definen aquí para el tratamiento de enfermedades como se definen aquí, preferentemente para el uso del ARN modificado como se define aquí, de la composición inventiva que comprende una pluralidad de moléculas de ARN modificado como se definen aquí, de una composición farmacéutica que la comprende o de kits que la comprenden para la preparación de un medicamento para la profilaxis, tratamiento y/o mejora de enfermedades cancerosas o tumorales como se definen aquí.
- 45
- Preferentemente, la composición farmacéutica se utiliza para ser administrada a un paciente en necesidad de la misma para este propósito.
- 50
- Preferentemente, las enfermedades como se mencionan aquí se seleccionan enfermedades infecciosas, neoplasias (por ejemplo cáncer o enfermedades tumorales), enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos, enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas, enfermedades del sistema nervioso, enfermedades del sistema circulatorio, enfermedades del sistema respiratorio, enfermedades del sistema nervioso, del sistema digestivo, enfermedades de la piel y tejido subcutáneo, enfermedades del sistema musculoesquelético y tejido conectivo y enfermedades del sistema genitourinario.

Enfermedades

Enfermedades infecciosas:

Preferentemente, las enfermedades infecciosas como se mencionan aquí se seleccionan de enfermedades infecciosas virales, bacterianas, protozoológicas y priónicas. Estas enfermedades infecciosas típicamente se seleccionan de la lista consistente en infecciones por *Acinetobacter*, enfermedad africana del sueño (tripanosomiasis africana), SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), Amoebiasis, Anaplasmosis, Anthrax, Appendicitis, infecciones por *Arcanobacterium haemolyticum*, fiebre hemorragia Argentina, Ascariasis, Aspergillosis, infecciones por Astrovirus, pie de atleta, Babesiosis, infecciones por *Bacillus cereus*, meningitis bacteriana, neumonía bacteriana, vaginosis bacteriana (BV), infecciones *Bacteroides*, Balantidiasis, infecciones por *Baylisascaris*, Bilharziosis, infecciones por virus BK, piedra negra, infecciones por *Blastocystis hominis*, Blastomycosis, fiebre hemorrágica boliviana, infecciones por *Borrelia* (Borreliosis), Botulismo (y botulismo infantil), cestodo bovino, fiebre hemorrágica brasileña, Brucellosis, infecciones por *Burkholderia*, úlcera de Buruli, infecciones por *Calicivirus* (Norovirus y Sapovirus), *Campylobacteriosis*, Candidiasis (Candidosis), infecciones por cestodo canino, enfermedad por arañazo de gato, enfermedad de Chagas (tripanosomiasis Americana), Chancroide, varicela, infecciones por clamida, infecciones por *Chlamydia trachomatis*, infecciones por *Chlamydomydia pneumoniae*, Cólera, *Chromoblastomycosis*, bubón climático, Clonorchiasis, infecciones por *Clostridium difficile*, *Coccidioidomycosis*, catarro, fiebre por garrapatas de Colorado (CTF), resfriado común (rinofaringitis viral aguda; coryza agudo), *Condyloma acuminata*, conjuntivitis, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), fiebre hemorrágica de Crimean-Congo (CCHF), *Cryptococcosis*, *Cryptosporidiosis*, larva migran cutánea (CLM), *Leishmaniasis cutánea*, *Ciclosporiasis*, *Cisticercosis*, infecciones por citomegalovirus, fiebre del dengue, dermatofitosis, *Dientamoebiasis*, *Difteria*, *Difilobotriasis*, *Donovanosis*, *Dracunculiasis*, meningoencefalitis de verano temprano (FSME), fiebre hemorrágica por Ebola, *Echinococcosis*, *Ehrlichiosis*, *Enterobiasis* (infecciones por Pinworm), infecciones por *Enterococcus*, infecciones por *Enterovirus*, tífus epidémica, *Epiglottitis*, *Mononucleosis infecciosa* por el virus de Epstein-Barr, Eritema infeccioso (enfermedad Fifth), *Exanthem subitum*, *Fasciolopsiasis*, *Fasciolosis*, insomnio familiar fatal (FFI), enfermedad de Fifth, *Filariasis*, envenenamiento por pescado (Ciguatera), cestodo de pescado, gripe, envenenamiento alimentario por *Clostridium perfringens*, cestodo de zorro, infecciones amebianas de crecimiento libre, infecciones por *Fusobacterium*, gangrena gaseosa, *Geotricosis*, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), *Giardiasis*, *Glanders*, *Gnathostomiasis*, *Gonorrhea*, *Granuloma inguinal* (Donovanosis), infecciones por estreptococos del Grupo A, infecciones por estreptococos Grupo B, infecciones por *Haemophilus influenzae*, enfermedad de manos, pies y boca (HFMD), síndrome pulmonar por *Hantavirus* (HPS), infecciones por *Helicobacter pylori*, síndrome hemolítico-urémico (HUS), Fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS), infecciones por *Henipavirus*, *Hepatitis A*, *Hepatitis B*, *Hepatitis C*, *Hepatitis D*, *Hepatitis E*, *Herpes simplex*, *Herpes simplex tipo I*, *Herpes simplex tipo II*, *Herpes zoster*, *Histoplasmosis*, verrugas huecas, infecciones por *Anquilostoma*, infecciones por *Bocavirus humano*, *erliquiosis ewingii humana*, *anaplasmosis granulocítica humana* (HGA), infecciones por *metapneumovirus humano*, *erliquiosis monocítico humano*, infecciones por *papilomavirus Humano* (HPV), infecciones por virus de *parainfluenza humana*, *Hymenolepiasis*, *Influenza*, *Isosporiasis*, *encefalitis Japonesa*, enfermedad de Kawasaki, *Keratitits*, infecciones por *Kingella kingae*, *Kuru*, *Lambliasis* (*Giardiasis*), fiebre de Lassa, *Legionellosis* (enfermedad del Legionario, fiebre Pontiac), *Leishmaniasis*, *Leprosia*, *Leptospirosis*, piojo, *Listeriosis*, *Lyme borreliosis*, enfermedad de Lyme, *filariasis Linfática* (*Elefantiasis*), *coriomeningitis linfocítica*, *Malaria*, fiebre hemorrágica por Marburg (MHF), virus de Marburg, *Sarampión*, *Melioidosis* (enfermedad de Whitmore), *Meningitis*, enfermedad *Meningococcal*, *Metagonimiasis*, *Microsporidiosis*, cestodo miniatura, *miscarriage* (inflamación de la próstata), *Molluscum contagiosum* (MC), *Mononucleosis*, *paperas*, tífus murino (tífus endémico), *Mycetoma*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Myiasis*, *dermatitis por pañal desechable/pañal de tela*, *conjuntivitis neonatal* (*Ophthalmia neonatorum*), *sepsis neonatal* (*Chorioamnionitis*), *Nocardiosis*, *Noma*, infecciones por virus *Norwalk*, *Oncocercosis* (ceguera de los ríos), *Osteomielitis*, *Otitis media*, *Paracoccidioidomycosis* (blastomycosis de Sudamérica), *Paragonimiasis*, *Paratyphus*, *Pasteurellosis*, *Pediculosis capitis* (Head lice), *Pediculosis corporis* (piojos del cuerpo), *Pediculosis pubis* (piojo púbico, liendre), enfermedad inflamatoria pélvica (PID), *Pertussis* (tosferina), fiebre glandular de Pfeiffer, plaga, infecciones por *pneumococcus*, *Pneumocystis pneumonia* (PCP), *Pneumonia*, *Polio* (cojera infantil), *Poliomielitis*, cestodo porcino, infecciones por *Prevotella*, *meningoencefalitis amebiana primaria* (PAM), *leucoencefalopatía multifocal progresiva*, *Pseudocroup*, *Psittacosis*, fiebre Q, fiebre de conejo, *Rabia*, fiebre por mordida de rata, síndrome de Reiter, infección por virus sincitial respiratorio (RSV), *Rhinosporidiosis*, infecciones por *Rinovirus*, infecciones por *Rickettsial*, *Rickettsialpox*, fiebre amarilla (RVF), fiebre manchada de las montañas rocosas (RMSF), infecciones por *Rotavirus*, *Rubeola*, *Salmonella paratyphus*, *Salmonella typhus*, *Salmonellosis*, SARS (Síndrome Respiratorio Agudo Grave) sarna, *escarlatina*, *Esquistosomiasis* (Bilharziosis), *Scrub typhus*, *Sepsis*, *Shigellosis* (disintiera basilar), *Shingles*, *Smallpox* (Viruela), *chancro suave*, *Sporotricosis*, envenenamiento alimentario por *estafilococos*, infecciones por *estafilococos*, *Strongyloidiasis*, *sífilis*, *Taeniasis*, *Tétanos*, fiebre de los tres días, *encefalitis portada por garrapatas*, *Tinea barbae* (picazón de Barber), *Tiña del cuero cabelludo* (Tiña del cuerpo), *Tiña corporis* (tiña del cuerpo), *Tiña cruris* (picazón Jock), *Tiña de la mano* (Tiña de la mano), *Tiña nigra*, *Tiña pedis* (pie de atleta), *Tiña unguium* (Onicomycosis), *Tiña versicolor* (*Pityriasis versicolor*), *Toxocariasis* (*Larva Migrans Ocular* (OLM) y *Larva Migrans Visceral* (VLM)), *Toxoplasmosis*, *Triquinosis*, *Tricomoniasis*, *Tricuriasis* (infecciones del intestino grueso), *Tripper*, *Trypanosomiasis* (enfermedad del sueño),

enfermedad Tsutsugamushi, Tuberculosis, Tularemia, Tifo, fiebre por tipfo, infecciones por Ureaplasma urealyticum, Vaginitis (Colpitis), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD, nvCJD), encefalitis equina Venezolana, fiebre hemorrágica Venezolana, neumonía viral, Leishmaniosis visceral, verrugas, Fiebre del Nilo occidental, encefalitis equina occidental, piedra blanca (Tiña blanca), tosferina, puntos por hongos de levadura, fiebre amarilla, infecciones por Yersinia pseudotuberculosis, Yersiniosis y Zigomicosis.

Enfermedades cancerosas:

Preferiblemente, las enfermedades como se mencionan aquí se seleccionan de enfermedades tumorales o tumorales que incluyen preferiblemente, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con SIDA, linfoma relacionados con SIDA, cáncer anal, cáncer del apéndice, Astrocitoma, Carcinoma de células basales, Cáncer de conducto biliar, Cáncer de vejiga, Cáncer óseo, Osteosarcoma/Histiocitoma fibroso maligno, Glioma del tronco encefálico, Tumor cerebral, Astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebelar/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, rutas visuales y glioma hipotalámico, Cáncer de mama, Adenomas bronquiales/carcinoides, linfoma de Burkitt, Tumor carcinoide infantil, Tumor carcinoide gastrointestinal, Carcinoma primario desconocido, Linfoma del sistema nervioso central primario, astrocitoma cerebelar infantil, astrocitoma Cerebelar infantil/Glioma maligno, Cáncer cervical, cánceres infantiles, Leucemia linfocítica crónica, Leucemia mielógena crónica, Trastornos mieloproliferativos crónicos, Cáncer de colon, Linfoma de células T cutáneo, Tumor de células redondas pequeñas desmoplásicas, Cáncer del endometrio, Ependimoma, Cáncer de esófago, sarcoma de Ewing en la familia de tumores de Ewing, Tumor de células germinales extracraneales infantiles, Tumor de células germinales Extragonadal, Cáncer del conducto biliar extrahepático, Melanoma intraocular, Retinoblastoma, Cáncer de la vesícula biliar, Cáncer gástrico (Estómago), Tumor Carcinoide Gastrointestinal, Tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales extracraneal, extragonadal, o de ovario, tumor trofoblástico gestacional, Glioma del tallo cerebral, Astrocitoma Cerebral Infantil, Ruta Visual Infantil y Glioma Hipotalámico, carcinoide gástrico, leucemia de células pilosas, cáncer de cuello y cabeza, Cáncer de corazón, Cáncer Hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, Cáncer de la hipofaringe, glioma de la ruta hipotalámica y visual infantil, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes (Páncreas Endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (cáncer de células renales), Cáncer de la Laringe, Leucemias, Leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y la cavidad oral, liposarcoma, cáncer de hígado, Cáncer de Pulmón de Células no pequeñas, Cáncer de pulmón de células pequeñas, linfomas, Linfoma asociado con SIDA, Linfoma de Burkitt, Linfoma de Células T Cutáneas, Linfoma de Hodgkin, Linfomas no de Hodgkin, Linfoma del Sistema Nervioso Central primario, microglobulinemia de Waldenström, Histiocitoma Fibroso Maligno de Hueso/Osteosarcoma, Meduloblastoma Infantil, Melanoma, Melanoma Intraocular (Ojo), Carcinoma de células de Merkel, Mesotelioma maligno adulto, Mesotelioma Infantil, Cáncer de cuello escamoso metastásico con Cáncer de Boca, Primario, Oculto, síndrome de neoplasia endocrina Múltiple Infantil, Mieloma múltiple/neoplasma de células de plasma, Micosis Fungoides, Síndromes Mielodisplásicos, Enfermedades Mielodisplásicas/Mieloproliferativas, Leucemia Mielógena Crónica, Leucemia Mielóide Aguda Adulta, Leucemia Mielóide Aguda Infantil, Mieloma Múltiple (Cáncer de la Médula Ósea), Trastornos Mieloproliferativos crónicos, cáncer de la cavidad nasal y seno paranasal, carcinoma de Nasofaringe, Neuroblastoma, Cáncer Oral, Cáncer de Orofaringe, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de huesos, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario (tumor epitelial-estromal superficial), tumor de células germinales de ovario, tumor potencial maligno bajo de ovario, cáncer pancreático, cáncer pancreático de células de los islotes, cáncer de seno paranasal y cavidad oral, cáncer de Paratiroides, Cáncer de pene, Cáncer de la faringe, Feocromocitoma, Astrocitoma Pineal, Germinoma Pineal, Pineoblastoma Infantil y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Adenoma de la pituitaria, neoplasia de células de plasma/Mieloma Múltiple, Blastoma pleuropulmonar, Linfoma del sistema nervioso central primario, Cáncer de Próstata, Cáncer rectal, Carcinoma de células renales (cáncer de riñón), Cáncer del a pelvis Renal y uretra, Retinoblastoma, Rabdomyosarcoma infantil, Cáncer de la glándula salival, Sarcoma de la familia de tumor de Ewing, Sarcoma de Kaposi, Sarcoma de tejido blando, Sarcoma uterino, Síndrome de Sézary, Cáncer de piel (no melanoma), Cáncer de piel (melanoma), Carcinoma de piel de células de Merkel, Cáncer del intestino delgado, carcinoma de células escamosas, Cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial infantil primario oculto, Cáncer Testicular, Cáncer de garganta, Timoma infantil, Timoma y carcinoma tímico, Cáncer de tiroides, cáncer de tiroides infantil, Cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter, tumor trofoblástico gestacional, Cáncer de uretra, Cáncer Uterino endometrial, Sarcoma uterino, Cáncer Vaginal, Ruta visual infantil y glioma hipotalámico, Cáncer Vulvar, macroglobulinemia de Waldenström, y tumor de Wilms infantil (cáncer de riñón).

Alergias:

Preferiblemente, las enfermedades como se mencionan aquí se seleccionan de alergias que incluyen preferiblemente, por ejemplo, alergia al polen (alergia al polen de gramíneas, de árboles (por ejemplo polen de avellano, abedul, aliso, fresno), polen de flores, polen de hierbas (por ejemplo, de artemisa)), alergia a ácaros

del polvo, alergia al moho (por ejemplo alergia a *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* o *Alternaria*), alergia a mascotas (alergia a animales, por ejemplo gatos, perros, caballos), alergia alimentaria (por ejemplo, alergia al pescado (por ejemplo rodaballo, bacalao, lenguado), a mariscos (por ejemplo, cangrejo, langosta, camarones), huevo, trigo, frutos secos (por ejemplo cacahuetes, almendras, anacardos, nueces), soja, leche, etc.) o alergia a la picadura de insectos (alergia al veneno de insectos, por ejemplo de avispas, abejas, avispones, hormigas, mosquitos o garrapatas).

En una realización particularmente preferente, un ARN que comprende al menos una modificación y que comprende al menos un marco de lectura abierto se usa en el tratamiento del cáncer de próstata.

Enfermedades autoinmunes:

De acuerdo con otra realización específica, las enfermedades como se definen aquí comprenden enfermedades autoinmunes como se define a continuación. Las enfermedades autoinmunes se seleccionan preferiblemente de la enfermedad de Addison (adrenalitis autoinmune, Addison Morbus), alopecia areata, anemia de Addison (Morbus Biermer), anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia hemolítica autoinmune (AIHA) de tipo frío (enfermedad de hemaglutinina fría, anemia hemolítica autoinmune fría (AIHA) (enfermedad de aglutinina fría) (CHAD)), anemia hemolítica autoinmune (AIHA) de tipo caliente (AIHA caliente, anemia hemolítica autoinmune (AIHA) de tipo caliente, anemia hemolítica autoinmune de Donath-Landsteiner (hemoglobinuria paroxística por frío), síndrome antifosfolípido (APS), aterosclerosis, artritis autoinmune, arteriitis temporalis, arteriitis de Takayasu (enfermedad de Takayasu, arteriopatía del arco aórtico), arteriitis temporal/arteriitis de células gigantes, gastritis crónica autoinmune, infertilidad autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno (AIED), enfermedad de Basedow (Morbus Basedow), enfermedad de Bechterew (Morbus Bechterew, espondilitis anquilosante, espondilitis anquilosans), síndrome de Behcet (Morbus Behcet), enfermedad intestinal incluyedo enfermedad inflamatoria autoinmune del intestino (incluyendo colitis ulcerosa. Enfermedad de Crohn, Morbus Crohn), cardiomiopatía, en particular cardiomiopatía autoinmune, cardiomiopatía ideopática dilatada (DCM), dermatitis celíaca (enteropatía mediada por gluten), síndrome de disfunción inmune por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), poliartritis crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, síndrome de CREST (síndrome con Calcinosis cutis, Fenómeno de Raynaud, trastornos de motilidad esofágica, esclerodactilia y teleangiectasia), enfermedad de Crohn (Morbus Crohn, colitis ulcerosa), dermatitis herpetiforme, enfermedades autoinmunes dermatológicas, dermatomiositis, diabetes, diabetes mellitus tipo 1 (diabetes tipo 1, Diabetes mellitus insulino-dependiente), Diabetes mellitus tipo 2 (diabetes tipo II), crioglobulinemia mixta esencial, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, fibromiositis, síndrome de Goodpasture (glomerulonefritis mediada por GBM), enfermedad injerto versus huésped, síndrome de Guillain-Barré (CBM, poliradiculoneuritis), enfermedades hematológicas autoinmunes, tiroiditis de Hashimoto, hemofilia, hemofilia adquirida, hepatitis, hepatitis autoinmune, en particular formas autoinmunes de hepatitis crónica, fibrosis pulmonar idiopática (FPI), púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura inmuno-trombocitopénica (Morbus Werlhof; ITP), nefropatía por IgA, infertilidad, infertilidad autoinmune, artritis reumatoide juvenil (Morbus Still, síndrome de Still), síndrome de Lambert-Eaton, líquen plano, líquen escleroso, lupus eritematoso, lupus eritematoso sistémico (LES), lupus eritematoso (forma discoide), artritis de Lyme (enfermedad de Lyme, artritis por borrelia), enfermedad de Meniere (Morbus Meniere); enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), esclerosis múltiple (EM, encefalomiелitis diseminada, enfermedad de Charcot), miastenia grave (miastenia, MG), miositis, polimiositis, enfermedades neuronales autoinmunes, neurodermitis, pénfigo vulgaris, pénfigo bulloso, cicatriz formando penfigoide; poliarteritis nodosa (periarteriitis nodosa), policondritis (panquondritis), síndrome poliglandular (autoinmune) (síndrome de PGA, síndrome de Schmidt), polimialgia reumática, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria PBC, colangitis autoinmune primaria), esclerosis sistémica progresiva (PSS), psoriasis, psoriasis vulgar, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter (Morbus Reiter, síndrome sinovial conjuntivo uretral), artritis reumatoide (AR, poliartritis crónica, enfermedad reumática de las articulaciones, fiebre reumática), sarcoidosis (Morbus Boeck, enfermedad de Boeck-Schaumann) síndrome del hombre rígido, esclerodermia, escleroderma, síndrome de Sjogren, oftalmía simpática; intolerancia al gluten transitoria, rechazo de órganos trasplantados, uveítis, uveíitis autoinmune, vasculitis, vitíligo (leucoderma, piel pálida) y enfermedad de Wegner (Morbus Wegner, granulomatosis de Wegner).

En este contexto, son particularmente preferentes las enfermedades hereditarias seleccionadas de: 1 síndrome de delección de p36; Síndrome de delección de 18p; Deficiencia de 21-hidroxilasa; 45,X (síndrome de Turner); 47,XX,+ 21 (síndrome de Down); 47,XXX (síndrome de X triple); 47,XXY (síndrome de Klinefelter); 47,XY,+ 21 (síndrome de Down); síndrome 47,XYY; Porfiria deficiente en 5-ALA deshidratasa (deficiencia de ALA deshidratasa); Porfiria por deficiencia de 5-aminolevulínica deshidratasa (deficiencia de ALA deshidratasa); Síndrome de delección 5p (Cri du chat) síndrome 5p (Cri du chat); A-T (ataxia-telangiectasia); AAT (deficiencia de alfa-1 antitripsina); Ausencia de conductos deferentes (ausencia bilateral congénita de conductos deferentes); Absent vasa (ausencia bilateral congénita de vías deferentes); aceruloplasminemia; ACG2 (acondrogénesis tipo II); ACH (acondroplasia); Acondrogénesis tipo II; acondroplasia; Deficiencia de beta-glucosidasa ácida (enfermedad de Gaucher tipo 1); Acrocefalosindactilia (Apert) (síndrome de Apert);

acrocefalosindactilia tipo V (síndrome de Pfeiffer); Acrocefalia (síndrome de Apert); Enfermedad de Gaucher cerebral aguda (enfermedad de Gaucher tipo 2); porfiria aguda intermitente; Deficiencia de ACY2 (enfermedad de Canavan); AD (enfermedad de Alzheimer); Craneosinostosis tipo Adelaida (síndrome de Muenke); Poliposis adenomatosa (poliposis adenomatosa familiar); Poliposis adenomatosa de colon (poliposis adenomatosa familiar); ADP (deficiencia de ALA deshidratasa); deficiencia de adenilosuccinato liasa; Trastornos de la glándula suprarrenal (deficiencia de 21-hidroxilasa); Síndrome adrenogenital (deficiencia de 21-hidroxilasa); Adrenoleucodistrofia; AIP (porfiria aguda intermitente); AIS (síndrome de insensibilidad a andrógenos); AKU (alcaptonuria); ALA deshidratasa porfiria (deficiencia de ALA deshidratasa); Porfiria ALA-D (deficiencia de ALA deshidratasa); Deficiencia de ALA deshidratasa; Alcaptonuria (alcaptonuria); Enfermedad de Alexander; alcaptonuria; Ocronosis alcaptonurica (alcaptonuria); deficiencia de alfa-1-antitripsina; inhibidor de proteinasa alfa-1 (deficiencia de antitripsina alfa-1); enfisema relacionado con alfa-1 (deficiencia de antitripsina alfa-1); Deficiencia de alfa-galactosidasa A (enfermedad de Fabry); ELA (esclerosis lateral amiotrófica); Síndrome de Alstrom; ALX (enfermedad de Alexander); Enfermedad de Alzheimer; Amelogenesis imperfecta; Deficiencia de ácido amino levulínico deshidratasa (deficiencia de ALA deshidratasa); Deficiencia de aminoacilasa 2 (enfermedad de Canavan); esclerosis lateral amiotrófica; Enfermedad de Anderson-Fabry (enfermedad de Fabry); síndrome de insensibilidad a andrógenos; Anemia; Anemia sideroblástica hereditaria (anemia sideroblástica ligada a X); Anemia sideroblástica hipocrómica ligada al sexo (anemia sideroblástica ligada a X); Anemia esplénica familiar (enfermedad de Gaucher); Síndrome de Angelman; Angiokeratoma Corporis Diffusum (enfermedad de Fabry); Angioqueratoma difuso (enfermedad de Fabry); Angiomatosis retiniana (enfermedad de von Hippel-Lindau); ANH1 (anemia sideroblástica ligada a X); Resistencia de APC tipo Leiden (trombofilia de factor V leiden); Síndrome de Apert; Deficiencia de AR (síndrome de insensibilidad a andrógenos); AR-CMT2 ee (enfermedad de Charcot-Mare-Tooth, tipo 2); Aracnodactilia (síndrome de Marfan); ARNSHL (sordera no sindrómica # autosómica recesiva); Arto-oftalmopatía, progresiva hereditaria (síndrome de Stickler # COL2A1); Arthrochhalasis multiplex congénita (síndrome de Ehlers-Danlos # tipo arthrochhalasia); AS (síndrome de Angelman); Deficiencia de asp (enfermedad de Canavan); Deficiencia de aspa (enfermedad de Canavan); Deficiencia de aspartoacilasa (enfermedad de Canavan); ataxia-telangiectasia; Autismo-Demencia-Ataxia-Síndrome de Pérdida de uso de mano útil (síndrome de Rett); ALS juvenil autosómica dominante (esclerosis lateral amiotrófica, tipo 4); Síndrome de Opitz G / BBB autosómico dominante (síndrome de delección 22q11.2); forma autosómica recesiva de ALS juvenil tipo 3 (esclerosis lateral amiotrófica # tipo 2); Pérdida auditiva no sindrómica autosómica recesiva (sordera no sindrómica # autosómica recesiva); Deficiencia auditiva neurosensorial autosómica recesiva y bocio (síndrome de Pendred); AxD (enfermedad de Alexander); Síndrome de Ayerza (hipertensión pulmonar primaria); Variante B de la Hexosaminidasa GM2 gangliosidosis (enfermedad de Sandhoff); BANF (neurofibromatosis 2); Síndrome de Beare-Steven cutis girata; Peritonitis paroxística benigna (fiebre mediterránea, familiar); Síndrome de Benjamin; betatalasemia; Deficiencia de BH4 (deficiencia de tetrahidrobiopterina); Neurofibromatosis acústica bilateral (neurofibromatosis 2); deficiencia de biotinidasa; cáncer de vejiga; Trastornos hemorrágicos (trombofilia de factor V leiden); Síndrome de Bloch-Sulzberger (incontinentia pigmenti); Síndrome de Bloom; Enfermedades óseas; Enfermedades de la médula ósea (anemia sideroblástica ligada a X); Síndrome de Bonnevie-Ullrich (síndrome de Turner); Enfermedad de Bourneville (esclerosis tuberosa); Facomatosis de Bourneville (esclerosis tuberosa); Enfermedades del cerebro (enfermedad priónica); cáncer de mama; Síndrome de Birt-Hogg-Dube; Enfermedad de huesos de cristal (osteogénesis imperfecta); Síndrome del pulgar ancho-Hallux (síndrome de Rubinstein-Taybi); Diabetes bronce (hemocromatosis); Cirrosis bronce (hemocromatosis); Atrofia muscular bulboespinal ligada al X (enfermedad de Kennedy); Síndrome de Burger-Grutz (deficiencia de lipoproteína lipasa, familiar); CADASIL; CGD Trastorno Granulomatoso Crónico; Displasia camptomélica; Enfermedad de Canavan; Cáncer; Síndrome de la familia del cáncer (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis); Cáncer de mama (cáncer de mama); Cáncer de vejiga (cáncer de vejiga); Deficiencia de carboxilasa múltiple de inicio tardío (deficiencia de biotinidasa); Cardiomiopatía (síndrome de Noonan); Síndrome del gato llorón (cri du chat); CAVD (ausencia bilateral congénita de conductos deferentes); Síndrome cardiofacial de Caylor (síndrome de delección 22q11.2); CBAVD (ausencia bilateral congénita de conductos deferentes); Enfermedad celíaca; CEP (porfiria eritropoyética congénita); Deficiencia de ceramida trihexosidasa (enfermedad de Fabry); Angiomatosis cerebelorretiniana familiar (enfermedad de von Hippel-Lindau); Arteriopatía cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); Ateriopatía autosómica dominante cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); Esclerosis cerebral (esclerosis tuberosa); Hiperamonemia Cerebrotrófica (síndrome de Rett); Síndrome de lipidosis cerebrósida (enfermedad de Gaucher); FQ (fibrosis quística); CH (hipotiroidismo congénito); Enfermedad de Charcot (esclerosis lateral amiotrófica); Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; Ccondrodistrofia (acondroplasia); Síndrome de condrodistrofia (acondroplasia); Ccondrodistrofia con sordera neurosensorial (displasia otospondilomegapepifisaria); Condrogénesis imperfecta (acondrogénesis, tipo II); Síndrome de hiperuricemia de automutilación de la creoleatetosis (síndrome de Lesch-Nyhan); Galactosemia clásica (galactosemia); Síndrome de Ehlers-Danlos clásico (síndrome de Ehlers-Danlos # tipo clásico); Fenilcetonuria clásica (fenilcetonuria); Labio y paladar hendido (síndrome de Stickler); Cráneo de hoja de trébol con enanismo tanatofórico (displasia tanatofórica # tipo 2); CLS (síndrome de Coffin-Lowry); CMT (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth); Síndrome de cockayne; Síndrome de Coffin-Lowry; colagenopatía, tipos II y XI; Cáncer de colon, no poliposis familiar (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis); Cáncer de colon familiar (poliposis adenomatosa familiar); Cáncer colonorectal; Deficiencia completa de HPRT (síndrome de

Lesch-Nyhan); Deficiencia completa de hipoxantina-guanina fosforribosa transferasa (síndrome de Lesch-Nyhan); Neuropatía por compresión (neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión); Hiperplasia suprarrenal congénita (deficiencia de 21-hidroxilasa); ausencia bilateral congénita de conductos deferentes (ausencia congénita de conductos deferentes); Porfiria eritropoyética congénita; Cardiopatía congénita; 5 hipomielinación congénita (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth # tipo 1 /enfermedad de Charcot-Marie-Tooth # tipo 4); Hipotiroidismo congénito; Metahemoglobinemia congénita (Metahemoglobinemia # Metahemoglobinemia congénita); Osteosclerosis congénita (acondroplasia); Anemia sideroblástica congénita (anemia sideroblástica ligada al cromosoma X); Enfermedad del tejido conectivo; Síndrome de la cara con anomalía conotruncal (síndrome de delección 22q11.2); Anemia de Cooley (talasemia beta); Enfermedad por almacenamiento de cobre (enfermedad de Wilson); Enfermedad de transporte de cobre (enfermedad de Menkes); Coproporfiria hereditaria (coproporfiria hereditaria); Deficiencia de coproporfinógeno oxidasa (coproporfiria hereditaria); Síndrome de Cowden; Deficiencia de CPO (coproporfiria hereditaria); Deficiencia de CPRO (coproporfiria hereditaria); Deficiencia de CPX (coproporfiria hereditaria); Disartrosis craneofacial (síndrome de Crouzon); Disostosis craneofacial (síndrome de Crouzon); Cretinismo (hipotiroidismo congénito); 10 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (enfermedad priónica); Cri du chat (enfermedad de Crohn, fibrostenosing); Síndrome de Crouzon; Síndrome de Crouzon con acantosis nigricans (síndrome de Crouzonodermoskeletal); Síndrome crouzonodermosquelético; CS (síndrome de Cockayne) (síndrome de Cowden); Síndrome de Curschmann-Batten-Steinert (distrofia miotónica); síndrome de Cutis gyrata de Beare-Stevenson (síndrome de Beare-Stevenson cutis gyrata); Desorden mutación cromosoma; Deficiencia de D-glicerato deshidrogenasa (hiperoxaluria, primaria); Síndrome de metafisis moteada (displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick); DAT - Demencia tipo Alzheimer (enfermedad de Alzheimer); Hipercalciuria genética (enfermedad de Dent); DBMD (distrofia muscular, tipos Duchenne y Becker); Sordera con bocio (síndrome de Pendred); Síndrome de sordera-retinitis pigmentosa (síndrome de Usher); Enfermedad por deficiencia, fenilalanina hidroxilasa (fenilcetonuria); Enfermedades nerviosas degenerativas; síndrome de De Grouchy 1 (síndrome de De grouchy); 25 Síndrome de Dejerine-Sottas (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth); Porfiria deficiencia de delta-aminolevulinato deshidratasa (deficiencia de ALA deshidratasa); Demencia (CADASIL); leucodistrofia desmielinogénica (enfermedad de Alexander); Tipo dermatosparáctico del síndrome de Ehlers-Danlos (síndrome de Ehlers-Danlos # tipo de dermatosparaxis); Dermatoparaxis (síndrome de Ehlers-Danlos # tipo de dermatoparaxis); discapacidades del desarrollo; dHMN (esclerosis lateral amiotrófica nº 4); DHMN-V (atrofia muscular espinal distal, tipo V); Deficiencia de DHTR (síndrome de insensibilidad a los andrógenos); Esclerosis Globoidea Difusa (enfermedad de Krabbe); Síndrome de DiGeorge; Deficiencia del receptor de dihidrotestosterona (síndrome de insensibilidad a los andrógenos); atrofia muscular espinal distal, tipo V; DM1 (distrofia miotónica # tipo1); DM2 (distrofia miotónica # tipo2); Síndrome de Down; DSMAV (atrofia muscular espinal distal, tipo V); DSN (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth # tipo 4); DSS (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, tipo 4); Distrofia muscular de Duchenne / Becker (distrofia muscular, tipos Duchenne y Becker); 35 Enanismo acondroplásico (acondroplasia); Enanismo tanatófórico (displasia tanatófórica); Enanismo Enanismo-atrofia retiniana-sordera síndrome (síndrome de Cockayne); leucodistrofia dismielinogénica (enfermedad de Alexander); Distrofia miotónica (distrofia miotónica); síndrome de distrofia retinosa pigmentosa-disostosis (síndrome de Usher); Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano (EOFAD) (enfermedad de Alzheimer); EDS (síndrome de Ehlers-Danlos); Síndrome de Ehlers-Danlos; Enfermedad de Ekman-Lobstein (osteogénesis imperfecta); Neuropatía por atrapamiento (neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión); Epiloia (esclerosis tuberosa); EPP (protoporfiria eritropoyética); Anemia eritroblástica (talasemia beta); Protoporfiria eritropoyética (protoporfiria eritropoyética); Deficiencia de 5-aminolevulinato sintetasa eritroide (anemia sideroblástica ligada a X); Porfiria eritropoyética (porfiria eritropoyética congénita); Protoporfiria eritropoyética; Uroporfiria eritropoyética (porfiria eritropoyética congénita); Cáncer del ojo (retinoblastoma FA - ataxia de Friedreich); Enfermedad de Fabry; Lesiones y trastornos faciales; Factor V leiden trombofilia; FALS (esclerosis lateral amiotrófica); neuroma acústico familiar (neurofibromatosis tipo II); poliposis adenomatosa familiar; enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) (enfermedad de Alzheimer); esclerosis lateral amiotrófica familiar (esclerosis lateral amiotrófica); disautonomía familiar; Hipertrigliceridemia familiar inducida por grasa (deficiencia de lipoproteína lipasa, familiar); hemocromatosis familiar (hemocromatosis); deficiencia familiar de LPL (deficiencia de lipoproteína lipasa, familiar); cáncer de colon familiar sin poliposis (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis); poliserositis paroxística familiar (fiebre mediterránea, familiar); PCT familiar (porfiria cutánea tarda); neuropatía familiar sensible a la presión (neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión); hipertensión pulmonar primaria familiar (FPPH) (hipertensión pulmonar primaria); Síndrome de Turner familiar (síndrome de Noonan); leucoencefalopatía vascular familiar (CADASIL); FAP (poliposis adenomatosa familiar); FD (disautonomía familiar); Síndrome pseudo-Turner femenino (síndrome de Noonan); Deficiencia de ferroquelatasa (protoporfiria eritropoyética); enfermedad de ferroportina (hemocromatosis # tipo 4); Fiebre (fiebre mediterránea, familiar); Síndrome de FG; Sinostosis coronal asociada a FGFR3 (síndrome de Muenke); Degeneración fibrinoide de astrocitos (enfermedad de Alexander); Enfermedad fibroquística del páncreas (fibrosis quística); FMF (fiebre mediterránea, familiar); Enfermedad de fruncido (fenilcetonuria); síndrome de fra (X) (síndrome de X frágil); síndrome X frágil; Fragilitas ossium (osteogénesis imperfecta); Síndrome de FRAXA (síndrome de X frágil); FRDA (ataxia de Friedreich); Ataxia de Friedreich (ataxia de Friedreich); ataxia de Friedreich; FXS (síndrome de X frágil); Deficiencia de G6PD; Enfermedad por deficiencia de galactocinasa (galactosemia); Enfermedad por deficiencia de galactosa-1-fosfato uridil-transferasa (galactosemia);

galactosemia; Enfermedad por deficiencia de galactosilceramidasa (enfermedad de Krabbe); Galactosilceramida lipidosis (enfermedad de Krabbe); deficiencia de galactosilcerebrosidasa (enfermedad de Krabbe); lipidosis de galactosilesfingosina (enfermedad de Krabbe); Deficiencia de GALC (enfermedad de Krabbe); Deficiencia de GALT (galactosemia); Enfermedad de Gaucher; Enfermedad de Gaucher (pseudogaucher); Deficiencia de GBA (enfermedad de Gaucher tipo 1); GD (enfermedad de Gaucher); Trastornos genéticos del cerebro; enfisema genético (deficiencia de alfa-1 antitripsina); hemocromatosis genética (hemocromatosis); Hepatitis de células gigantes, neonatal (hemocromatosis neonatal); Deficiencia de GLA (enfermedad de Fabry); Glioblastoma retinal (retinoblastoma); Glioma, retinal (retinoblastoma); leucodistrofia de células globoides (GCL, GLD) (enfermedad de Krabbe); leucoencefalopatía de células globoides (enfermedad de Krabbe); Deficiencia de glucocerebrosidasa (enfermedad de Gaucher); Glucocerebrosidosis (enfermedad de Gaucher); Glucosil cerebrósido lipidosis (enfermedad de Gaucher); Deficiencia de glucosilceramidasa (enfermedad de Gaucher); Deficiencia de glucosilceramida beta-glucosidasa (enfermedad de Gaucher); Lipidosis glucosilceramida (enfermedad de Gaucher); Aciduria glicérica (hiperoxaluria primaria); Encefalopatía glicina (hiperglicinemia no cetósica); Aciduria glicólica (hiperoxaluria primaria); Gangliosidosis GM2, tipo 1 (enfermedad de Tay-Sachs); Síndrome de sordera y bocio (síndrome de Pendred); Síndrome de Graefe-Usher (síndrome de Usher); Síndrome de Gronblad-Strandberg (pseudoxanthoma elasticum); Porfiria de Guenther (porfiria eritropoyética congénita); Enfermedad de Gunther (porfiria eritropoyética congénita); Hemocromatosis (hemocromatosis); Síndrome de Hallgren (síndrome de Usher); Ictiosis arlequín; Enfermedad de Hb S (anemia de células falciformes); HCH (hipocondroplasia); PC (coproporfiria hereditaria); Malformaciones de cabeza y cerebro; Trastornos auditivos y sordera; Problemas de audición en niños; HEF2A (hemocromatosis # tipo 2); HEF2B (hemocromatosis # tipo 2); Hematoporfiria (porfiria); Deficiencia de hemo sintetasa (protoporfiria eritropoyética); Hemocromatosis (hemocromatosis); hemocromatosis; enfermedad de hemoglobina M (metahemoglobinemia tipo beta-globina); Enfermedad de la hemoglobina S (anemia de células falciformes); hemofilia; HEP (porfiria hepatoeritropoyética); deficiencia hepática de AGT (hiperoxaluria primaria); porfiria hepatoeritropoyética; Síndrome de degeneración hepatolenticular (enfermedad de Wilson); Arto-oftalmopatía hereditaria (síndrome de Stickler); Coproporfiria hereditaria; Lipidosis distópica hereditaria (enfermedad de Fabry); Hemocromatosis hereditaria (HHC) (hemocromatosis); Inclusión hereditaria Miopatía corporal (regeneración del músculo esquelético); Anemia hereditaria por carga de hierro (anemia sideroblástica ligada al cromosoma X); Neuropatía motora y sensorial hereditaria (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth); Neuronopatía motora hereditaria (atrofia muscular espinal); Neuronopatía motora hereditaria, tipo V (atrofia muscular espinal distal, tipo V); exostosis múltiple hereditaria; cáncer colorrectal hereditario no poliposis; Síndrome de fiebre hereditaria periódica (fiebre mediterránea, familiar); Poliposis Coli hereditaria (poliposis adenomatosa familiar); Enfisema pulmonar hereditario (deficiencia de antitripsina alfa-1); Resistencia hereditaria a la proteína C activada (factor V trombofilia de Leiden); Neuropatía sensorial y autonómica hereditaria tipo III (disautonomía familiar); Paraplejia espástica hereditaria (parálisis espástica hereditaria ascendente de inicio infantil); Ataxia espinal hereditaria (ataxia de Friedreich); Esclerosis espinal hereditaria (ataxia de Friedreich); Anemia de Herrick (anemia de células falciformes); Heterozygous OSMED (síndrome de Weissenbacher-Zweymuller); Displasia otospondilomegaepifisaria heterocigótica (síndrome de Weissenbacher-Zweymuller); Deficiencia de HexA (enfermedad de Tay-Sachs); Deficiencia de hexosaminidasa A (enfermedad de Tay-Sachs); Deficiencia de la subunidad alfa de la hexosaminidasa (variante B) (enfermedad de Tay-Sachs); Hemocromatosis asociada a HFE (hemocromatosis); HGPS (Progeria); Enfermedad de Hippel-Lindau (enfermedad de von Hippel-Lindau); HLAH (hemocromatosis); HMN V (atrofia muscular espinal distal, tipo V); HMSN (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth); HNPCC (cáncer colorrectal hereditario no polipósico); HNPP (neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión); homocistinuria; Deficiencia de oxidasa de ácido homogentísico (alcaptonuria); Acidura homogentísica (alcaptonuria); Porfiria cutánea tardía (porfiria hepatoeritropoyética); HP1 (hiperoxaluria primaria); HP2 (hiperoxaluria primaria); HPA (hiperfenilalaninemia); HPRT: deficiencia de hipoxantina-guanosiltransferasa (síndrome de Lesch-Nyhan); HSAN tipo III (disautonomía familiar); HSAN3 (disautonomía familiar); HSN-III (disautonomía familiar); Dermatosparaxis humana (síndrome de Ehlers-Danlos # tipo de dermatosparaxis); Enfermedad de Huntington; Síndrome de progeria de Hutchinson-Cilford (progeria); Hiperandrogenismo, tipo no clásico, debido a deficiencia de 21-hidroxilasa (deficiencia de 21-hidroxilasa); Hiperlipoproteinemia familiar (deficiencia de lipoproteína lipasa, familiar); hiperglicinemia con cetoacidosis y leucopenia (acidemia propiónica); Hiperlipoproteinemia tipo I (deficiencia de lipoproteína lipasa, familiar); hiperoxaluria primaria hiperfenilalaninemia (hiperfenilalaninemia); hiperfenilalaninemia; Hipocondrodisplasia (hipocondroplasia); hipocondrogénesis; hipocondroplasia; Anemia hipocrómica (anemia sideroblástica ligada a X); Hipocupremia congénita; Síndrome de Menkes); deficiencia de hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) (síndrome de Lesch-Nyhan); IAHS (parálisis espástica hereditaria ascendente de inicio infantil); hemocromatosis idiopática (hemocromatosis, tipo 3); Hemocromatosis neonatal idiopática (hemocromatosis neonatal); Hipertensión pulmonar idiopática (hipertensión pulmonar primaria); Trastornos del sistema inmunitario (inmunodeficiencia combinada grave ligada al X); Incontinencia Pigmenti; Enfermedad de Gaucher cerebral infantil (enfermedad de Gaucher tipo 2); Enfermedad de Gaucher infantil (enfermedad de Gaucher tipo 2); Parálisis espástica hereditaria ascendente de inicio infantil; Esterilidad; enfisema hereditario (deficiencia de antitripsina alfa-1); Encefalopatías espongiiformes transmisibles heredadas (enfermedad priónica); tendencia hereditaria a las parálisis por presión (neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión); Síndrome de Insley-Astley (displasia otospondilomegaepifisaria); Síndrome de porfiria

aguda intermitente (porfiria aguda intermitente); Poliposis intestinal-síndrome de pigmentación cutánea (síndrome de Peutz-Jeghers); IP (incontinencia pigmentada); Trastorno de almacenamiento de hierro (hemocromatosis); Isodicentric 1 5 (idicl 5); Sordera aislada (sordera no sindrómica); Síndrome de Jackson-Weiss; JH (hemocromatosis # tipo 2); Síndrome de Joubert; JPLS (esclerosis lateral primaria juvenil); esclerosis lateral amiotrófica juvenil (esclerosis lateral amiotrófica # tipo 2); Gota juvenil, coreoatetosis, síndrome de retraso mental (síndrome de Lesch-Nyhan); síndrome de hiperuricemia juvenil (síndrome de Lesch-Nyhan); JWS (síndrome de Jackson-Weiss); KD (atrofia del músculo espinal bulbar ligado a X); Enfermedad de Kennedy (atrofia del músculo espinal-bulbar ligada a X); Atrofia muscular espinal y bulbar de Kennedy (atrofia del músculo espinal-bulbar ligada al cromosoma X); Histiocitosis de kerasina (enfermedad de Gaucher); Lipoidosis de Kerasin (enfermedad de Gaucher); Tesaurismosis de Kerasin (enfermedad de Gaucher); glicinemia cetótica (acidemia propiónica); hiperglicinemia cetótica (acidemia propiónica); Enfermedades renales (hiperoxaluria primaria); Síndrome de Klinefelter; Síndrome de Klinefelter; Displasia más aguda; Enfermedad de Krabbe; Demencia lacunar (CADASIL); Acondrogénesis de Langer-Saldino (acondrogénesis, tipo II); Displasia de Langer-Saldino (acondrogénesis, tipo II); Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (Alzheimer disease type 2); Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio tardío (AD2) (enfermedad de Alzheimer n.º 2); enfermedad de Krabbe de inicio tardío (LOKD) (enfermedad de Krabbe); Trastornos del aprendizaje (discapacidad de aprendizaje); Lentiginosis perioral (síndrome de Peutz-Jeghers); Síndrome de Lesch-Nyhan; Leucodistrofias; leucodistrofia con fibras de Rosenthal (enfermedad de Alexander); Leucodistrofia espongiiforme (enfermedad de Canavan); LFS (síndrome de Li-Fraumeni); Síndrome de Li-Fraumeni; Deficiencia de lipasa D (deficiencia de lipoproteína lipasa, familiar); Deficiencia de LIPD (deficiencia de lipoproteína lipasa, familiar); Lipidosis, cerebrósido (enfermedad de Gaucher); Lipidosis, gangliósido infantil (enfermedad de Tay-Sachs); Histiocitosis lipoidea (tipo kerasina) (enfermedad de Gaucher); deficiencia de lipoproteína lipasa, familiar; Enfermedades hepáticas (galactosemia); Enfermedad de Lou Gehrig (esclerosis lateral amiotrófica); Síndrome de Louis-Bar (ataxia-telangiectasia); Síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario no polipósico); Deficiencia de lisil-hidroxilasa (síndrome de Ehlers-Danlos # tipo de cifoescoliosis); Enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelosa # tipo 3); Cáncer de mama masculino (cáncer de mama); Trastornos genitales masculinos; Síndrome de Turner masculino (síndrome de Noonan); Neoplasia maligna de mama (cáncer de mama); tumor maligno de mama (cáncer de mama); Tumor maligno de vejiga urinaria (cáncer de vejiga); Cáncer de mama (cáncer de mama); Síndrome de Marfan 15; Síndrome de marcador X (síndrome de X frágil); Síndrome de Martin-Bell (síndrome de X frágil); Síndrome de McCune-Albright; Síndrome de McLeod; MEDNIK; Anemia Mediterránea (talasemia beta); Fiebre mediterránea, familiar; Enanismo megaepifisario (displasia otospondilomegaepifisaria); Síndrome de Menkes (síndrome de Menkes); Síndrome de Menkes; Retraso mental con anomalías osteocartilaginosas (síndrome de Coffin-Lowry); Desórdenes metabólicos; Enanismo metatrópico tipo II (displasia de Kniest); Displasia metatrópica tipo II (displasia de Kniest); Metahemoglobinemia # tipo beta-globina; acidemia metilmalónica; MFS (síndrome de Marfan); MHAM (síndrome de Cowden); MK (síndrome de Menkes); Síndrome micro; Microcefalia; MMA (acidemia metilmalónica); MNK (síndrome de Menkes); Síndrome de monosomía 1 p36 (síndrome de delección 1 p36); monosomía X (síndrome de Turner); Enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis lateral amiotrófica (esclerosis lateral amiotrófica); Trastornos del movimiento; Síndrome de Mowat-Wilson; Mucopolisacaridosis (MPS I); Mucoviscidosis (fibrosis quística); Síndrome de muenke; Demencia multi-lárquica (CADASIL); Deficiencia múltiple de carboxilasa de inicio tardío (deficiencia de biotinidasa); Síndrome de hamartoma múltiple (síndrome de Cowden); Neurofibromatosis múltiple (neurofibromatosis); Distrofia muscular; Distrofia muscular, tipo Duchenne y Becker; Miotonía atrófica (distrofia miotónica); Miotonía distrofica (distrofia miotónica); distrofia miotónica; Mixedema congénito (hipotiroidismo congénito); Síndrome de Nance-Insley (displasia otospondilomegaepifisaria); Ccondrodisplasia de Nance-Sweeney (displasia otospondilomegaepifisaria); NBIA1 (neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa); Síndrome de Neill-Dingwall (síndrome de Cockayne); Neuroblastoma retinal (retinoblastoma); Neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral tipo 1 (neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa); Neurofibromatosis tipo I; Neurofibromatosis tipo II; Enfermedades neurológicas; Trastornos neuromusculares; neuronopatía, motor hereditario distal, tipo V (atrofia muscular espinal distal # tipo V); neuronopatía, motor hereditario distal, con características piramidales (esclerosis lateral amiotrófica # tipo 4); NF (neurofibromatosis); Niemann-Pick (enfermedad de Niemann-Pick); Síndrome de Noack (síndrome de Pfeiffer); Hiperglicinemia no cetósica (encefalopatía por glicina); Enfermedad de Gaucher no neuronopática (enfermedad de Gaucher tipo 1); Hiperfenilalaninemia no fenilcetonúrica (deficiencia de tetrahidrobiopterina); sordera no sindrómica; Síndrome de Noonan; Enfermedad de Gaucher-Norrbottnian (enfermedad de Gaucher tipo 3); Ocronosis (alcaptonuria); Artritis ocrónica (alcaptonuria); OI (osteogenesis imperfecta); OSMED (displasia otospondilomegaepifisaria); osteogénesis imperfecta; Osteopsatrosis (osteogénesis imperfecta); Osteosclerosis congénita (acondroplasia); Displasia oto-espondilo-megaepifisaria (displasia otospondilomegaepifisaria); displasia otospondilomegaepifisaria; Oxalosis (hiperoxaluria primaria); Oxaluria primaria (hiperoxaluria primaria); neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa; Síndrome de Patau (trisomía 13); Deficiencia de PBGD (porfiria intermitente aguda); Deficiencia de PCC (acidemia propiónica); PCT (porfiria cutánea tardía); PDM (distrofia miotónica # tipo 2); Síndrome de Pendred; Enfermedad periódica (fiebre mediterránea, familiar); Peritonitis periódica (fiebre mediterránea, familiar); Síndrome de lentiginosis periorificial (síndrome de Peutz-Jeghers); Trastornos del nervio periférico (disautonomía familiar); Neurofibromatosis periférica (neurofibromatosis 1); Atrofia muscular peronea (enfermedad de Charcot-Marie-

Tooth); alanina peroxisomal: deficiencia de glioxilato aminotransferasa (hiperoxaluria primaria); Síndrome de Peutz-Jeghers; Síndrome de Pfeiffer; Enfermedad por deficiencia de fenilalanina hidroxilasa (fenilcetonuria); fenilcetonuria; Feocromocitoma (enfermedad de von Hippel-Lindau); Síndrome de Pierre Robin con condrodysplasia fetal (síndrome de Weissenbacher-Zweymuller); Cirrosis pigmentaria (hemocromatosis); PJS (síndrome de Peutz-Jeghers); PKAN (neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa); PKU (fenilcetonuria); Plumboporfiria (porfiria por deficiencia de ALA); PMA (enfermedad de Charcot-Marie-tooth); displasia fibrosa polioestótica (síndrome de McCune-Albright); poliposis coli (poliposis adenomatosa familiar); Poliposis intestinal hamartomatosa (síndrome de Peutz-Jeghers); poliposis intestinal, II (síndrome de Peutz-Jeghers); síndrome de pólipos y manchas (síndrome de Peutz-Jeghers); Deficiencia de porfobilinógeno sintasa (porfiria por deficiencia de ALA); porfiria; trastorno de porfirina (porfiria); HPP (hipertensión pulmonar primaria); Deficiencia de PPOX (porfiria variegata); Síndrome de Prader-Labhart-Willi (síndrome de Prader-Willi); Síndrome de Prader-Willi; demencia presenil y senil (enfermedad de Alzheimer); hemocromatosis primaria (hemocromatosis); síndrome de hiperuricemia primaria (síndrome de Lesch-Nyhan); hipertensión pulmonar primaria; demencia degenerativa senil (enfermedad de Alzheimer); enfermedad priónica procolágeno tipo EDS VII, mutante (síndrome de Ehlers-Danlos # tipo artrocalasia); progeria (síndrome de progeria de Hutchinson Gilford); Síndrome similar a la progeria (síndrome de Cockayne); enanismo progeroide (síndrome de Cockayne); corea progresiva, crónica hereditaria (Huntington) (enfermedad de Huntington); atrofia muscular progresiva (atrofia muscular espinal); Osteogénesis imperfecta progresivamente deformante con escleras normales (osteogénesis imperfecta # tipo III); PROMM (distrofia miotónica # tipo 2); academia propiónica; deficiencia de propionil-CoA carboxilasa (acidemia propiónica); deficiencia de proteína C; deficiencia de proteína S; protoporfiria (protoporfiria eritropoyética); deficiencia de protoporfirinógeno oxidasa (porfiria variegata); distrofia miotónica proximal (distrofia miotónica # tipo 2); miopatía miotónica proximal (distrofia miotónica # tipo 2); enfermedad de pseudo-Gaucher; síndrome de pseudo-Ullrich-Turner (síndrome de Noonan); pseudoxantoma elástico; lipidosis psicosis (enfermedad de Krabbe); hipertensión arterial pulmonar (hipertensión pulmonar primaria); hipertensión pulmonar (hipertensión pulmonar primaria); PWS (síndrome de Prader-Willi); PXE - pseudoxanthoma elasticum (pseudoxanthoma elasticum); Rb (retinoblastoma); Enfermedad de Recklinghausen, nervio (neurofibromatosis 1); Poliserositis recurrente (fiebre mediterránea, familiar); Trastornos de la retina; Síndrome de retinitis pigmentosa-sordera (síndrome de Usher); Retinoblastoma; Síndrome de rett; RFALS tipo 3 (esclerosis lateral amiotrófica # tipo 2); Síndrome de Ricker (distrofia miotónica # tipo 2); Síndrome de Riley-Day (disautonomía familiar); Síndrome de Roussy-Levy (Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth); RSTS (síndrome de Rubinstein-Taybi); RTS (síndrome de Rett) (síndrome de Rubinstein-Taybi); RTT (síndrome de Rett); Síndrome de Rubinstein-Taybi; Síndrome de Sack-Barabas (síndrome de Ehlers-Danlos, tipo vascular); SADDAN; síndrome de sarcoma familiar de Li y Fraumeni (síndrome de Li-Fraumeni); síndrome de sarcoma, mama, leucemia y glándula suprarrenal (SBLA) (síndrome de Li-Fraumeni); Síndrome de SBLA (síndrome de Li-Fraumeni); SBMA (atrofia del músculo espinal bulbar ligado a X); SCD (anemia de células falciformes); Schwannoma, acústico, bilateral (neurofibromatosis 2); SCID1 (inmunodeficiencia combinada severa ligada al X); esclerosis tuberosa (esclerosis tuberosa); SDAT (enfermedad de Alzheimer); SED congénita (displasia espondiloepifisaria congénita); SED Strudwick (displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick); SEDc (displasia espondiloepifisaria congénita); SEMD, tipo Strudwick (displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick); demencia senil (enfermedad de Alzheimer # tipo 2); acondroplasia severa con retraso en el desarrollo y acantosis nigricans (SADDAN); Síndrome de Shprintzen (síndrome de delección 22q11.2); anemia falciforme; síndrome esqueleto-piel-cerebro (SADDAN); Trastornos de la pigmentación de la piel; SMA (atrofia muscular espinal); SMED, tipo Strudwick (displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick); SMED, tipo I (displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick); Síndrome de Smith Lemli Opitz; Porfiria genética sudafricana (variegata porfiria); Parálisis espástica, ascendente de inicio infantil (parálisis espástica hereditaria ascendente de inicio infantil); Trastornos del habla y de la comunicación; esfingolipidosis, Tay-Sachs (enfermedad de Tay-Sachs); atrofia muscular espinal-bulbar; atrofia muscular en la columna; atrofia muscular espinal, tipo V distal (atrofia muscular espinal distal # tipo V); atrofia muscular espinal, distal, con predominio de la extremidad superior (atrofia muscular espinal distal # tipo V); ataxia espinocerebelosa; displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick; displasia espondiloepifisaria congénita; displasia espondiloepifisaria (colagenopatía, tipos II y XI); displasia espondilometá epifisaria congénita, tipo Strudwick (displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick); displasia espondilometá epifisaria (SMD) (displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick); displasia espondilometá epifisaria, tipo Strudwick (displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick); degeneración esponjosa del sistema nervioso central (enfermedad de Canavan); degeneración esponjosa del cerebro (enfermedad de Canavan); degeneración esponjosa de la materia blanca en la infancia (enfermedad de Canavan); hipertensión pulmonar primaria esporádica (hipertensión pulmonar primaria); Síndrome de SSB (SADDAN); síndrome de pelo de acero (síndrome de Menkes); Enfermedad de Steinert (distrofia miotónica); Síndrome de distrofia miotónica de Steinert (distrofia miotónica); Síndrome de stickler; accidente cerebrovascular (CADASIL); Síndrome de Strudwick (displasia espondiloepimetafisaria, tipo Strudwick); enfermedad de Gaucher neuronopática subaguda (enfermedad de Gaucher tipo 3); Porfiria genética sueca (porfiria aguda intermitente); Porfiria sueca (porfiria aguda intermitente); Displasia de cartílago de queso suizo (displasia de Kniest); Enfermedad de Tay-Sachs; TD - enanismo tanatofórico (displasia tanatofórica); TD con fémures rectos y cráneo de trébol (displasia tanatofórica # Tipo 2); Telangiectasia, cerebelo-oculocutánea (ataxia-telangiectasia); Síndrome de feminización testicular

(síndrome de insensibilidad a los andrógenos); deficiencia de tetrahidrobiopterina; TFM: síndrome de feminización testicular (síndrome de insensibilidad a andrógenos); talasemia intermedia (beta talasemia); Talasemia mayor (talasemia beta); displasia tanatofórica; anemia megaloblástica sensible a la tiamina con diabetes mellitus y sordera neurosensorial; Trombofilia debido a la deficiencia de cofactor para la proteína C activada, tipo Leiden (factor V trombofilia de Leiden); Enfermedad de tiroides; Neuropatía tomaculosa (neuropatía hereditaria con riesgo de parálisis por presión); Deficiencia total de HPRT (síndrome de Lesch-Nyhan); Deficiencia total de hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (síndrome de Lesch-Nyhan); Síndrome de Tourette; Demencias transmisibles (enfermedad priónica); Encefalopatías espongiiformes transmisibles (enfermedad priónica); Síndrome de Treacher Collins; Trias fragilitis osio (osteogénesis imperfecta # Tipo I); síndrome del triple X; Síndrome de Triple X (síndrome de triple X); Trisomía 21 (síndrome de Down); Trisomía X (síndrome del triple X); Síndrome de Troisier-Hanot-Chauffard (hemocromatosis); TS (síndrome de Turner); TSD (enfermedad de Tay-Sachs); EET (enfermedad priónica); esclerosis tuberosa (esclerosis tuberosa); esclerosis tuberosa; Síndrome de Turner; Síndrome de Turner en mujeres con cromosoma X (síndrome de Noonan); Fenotipo de Turner, cariotipo normal (síndrome de Noonan); Síndrome de Turner (síndrome de Turner); Síndrome similar a Turner (síndrome de Noonan); Enfermedad de Gaucher tipo 2 (enfermedad de Gaucher tipo 2); Enfermedad de Gaucher tipo 3 (enfermedad de Gaucher tipo 3); Enfermedad por deficiencia de UDP-galactosa-4-epimerasa (galactosemia); Enfermedad por deficiencia de glucosa 4-epimerasa UDP (galactosemia); UDP glucosa hexosa-1 -deficiencia de fosfato uridililtransferasa (galactosemia); Síndrome de Ullrich-Noonan (síndrome de Noonan); Síndrome de Ullrich-Turner (síndrome de Turner); Sordera indiferenciada (sordera no sindrómica); Deficiencia de UPS (porfiria aguda intermitente); Cáncer de vejiga urinaria (cáncer de vejiga); Deficiencia UROD (porfiria cutánea tardía); Deficiencia de uroporfirinógeno descarboxilasa (porfiria cutánea tardía); Deficiencia de uroporfirinógeno sintasa (porfiria aguda intermitente); Deficiencia UROS (porfiria eritropoyética congénita); Síndrome de Usher; Deficiencia de UTP hexosa-1-fosfato uridililtransferasa (galactosemia); Síndrome de Van Bogaert-Bertrand (enfermedad de Canavan); Síndrome de Van der Hoeve (osteogénesis imperfecta # tipo I); porfiria variegata; Síndrome velocardiocéfalo (síndrome de delección 22q11.2); Síndrome de VHL (enfermedad de von Hippel-Lindau); Deterioro de la visión y ceguera (síndrome de Alstrom); Enfermedad de Von Bogaert-Bertrand (enfermedad de Canavan); enfermedad de von Hippel-Lindau; Enfermedad de Von Recklinghausen-Applebaum (hemocromatosis); enfermedad de von Recklinghausen (neurofibromatosis 1); VP (porfiria variegata); Enfermedad de Vrolik (osteogénesis imperfecta); Síndrome de waardenburg; Síndrome de Warburg Sjo Fledelius (síndrome micro); WD (enfermedad de Wilson); Síndrome de Weissenbacher-Zweymuller; Enfermedad de Wilson; Enfermedad de Wilson (enfermedad de Wilson); Síndrome de Wolf-Hirschhorn; Enfermedad periódica de Wolff (fiebre mediterránea, familiar); WZS (síndrome de Weissenbacher-Zweymuller); Xeroderma pigmentoso; Retardo mental ligado a X y macroorquidia (síndrome de X frágil); Hiperuricemia primaria ligada al X (síndrome de Lesch-Nyhan); Inmunodeficiencia combinada severa ligada al X; Anemia sideroblástica ligada al X; Atrofia del músculo espinal-bulbar ligada al cromosoma X (enfermedad de Kennedy); Defecto de la enzima aciduria úrica ligada al X (síndrome de Lesch-Nyhan); X-SCID (inmunodeficiencia combinada severa ligada al X); XLSA (anemia sideroblástica ligada al X); XSCID (inmunodeficiencia combinada grave ligada al X); Síndrome de XXX (síndrome de X triple); Síndrome XXXX (48, XXXX); Síndrome de XXXXX (49, XXXXX); Síndrome XXY (síndrome de Klinefelter); Trisomía XXY (síndrome de Klinefelter); Cariotipo XYY (47, síndrome XYY); Síndrome XYY (síndrome 47, XYY); y síndrome de YY (síndrome de 47, XYY).

En un aspecto preferente adicional, el ARN modificado como se define aquí o la composición que comprende una pluralidad de ARN modificados como se definen aquí se puede utilizar para la preparación de una composición farmacéutica, particularmente para los propósitos aquí definidos, preferentemente para su uso en terapia génica o vacunación genética en el tratamiento de las enfermedades aquí definidas.

La composición farmacéutica se puede utilizar adicionalmente en la terapia génica o la vacunación genética, en particular para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno, preferentemente como se definen aquí.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención también proporciona kits, particularmente kits de partes. Tales kits, particularmente kits de partes, comprenden típicamente como componentes solos o en combinación con componentes adicionales como se definen aquí al menos un ARN modificado como se define aquí, la composición farmacéutica inventiva o vacuna que comprende el ARN modificado. El al menos un ARN modificado como se define aquí está opcionalmente en combinación con componentes adicionales como se definen aquí, de forma que al menos un ARN modificado según la invención se proporciona separadamente (primera parte del kit) de al menos una parte del kit que comprende uno o más de otros componentes. La composición farmacéutica por ejemplo puede presentarse en una o diferentes partes del kit. Como ejemplo, por ejemplo al menos una parte del kit puede comprender al menos un ARN modificado como se define aquí y al menos una parte adicional del kit al menos otro componente como se define aquí, por ejemplo al menos otra parte del kit puede comprender al menos una composición farmacéutica o parte de la misma, por ejemplo al menos una parte del kit puede comprender el ARN modificado como se define aquí, al menos una parte adicional del kit al menos otro componente como se define aquí, al menos una parte adicional del kit al menos un componente de la composición farmacéutica o la composición farmacéutica en conjunto y al menos una

5 parte adicional del kit por ejemplo al menos un portador o vehículo farmacéutico, etc. En caso de que el kit o kit de partes comprenda una pluralidad de moléculas de ARN modificado, un componente del kit puede comprender solo una, varias o todas las moléculas de ARN modificado comprendidas en el kit. En una realización alternativa, cada ARN modificado puede estar comprendido en un componente diferente/separado del kit, de forma que cada componente forma una parte del kit. También, más de un ARN modificado puede estar comprendido en un primer componente como una parte del kit, mientras que uno o más de otros componentes (segundos, terceros, etc.) (que proporciona una o más de otras partes del kit) pueden contener ya sea uno o más de uno de los ARN modificados, que pueden ser idénticos o parcialmente idénticos o diferentes del primer componente. El kit o kit de partes puede contener adicionalmente instrucciones técnicas con información sobre la administración y dosificación del ARN modificado, la composición farmacéutica o de cualquiera de sus componentes o partes, por ejemplo si el kit se prepara como un kit de partes.

15 Preferiblemente, el kit de acuerdo con la invención comprende el ARN modificado, preferiblemente en forma liofilizada, y un vector adecuado para la reconstitución del ARN modificado. En una realización preferente, el ARN modificado se proporciona en un recipiente, preferiblemente en un recipiente en el que el ARN modificado se resolubiliza. Preferiblemente, el recipiente se puede conectar a un dispositivo de inyección sin aguja, por ejemplo para cargar una jeringa desechable de un dispositivo de inyección neumático.

El ARN modificado según la invención se puede emplear para mejorar la expresión (localizada) de péptidos o proteínas codificados por ARN en la dermis o músculo (de un mamífero), comprendiendo administrar el ARN modificado como se define en este documento mediante inyección neumática.

20 El ARN modificado según la invención se puede emplear en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que comprende la administración de un ARN modificado como se define aquí mediante inyección neumática a un sujeto que lo necesite, en particular un paciente humano.

Dicho método para tratar o prevenir un trastorno de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un método de vacunación y/o un método de terapia génica como se describe anteriormente.

25 Ejemplos

Los siguientes Ejemplos son meramente ilustrativos y describen la invención adicionalmente. Estos ejemplos no deben considerarse limitativos de la presente invención.

1. Expresión de luciferasa *in vivo*

Preparación de plantillas de ADN

30 Se construyó un vector para la transcripción *in vitro* que contenía un promotor T7 seguido de una secuencia enriquecida con GC que codifica la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc (GC)), una 3'-UTR mutada de alfa globina (muag), una secuencia poli(A) A64, una secuencia poli(C) (C30) y una secuencia tallo-bucle de histona (histona-SL):

SEQ ID No. 46 (Fig. 4): PpLuc (GC) - muag - A64 - C30 - histonaSL (R1265)

35 Para la comparación, se construyó un vector que contenía un promotor T7 seguido de una secuencia de tipo salvaje que codifica luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc (wt)) y una secuencia poli(A) A30:

SEQ ID No. 47 (Fig. 5): PpLuc (wt) - A30 (R2652) Generación de las secuencias consenso de tallo-bucle de histona

Para determinar el efecto de las modificaciones utilizadas se construyeron los siguientes vectores:

40 SEQ ID No. 48 (Fig. 6): PpLuc(wt) - A64 (R3454)
 SEQ ID No. 49 (Fig. 7): PpLuc(GC)-A64-C30-HistoneSL (R2462)
 SEQ ID No. 50 (Fig. 8): PpLuc(GC)-muag-A64-C30 (R1256)
 SEQ ID No. 51 (Fig. 9): PpLuc(nat)-muag-A64-C30-HistoneSL (R2393)

45 Para experimentos adicionales, se construyó el siguiente vector que codifica la proteína G del virus de la rabia (RAV-G):

Al igual que en el vector PpLuc (GC) - muag - A64 - C30 - histonaSL (R1265) que codifica luciferasa, RAV-G(GC)-muag-A64-C30-histonaSL (R2403) contiene un promotor T7 seguido de una secuencia enriquecida con GC que codifica la proteína G del virus de la rabia, una 3'-UTR mutada de globina alfa (muag), una secuencia

poli (A) A64, una secuencia poli(C) (C30) y una secuencia de tallo-bucle de histonas (histona-SL) :

SEQ ID No. 52 (Fig. 10): RAV-G(GC)-muag-A64-C30-histonaSL (R2403)

Para experimentos adicionales, se construyeron los siguientes vectores que codifican la EPO murina:

- 5 Se construyó un vector para la transcripción *in vitro* que contiene un promotor T7 seguido de una secuencia de HSD1 7B45'-TOP -UTR, una secuencia enriquecida en GC que codifica EPO (EPO(GQ), la secuencia 3'-UTR de albúmina (albúmina 7), una secuencia poli(A) A63, una secuencia poli(C) (C30) y una secuencia de tallo-bucle de histona (histona-SL):

SEQ ID No. 54 (Fig. 12): HSD17B4-EPO(GC)-albumin7-A64-C30-histonaSL (R3135)

- 10 Para comparación, se construyó un vector que contiene un promotor T7 seguido de una secuencia de tipo salvaje que codifica EPO (EPO (wt)) y una secuencia poli (A) A30:

SEQ ID No. 53 (Fig. 11): EPO(wt)-A30 (R3513)

Transcripción *in vitro*

- 15 El molde de ADN de acuerdo con el Ejemplo 1 se linealizó y se transcribió *in vitro* utilizando T7-Polimerasa. El molde de ADN se digirió por tratamiento con ADNasa. Todos los transcritos de ARNm contenían una estructura 5'-CAP (mCap) obtenida al agregar un exceso de N7-Metil-Guanosina-5'-Trifosfato-5'-Guanosina a la reacción de transcripción. El ARNm así obtenido se purificó y se resuspendió en agua.

Expresión de luciferasa *in vivo*

Para determinar la expresión de luciferasa *in vivo*, se inyectaron vía intradérmica cobayas con las cantidades indicadas de ARNm desnudo mediante inyección neumática.

- 20 Después de 24 h, se sacrificaron los animales y se recogieron las muestras (oreja, piel de la espalda o músculo), se congelaron a -78°C y se lisaron durante 3 minutos a toda velocidad en un lisador de tejidos (Qiagen, Hilden, Alemania). Luego se agregaron 600µl de tampón de lisis (Tris 25 mM, pH 7,5 (HCl), EDTA 2 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1%, DTT 2 mM, PMSF 1 mM) y las soluciones resultantes se sometieron otros 6 minutos a lisado tisular a toda velocidad. Después de 10 minutos de centrifugación a 13.500 rpm a 4°C, los sobrenadantes se mezclaron con tampón de luciferina (glicilglicina 25 mM, MgSO₄ 15 mM, ATP 5 mM, luciferina 62,5 µM) y se detectó la luminiscencia utilizando un luminómetro (Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania)).

Resultados:

- 30 Como primer resultado, se ha encontrado que la expresión de luciferasa codificada por un ARNm modificado aumenta mucho en cobayas mediante inyección neumática en comparación con la inyección de aguja intradérmica convencional (ver Fig. 1).

Además, se ha encontrado sorprendentemente que el nivel de saturación de la expresión podría aumentarse por inyección neumática en comparación con el ARNm inyectado convencionalmente con una jeringa de aguja (ver Fig. 2).

- 35 Inesperadamente, se podría demostrar además que la expresión de luciferasa de un ARNm modificado (PpLuc (GC)) por inyección neumática es significativamente mayor que la expresión de luciferasa de un ARNm de referencia no modificado (PpLuc (wt); ver Fig. 3).

Tabla 1

	Expresión de luciferasa	Efecto de inyección neumática	Efecto de la modificación	Efecto de la inyección neumática y la modificación
PpLuc(GC) 5µg - conv.	275476		123	
PpLuc(GC) 5 µg – neum.	2267492			1013
PpLuc(wt) 5 µg – conv.	2238			
PpLuc(wt) 5 µg – neum.	4469	2		
PpLuc(GC) 80 µg -conv.	1926120			117
PpLuc(GC) 80 µg – neum.	17932040			1089
PpLuc(wt) 80 µg - conv.	16471			
PpLuc(wt) 80 µg – neum.	27086	1,6		
mock	1107			

Por tanto, la modificación del ARN y la administración de dicho ARN modificado mediante inyección neumática actúan de forma sinérgica aumentando la expresión de la proteína codificada por el ARN (ver Tabla 1). En experimentos adicionales, se ha encontrado que el aumento adicional de la expresión, que se logró mediante inyección neumática utilizando el ARN modificado de acuerdo con la invención (ver la Tabla 2 a continuación; R1265, R2462, R1256, R2393), en comparación con el uso de un ARN de referencia no modificado (consulte la Tabla 2; R2652), se logró empleando diferentes ARN modificados, cada uno de los cuales comprendiendo una o más de varias modificaciones distintas. La Tabla 2 muestra el aumento de veces en la expresión de proteínas logrado mediante la administración de un ARN dado (por ejemplo, R1265) normalizada a la expresión de la proteína lograda mediante la administración del ARN respectivo por inyección intradérmica convencional usando una aguja. Por ejemplo, la expresión del ARN modificado R1265 se incrementa por la inyección neumática en un factor de 8,23 (en comparación con la expresión obtenida después de la inyección con aguja), mientras que la expresión de un ARN de referencia no modificado (R2652) se incrementa simplemente en un factor 2,00.

En este ejemplo, el aumento de expresión logrado por la modificación del ARN como se describe aquí es 4 veces con respecto a un ARN de referencia no modificado.

Tabla 2: Efecto de la inyección de chorro utilizando diferentes ARN modificados

	Efecto inyección neumática
PpLuc(nat)-A30 R2652	2,00
PpLuc(GC)-muag-A64-C30-HistonaSL R1265	8,23
PpLuc(GC)-A64-C30-HistonaSL R2462	6,25
PpLuc(GC)-muag-A64-C30 R1256	3,02
PpLuc(nat)-muag-A64-C30-HistonaSL R2393	2,86

2. Inducción de una respuesta inmune humoral por la vacuna de ARNm de RAV-G en humanos

Inmunización

Los resultados preliminares obtenidos en un ensayo clínico en curso (fase I) demuestran la seguridad y la eficacia de la vacuna de acuerdo con la invención. En el estudio clínico, a los voluntarios humanos se les inyectó vía intradérmica mediante inyección neumática utilizando un dispositivo Tropis en los días 0, 7 y 28 la vacuna R2403 de ARNm de RAV-G. El ARNm se preparó como se describe en el Ejemplo 1 de este documento, es decir, el ARNm complejado con protamina en una proporción de 2:1 (peso/peso) se mezcló con una cantidad igual de ARNm libre. En cada uno de los tres días de vacunación, se administraron 80 µg de ARNm.

Para evaluar el perfil de seguridad de la vacuna de acuerdo con la invención, los sujetos fueron monitoreados después de la administración (signos vitales, evaluaciones de tolerabilidad en el sitio de vacunación, análisis hematológico después de la segunda y tercera inyección). Los resultados preliminares obtenidos en el estudio clínico en curso sugieren que la inmunización con el ARNm de acuerdo con la invención es tolerada por humanos.

La eficacia de la inmunización se analizó determinando los títulos de virus (VNT) neutralizados en sueros de seis sujetos. Con este fin, se recogieron muestras de sangre el día 0 como punto de referencia y el día 42. Los sueros se analizaron para detectar anticuerpos neutralizantes de virus en la prueba de neutralización de virus de anticuerpos fluorescentes (FAVN) como se describe a continuación.

Ensayo de neutralización de virus

La detección de la respuesta del anticuerpo neutralizante del virus (respuesta inmune específica de células B) se llevó a cabo mediante un ensayo de neutralización viral. El resultado de ese ensayo se conoce como título de neutralización del virus (VNT). De acuerdo con las normas de la OMS, un título de anticuerpos se considera protector si el VNT respectivo es de al menos 0,5 IU/ml. Los sueros obtenidos como se describió anteriormente se usaron en una prueba de neutralización del virus de anticuerpos fluorescentes (FAVN) utilizando la cepa del virus de desafío (CVS) adaptada al cultivo celular del virus de la rabia según lo recomendado por la OIE (Organización Mundial de la Salud Animal) y se describe por primera vez en Cliquet F., Aubert M. y Sagne L. (1998); J. Immunol. Methods, 212, 79-87. Brevemente, los sueros inactivados por calor se probaron por cuadruplicado en series de dobles diluciones para su potencial de neutralizar 100 TCID₅₀ (dosis infecciosas de cultivo de tejidos 50%) de CVS en 50 µl de volumen. Así, las diluciones de suero se incubaron con virus durante 1 hora a 37°C (en incubadora húmeda al 5% de CO₂) y posteriormente se agregaron células BHK-21 tripsinizadas (4x10⁵ células/ml; 50 µl por pocillo). Los cultivos celulares infectados se incubaron durante 48 horas en una incubadora húmeda a 37°C y 5% de CO₂. La infección de las células se analiza después de la

5 fijación de las células con un 80% de acetona a temperatura ambiente utilizando el conjugado anti-rabia FITC. Las placas se lavaron dos veces usando PBS y se eliminó el exceso de PBS. Los cultivos celulares se puntúan positivos o negativos por la presencia del virus de la rabia. Las células marcadas negativamente en los sueros tratados representan la neutralización del virus de la rabia. Cada prueba FAVN incluye el suero estándar de la OMS o la OIE (suero de referencia positivo) que sirve como referencia para la estandarización del ensayo. La actividad de neutralización de los sueros de prueba se calcula con referencia al suero estándar proporcionado por la OMS y se muestra como Unidades internacionales/ml (IU / ml). Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Resultados:

10

Tabla 3

Sujeto nº	Titulación viral neutralizante (VNT, IU/ml)
1	4,0
2	0,7
3	0,2
4	0,7
5	1,4
6	0,5

En cinco de los seis sujetos (sujetos nº 1, 2, 4, 5 y 6), se detectó un título de neutralización de virus de al menos 0,5 IU/ml en el día 42. De acuerdo con el estándar de la OMS, se ha logrado una respuesta de anticuerpos protectores en estos sujetos, demostrando la eficacia de la inmunización con el ARNm de acuerdo con la invención.

15

Conclusión:

De acuerdo con los resultados preliminares del ensayo clínico en curso, el uso del ARNm de acuerdo con la invención para la inmunización de sujetos humanos tiene un perfil de seguridad favorable. La eficacia del enfoque ha sido demostrada por estos estudios preliminares con una respuesta de anticuerpos protectores (VNT > 0,5 IU/ml) lograda en el día 42 en cinco de los seis sujetos investigados.

20

3. Expresión de EPO *in vivo*

Para determinar la expresión de eritropoyetina *in vivo*, las cobayas se vía intradérmica con ARNm desnudo, ya sea mediante inyección de aguja convencional o mediante inyección neumática (3 animales por grupo, cada uno recibió 3 inyecciones de 80 µg de ARN por sitio de inyección). Después de 24 horas, se tomó una muestra de sangre de la vena safena. Los niveles de eritropoyetina en suero se determinaron mediante ELISA (kit de ELISA de eritropoyetina de ratón Quantikine, R&D Systems). Resultados: La expresión de EPO codificada por un ARNm modificado (HSD1 7B4-EPO(GC)-albumin7- A64-C30-histonaSL (R3135)) está fuertemente aumentada en cobayas mediante inyección neumática en comparación con la inyección de aguja intradérmica convencional (ver Fig. 13).

25

Inesperadamente, la expresión de EPO a partir de un ARNm modificado (HSD1 7B4-EPO(GC) -albumin7-A64-C30-histonaSL (R3135)) es significativamente más realizada por inyección neumática que la expresión de EPO a partir de un ARNm de referencia no modificado (EPO(wt)-A30 (R3513)) (ver Fig. 13).

30

4. Comparación de la inyección convencional y la inyección neumática de una vacuna RSV-F de ARNm para la inducción de una respuesta humoral en cobayas.

35

Preparación de constructos de ADN y ARNm:

Para los presentes ejemplos, se prepararon secuencias de ADN que codifican la proteína RSV-F de la cepa larga RSV (ATCC VR-26) y se usaron para reacciones de transcripción *in vitro* posteriores.

Proteína de fusión F de la cepa RSV ATCC VR-26 larga (secuencia de aminoácidos según SEQ ID No.63):

MELPILKANA ITTILAAVTF CFASSQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 LSNIKENKCN GTDAVKLIN QELDKYKNAV TELQLMQST TAANNRARRR LPRFMNYTLN
 NTKKTNVTLK KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GIAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
 LSNVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPVINKQ SCRISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
 AGVTPVSTY MLTNSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIEKEVLAYV
 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYV NQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHHVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSN

- De acuerdo con una primera preparación, se prepararon las secuencias de ADN que codifican los ARNm mencionados anteriormente. El constructo de ADN que codifica la secuencia de ARN R2510 (SEQ ID No: 64) se preparó introduciendo una 5'-TOP-UTR derivada de la proteína 32L ribosomal de acuerdo con la SEQ ID No. 55, modificando la secuencia de codificación de tipo salvaje introduciendo una GC secuencia optimizada para la estabilización, seguida de una secuencia estabilizadora derivada de 3'-UTR de albúmina (albúmina 7 de acuerdo con la SEQ ID No. 58), un tramo de 64 adenosinas (secuencia poli(A)), un tramo de 30 citosinas (secuencia poli(C)) y un tyallo-bucle de histona de acuerdo con la SEQ ID No. 44. En la Figura 14 se muestra la secuencia de ARNm correspondiente (R2510; SEQ ID No: 64).

10 Transcripción *in vitro*:

Los respectivos plásmidos de ADN preparados de acuerdo con el párrafo 1 se transcribieron *in vitro* utilizando polimerasa T7 en presencia de un análogo de CAP (m7GpppG). Posteriormente, el ARNm se purificó utilizando PureMessenger® (CureVac, Tubingen, Alemania; WO2008/077592 A1).

Reactivos:

- 15 Reactivo de complejación: protamina

Preparación de la vacuna:

El ARNm se complejó con protamina mediante la adición de protamina al ARNm en la proporción (1:2) (p/p) (componente adyuvante). Después de la incubación durante 10 minutos, se agregó la misma cantidad de ARNm libre que el ARN que proporciona antígeno.

- 20 Vacuna RSV-F larga (R2510): que comprende un componente adyuvante que consiste en un ARNm que codifica la proteína RSV F larga (R2510) de acuerdo con la SEQ ID No. 63 complejado con protamina en una proporción 2:1 (p p) y el ARNm libre proporcionando el antígeno que codifica la proteína RSV F larga (R2510) de acuerdo con la SEQ ID No. 63 (relación 1:1; ARN complejado:ARN libre).

Inmunización

- 25 En el día cero, las cobayas hembra (n = 8 / grupo) se inyectaron vía intradérmica (id) con la vacuna de ARNm RSV-F descrita anteriormente (80 µg de R2510/ratón/ día de vacunación) 1 x 100 µl, con convencional inyección convencional de aguja (id), 4 x 25 µl con inyección de aguja (id), o 1 x 100 µl con inyección neumática (id) como se muestra en la Tabla 4. Un grupo de control (n = 2) se inyectó con aguja vía intramuscular (i.m.) con 20 µg de RSV largo inactivado (2 x 50 µl). El "Antígeno del virus sincitial respiratorio" inactivado (RSV largo inactivado) se adquirió de INSTITUT VIRION/SERION GmbH-SERION IMMUNDIAGNOSTICA GmbH. El virus inactivado se diluyó en PBS estéril, consiguiéndose una concentración final de 0,2 µg/µl. Todos los animales recibieron inyecciones de refuerzo los días 14 y 28. Las muestras de sangre se recogieron el día 3 (tres días antes de la primera vacunación) y los días 7, 21 y 42 para determinar los títulos de anticuerpos anti-RSV F.

Tabla 4: Grupos de animales

Grupo	Raza, sexo	Nº de ratones	Volumen, vía	Dosis vacuna	Día vacunación	Día sangrado
1	Cobayas, hembra	8	1x100 µl, id, convencional	R2510 80µg	0,14,28	-3,7,21,42
2	Cobayas, hembra	8	4x25 µl, id, convencional	R2510 80µg	0,14,28	-3,7,21,42

3	Cobayas, hembra	8	1x100 µl, id, neumática	R2510 80µg	0,14,28	-3,7,21,42
4	Cobayas, hembra	2	2x50 µl, im, convencional	RSV larga inactiva, 20µg	0,14,28	-3,7,21,42

Determinación de anticuerpos de proteína anti-RSV F por ELISA

Las placas ELISA se recubrieron con RSV-LONG inactivado (Virion/Serion, concentración final 5µg/ml) (Sino Biological Inc.). Las placas recubiertas se incubaron con suero de cobaya utilizando las diluciones indicadas (1:50 a 1:3906250 en etapas de dilución 5x) y se detectó la unión de anticuerpos específicos a la proteína F utilizando anticuerpos anti-cobaya específicos para el isotipo biotinilados IgG1 y IgG2a en combinación con Estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) con el sustrato sal de 2,2-azinobis[ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]-diamonio (ABTS).

Títulos de anticuerpos neutralizantes de RSV (VNT)

Los sueros se analizaron para determinar los títulos de neutralización del virus (VNT). Brevemente, las muestras de suero se diluyeron 1:1 con medio mínimo esencial de Eagle (EMEM), se inactivaron por calor y se diluyeron en serie 1:4. Las muestras de suero diluidas se incubaron con RSV (25-50 PFU) durante una hora a temperatura ambiente y se inocularon por duplicado en monocapas de células HEP-2 confluentes en placas de 24 pocillos. Después de una hora de incubación a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂, los pocillos se cubrieron con 0,75% de medio de metilcelulosa. Después de 4 días de incubación, se retiró el recubrimiento y las células se fijaron con una tinción de violeta cristal al 0,1% durante una hora y luego se enjuagaron y se secaron al aire. Los correspondientes títulos de anticuerpos neutralizantes recíprocos se determinaron en el punto final de reducción del 60% del control del virus.

Resultados

Como se muestra en la Figura 15, la vacuna de ARNm RSV-F ya indujo anticuerpos anti-proteína F de la subclase IgG1 (A) y la subclase IgG2a (B) el día 21 (una semana después de la primera vacunación de refuerzo del día 14) cuando la vacuna se administró mediante inyección neumática (1 x 100 µl). Se alcanzaron títulos de anticuerpos comparables solo en el día 42 (dos semanas después de la segunda vacunación de refuerzo el día 28) cuando la vacuna se administró mediante inyección de aguja convencional (4 x 25 µl). Así, la vacuna de ARNm RSV-F administrada por inyección neumática indujo una respuesta inmune humoral contra la proteína RSV-F con una cinética más rápida en comparación con la administración por inyección de aguja convencional.

Como se muestra en la Figura 16, los títulos significativos de neutralización del RSV solo se midieron el día 42 cuando la vacuna se administró mediante inyección neumática (100 µl). Por tanto, la vacunación con inyección neumática conduce a un inicio más rápido de las respuestas inmunes que la inyección con aguja convencional.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CureVac GmbH

<120> Método para aumentar la expresión de proteínas codificadas por ARN

<130> CU01P139W01

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ic)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(8)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(14)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<400> 1

ngnnnnnnun nnnncn

16

<210> 2

<211> 26

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIc)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(6)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(13)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(19)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(24)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<400> 2
 nnnnnngnnn nnnunnnnnc nnnnnn

26

<210> 3
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Id)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(14)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<400> 3
 ncnnnnnnun nnnngn

16

<210> 4
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IID)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(6)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(13)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(19)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(23)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(26)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<400> 4
 nnnnnncnnn nnnunnnng nnnnnn

26

<210> 5
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ie)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(14)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<400> 5
 dgnnnnnnun nnnch

16

<210> 6
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIe)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(13)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(19)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(23)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(26)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
puede estar presente o no

<400> 6
nnnnndgnnn nnnunnnnnc hnnnnn

26

<210> 7
<211> 16
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (If)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<400> 7
ngnbyynnun vndncn

16

<210> 8
<211> 26
<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (II f)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos; puede estar presente o no

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(6)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(23)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(26)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos; puede estar presente o no

<400> 8

nnnnnngnby ynnunvndnc nnnnnn

26

<210> 9

<211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ig)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<400> 9
 nghyyydnuh abrdcn

16

<210> 10
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIg)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(6)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(23)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>

<221> misc_feature
 <222> (24)..(25)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> puede estar presente o no

<400> 10
 nnhnnnghyy ydnuhabrdc nnnnnh

26

<210> 11
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ih)

<400> 11
 dghycudyuh asrrcc

16

<210> 12
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIh)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> puede estar presente o no

<400> 12

nhaahdghyc udyuhasrrc cvhbnh	26
<p><210> 13 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
<p><220> <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ic)</p>	
<400> 13 vgyyyhhth rvvrbc	16
<p><210> 14 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
<p><220> <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ic)</p>	
<400> 14 sgyyttypm arrrcs	16
<p><210> 15 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
<p><220> <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ic)</p>	
<400> 15 sgyyctttm agrrcs	16
<p><210> 16 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
<p><220> <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ie)</p>	
<p><220> <221> misc_feature <222> (3)..(5) <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos</p>	
<p><220> <221> misc_feature <222> (7)..(8) <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos</p>	

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<400> 16
 dgnnnbnnth vnnnch

16

<210> 17
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ie)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<400> 17
 rgnnnyhbth rdnnncy

16

<210> 18
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ie)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<400> 18
 rgndbyhyth rdhnicy

16

<210> 19
 <211> 16
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (If)

<400> 19

vgyytyhth rvrrcb

16

<210> 20

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (If)

<400> 20

sgyycttytm agrrcs

16

<210> 21

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (If)

<400> 21

sgyycttttm agrrcs

16

<210> 22

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ig)

<400> 22

ggyycttyth agrrc

16

<210> 23

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ig)

<400> 23

ggcycttytm agrgcc

16

<210> 24

<211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ig)

<400> 24
 ggctottttm agrgcc 16

<210> 25
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ih)

<400> 25
 dghyctdyth asrrcc 16

<210> 26
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ih)

<400> 26
 ggcyctttth agrgcc 16

<210> 27
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (Ih)

<400> 27
 ggcycttttm agrgcc 16

<210> 28
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIc)

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<400> 28
 hhhhvvggyy yhhthrvvrc bvhnn 26

<210> 29
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIc)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> puede estar presente o no

<400> 29
 mhmhmsgyyy ttytmarrcc smchhh 26

<210> 30
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIc)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> puede estar presente o no

<400> 30
 mmmmmmsgyyc ttttmagrrc sachmh 26

<210> 31
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIe)

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(10)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(19)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(26)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

 <400> 31
 nnnnndgnnn bnnthvnnnc hnhnnn

26

<210> 32
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIe)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(10)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<400> 32
 nnhhnrgnnn yhbthrdnnc ydhnn

26

<210> 33
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIe)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(26)
 <223> puede estar presente o no

<400> 33
 nhhhvrgndb yhythrdhnc yrhhhh

26

<210> 34
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIif)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<400> 34
 hhmhmvgyyy tyhthrvrrc bvmhnn

26

<210> 35
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIIf)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> puede estar presente o no

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> puede estar presente o no

<400> 35
mmmmmsgyyc ttytmagrrc smchhh

26

<210> 36
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIIf)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> puede estar presente o no

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(26)
<223> puede estar presente o no

<400> 36
mmmmmsgyyc ttttmagrrc sachmh

26

<210> 37
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIg)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> puede estar presente o no

<220>
<221> misc_feature

<222> (24)..(25)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> puede estar presente o no

<400> 37
 hhmamggyc ttythagrrc cvhnm

26

<210> 38
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIg)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(26)
 <223> puede estar presente o no

<400> 38
 hhaamggyc ttytmagrgc cvchm

26

<210> 39
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIg)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(26)
 <223> puede estar presente o no

<400> 39
 mmaamggctc ttttmagrgc cmcymn

26

<210> 40
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIh)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
 puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> puede estar presente o no

<400> 40
 nhaahdghyc tdythasrrc cvhbnh

26

<210> 41
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIh)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> puede estar presente o no

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)

<223> puede estar presente o no

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n es a, u, t, g, y c, o un análogo nucleotídico de los mismos;
puede estar presente o no

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> puede estar presente o no

<400> 41

hhaamggcyc tttthagrgc cvmynm

26

<210> 42

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de acuerdo con la fórmula (IIh)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> puede estar presente o no

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(26)

<223> puede estar presente o no

<400> 42

hmaaaggcyc ttttmagrgc crmyhm

26

<210> 43

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de horquilla de histona específica

<400> 43

caaaggctct tttcagagcc acca

24

<210> 44

<211> 24

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 702 466 T3

<223> Secuencia de horquilla de histona específica

<400> 44

caaaggcucu uuucagagcc acca

24

<210> 45

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> UTR mutada de (alfa-)globina

<400> 45

gcccgatggg cctcccaacg ggccctcctc ccctccttgc accg

44

<210> 46

<211> 1870

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia ARNm ppluc(gc)-muag-a64-c30-histonaSL

<400> 46

gggagaaagc uugaggaugg aggacgcaa gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua 60

cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaagc gguacgcccu 120

ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180

guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240

ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcugggcgc 300

ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360

gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420

gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa 480

gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgccggg 540

cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgccugau 600

caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc 660

cugcgugcgc uucucgcacg cccgggaccc caucuucggc aaccagauca ucccggacac 720

cgccauccug agcguggugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga ccugggcua 780

ccucaucugc ggcuuccggg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg 840

gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccugug ucagcuucuu 900

cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg 960

ES 2 702 466 T3

gggcgccccg cugagcaagg agguggggcga ggccguggcc aagcgguucc accucccggg 1020
 cauccgccag ggcuacggcc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg 1080
 ggacgacaag ccgggcgccg ugggcaaggu ggucccgguuc uucgaggcca agguggugga 1140
 ccuggacacc ggcaagaccc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcggggggc 1200
 gaugaucaug agcggcuaag ugaacaacc ggaggccacc aacgcccua ugcacaagga 1260
 cggcuggcug cacagcgcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu 1320
 cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgccgg ccgagcugga 1380
 gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgccggc guggccgggc ugccggacga 1440
 cgacgccggc gagcugccgg ccgcgugggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500
 gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcgg 1560
 cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
 ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggaagauc gccguguaag acuaguuaa 1680
 agacugacua gcccgaugg ccucccaacg ggcccuccuc cccuccuugc accgagaua 1740
 auaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1800
 aaaaaaugca ucccccccc ccccccccc ccccccccc ccaaaggcuc uuuucagagc 1860
 caccagaauu 1870

<210> 47
 <211> 1712
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PpLuc(wt) -A30

<400> 47
 gggagaaagc uuaccaugga agacgcaaaa aacauaaaga aaggcccggc gccauucua 60
 ccuuuagagg auggaaccgc uggagagcaa cugcauaagg cuaugaagag auacgccug 120
 guuccuggaa caauugcuuu uacagaugca cauaucgagg ugaacaucac guacgaggaa 180
 uacuucgaaa uguccguucg guuggcagaa gcuaugaaac gauaugggcu gaauacaaau 240
 cacagaaucg ucguaugcag ugaaaacucu cuucaauucu uuaugccggg guugggcgcg 300
 uuauuuauagc gaguugcagu ugcgcccggc aacgacauuu auaaugaacg ugaauugcuc 360
 aacaguauga acuuucgca gccuaccgua guguuuuuu ccaaaaaggg guugcaaaaa 420
 auuuugaacg ugcaaaaaaa auuaccaaua auccagaaaa uuauuaucau ggauucuaaa 480

ES 2 702 466 T3

acggauuacc agggauuuca gucgauguac acguucguca caucucaucu accucccggu 540
uuuaaugaau acgauuuugu accagagucc uuugaucgug acaaaacaau ugcacugaua 600
augaauagcu cuggaucuac uggguuaccu aagggugugg ccuuccgca uagaacugcc 660
ugcgucagau ucucgcaugc cagagaucuu auuuuuggca aucaaaucan uccggauacu 720
gcgauuuuaa guguuguucc auuccaucac gguuuuggaa uguuuacuac acucggauau 780
uugauaugug gauuucgagu cgucuaaau uauagauuug aagaagagcu guuuuuacga 840
ucccuucagg auuacaaaa ucaaagugcg uugcuaguac caaccuauu uucauucuu 900
gccaaaagca cucugauuga caaaucgcu uuaucuaau uacacgaaau ugcuuucggg 960
ggcgcaccuc uuucgaaaga agucggggaa gcgguugcaa aacgcuucca ucuuccaggg 1020
auacgacaag gauaugggcu cacugagacu acaucagcua uucugauuac acccgagggg 1080
gaugauaaac cgggcgcggu cgguaaagu guuccauuuu uugaagcga gguuguggau 1140
cuggauaccg ggaaaacgcu gggcguaau cagagaggcg aauuugugu cagaggaccu 1200
augauuangu ccgguaugu aaacaauccg gaagcgacca acgccuugau ugacaaggau 1260
ggauggcuac auucuggaga cauagcuuac ugggacgaag acgaacacuu cuucauaguu 1320
gaccgcuuga agucuuuaa uaaauacaaa ggauaucagg uggccccgc ugaauuggaa 1380
ucgauuuugu uacaacaccc caacaucuu gacgcggcg uggcaggucu ucccgacgau 1440
gacgccggug aacuuccgc cgccguuguu guuuuggagc acggaaagac gaugacggaa 1500
aaagagaucg uggauuacgu cgccagucan gaaacaaccg cgaaaaagu gcgcggagga 1560
guuguguuug uggacgaagu accgaaaggu cuuaccgga aacucgacgc aagaaaauc 1620
agagagaucc ucauaaaggc caagaagggc ggaaagucca aauugugagg acuaguagau 1680
cuaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aa 1712

<210> 48
<211> 1746
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> R3454: PpLuc(wt)-A64

<400> 48
gggagaaagc uuaccaugga agacgcaaaa aacauaaaga aaggcccggc gccauucua 60
ccuuuagagg auggaaccgc uggagagcaa cugcauaagg cuangaagag auacgcccug 120
guuccuggaa caauugcuuu uacagaugca cauauaggag ugaacaucac guacgcggaa 180

ES 2 702 466 T3

uacuucgaaa uguccguucg guuggcagaa gcuaugaaac gauaugggcu gaauacaaau 240
 cacagaauucg ucguaugcag ugaaaacucu cuucaauucu uuaugccggu guugggcgcg 300
 uuauuuauucg gaguugcagu ugcgcccgcg aacgacauuu auaaugaacg ugaauugcuc 360
 aacaguauga acauuucgca gccuaccgua guguuuuuu ccaaaaaggg guugcaaaaa 420
 auuuugaacg ugcaaaaaa auuaccaua auccagaaaa uuauuaucau ggauucuaaa 480
 acggauuacc agggauuucg gucgauguac acguucguca caucucaucu accucccggu 540
 uuuaaugaau acgauuuugu accagagucc uuugaucgug acaaaacaau ugcacuguaa 600
 augaauagcu cuggaucuac uggguuaccu aaggguugug cccuuccgca uagaacugcc 660
 ugcgucagau ucucgcaugc cagagaucuu auuuuuggca aucaaaucuu uccggauacu 720
 gcgauuuuaa guguuguucc auuccaucac gguuuuggaa uguuuacuac acucggauau 780
 uugauaugug gauuucgagu cgucuuuauug uauagauuug aagaagagcu guuuuuacga 840
 ucccuucagg auuacaaaau ucaaagugcg uugcuaguac caaccuauu uucauucuu 900
 gccaaaagca cucugauuga caaaucgcu uuauucuuuu uacacgaaau ugcuucuggg 960
 ggcgcaccuc uuucgaaaga agucgggaa gcgguugcaa aacgcuucca ucuuccaggg 1020
 auacgacaag gauaugggcu cacugagacu acaucagcua uucugauuac acccgagggg 1080
 gaugauaaac cgggcgcggu cgguaaagu guuccauuuu uugaagcgaa gguuguggau 1140
 cuggauaccg ggaaaacgcu gggcguaau cagagaggcg aauuugugu cagaggaccu 1200
 augauuauugu ccgguuuugu aaacaauccg gaagcgacca acgccuugau ugacaaggau 1260
 ggauggcuac auucuggaga cauagcuuac ugggacgaag acgaacacuu cuucauaguu 1320
 gaccgcuuga agucuuuuu uaaaucaaa ggauaucagg uggccccgc ugaauuggaa 1380
 ucgauuuugu uacaacacc caaucuuc gacgcggcg uggcaggucu ucccgcgcu 1440
 gacgccggug aacuuccgc cgccguugu guuuuggagc acggaagac gaugacggaa 1500
 aaagagaucg uggauuacgu cgccagucua guaacaaccg cgaaaagu ggcgggagga 1560
 guuguguuug uggacgaagu accgaaaggu cuuaccggaa aacucgacgc aagaaaauc 1620
 agagagaucc ucauaaaggc caagaaggc ggaaagucca aauugugagg acuaguagau 1680
 cuaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1740
 aaaaaa 1746

<210> 49
 <211> 1810

ES 2 702 466 T3

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> R2462: PpLuc(GC)-A64-C30-HistonaSL

<400> 49

```

gggagaaagc uugaggaugg aggacgcca gaacaucagc aagggcccg cgccuucua      60
ccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugagc gguacgccu      120
ggugccgggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga      180
guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa      240
ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcuggggcg      300
ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu      360
gaacagcaug gggaucagcc agccgaccgu gguguuugug agcaagaagg gccugcagaa      420
gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa      480
gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgcggg      540
cuucaacgag uaccgcuucg ucccggagag cuucgacccg gacaagacca ucgcccugau      600
caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccucgccc accggaccgc      660
cugcgugcgc uucucgcacg cccgggaccc caucuuccgc aaccagauca ucccggacac      720
cgccauccug agcguugugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga ccugggcua      780
ccucaucugc ggcuuccggg ugguccugau guaccgguc gaggaggagc uguuccugcg      840
gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccucgu ucagcuucuu      900
cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg      960
gggcgccccg cugagcaagg aggugggcga ggccguggcc aaycgguucc accuccggg      1020
cauccgccag qgcuaacggc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgagg      1080
ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaagg uguccccuuc uucgaggcca agguggugga      1140
ccuggacacc ggcgaagacc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ucggggggcc      1200
gaugaucaug agcggcuacg ujaacaacc ggaggccacc aacgcccua ucgacaagga      1260
cggcuggcug cacagcggcg acaucgcuca cugggacgag gacgagcacu ucucaucgu      1320
cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag gugggcocgg ccgagcugga      1380
gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgaagccggc guggccgggc ugccggacga      1440
cgacgcccgc gajcugcccg ccgcguggu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga      1500
gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcg      1560

```

ES 2 702 466 T3

cgugguguuuc guggacgagg ucccgaaggg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
 ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaaggg cggcaagauc gccguguaag acuaguagau 1680
 cuaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1740
 aaaaaaugca uccccccccc ccccccccc ccccccccc ccaaaggcuc uuuucagagc 1800
 caccagaauu 1810

<210> 50
 <211> 1846
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> R1256: PpLuc (GC) -muag-A64-C30

<400> 50
 gggagaaagc uugaggauug aggacgcaa gaacaucaag aagggcccgg cgcccuucua 60
 cccgcuggag gacgggaccg ccggcgagca gcuccacaag gccaugaaag gguacgcccu 120
 ggugcccggc acgaucgccu ucaccgacgc ccacaucgag gucgacauca ccuacgcgga 180
 guacuucgag augagcgugc gccuggccga ggccaugaag cgguacggcc ugaacaccaa 240
 ccaccggauc guggugugcu cggagaacag ccugcaguuc uucaugccgg ugcuggggcg 300
 ccucuucauc ggcguggccg ucgccccggc gaacgacauc uacaacgagc gggagcugcu 360
 gaacagcaug gggaucaagg agccgaccgu gguguucgug agcaagaagg gccugcagaa 420
 gauccugaac gugcagaaga agcugcccau cauccagaag aucaucauca uggacagcaa 480
 gaccgacuac cagggcuucc agucgaugua cacguucgug accagccacc ucccgccggg 540
 cuucaacgag uacgacuucg ucccggagag cuucgaccgg gacaagacca ucgcccugau 600
 caugaacagc agcggcagca ccggccugcc gaagggggug gccugccgc accggaccgc 660
 cugcgugcgc uucucgcacg cccgggacc caucuucggc aaccagauca ucccggacac 720
 cgccauccug agcguggugc cguuccacca cggcuucggc auguucacga ccuggggcu 780
 ccucaucugc ggcuuuccgg ugguccugau guaccgguuc gaggaggagc uguuccugcg 840
 gagccugcag gacuacaaga uccagagcgc gcugcucgug ccgaccucgu ucagcuucuu 900
 cgccaagagc acccugaucg acaaguacga ccugucgaac cugcacgaga ucgccagcgg 960
 gggcgccccg cugagcaagg aggugggcca ggccguggcc aagcgguucc accuccggg 1020
 cauccgccag ggcuaacggc ugaccgagac cacgagcgcg auccugauca cccccgaggg 1080
 ggacgacaag ccgggcgccc ugggcaaggu ggucccguuc uucgaggcca agguggugga 1140

ES 2 702 466 T3

ccuggacacc ggcaagaccc ugggcgugaa ccagcggggc gagcugugcg ugcggggggc 1200
 gaugaucaug agcggcuacg ugaacaaccc ggaggccacc aacgcccuca ucgacaagga 1260
 cggcuggcug cacagcggcg acaucgccua cugggacgag gacgagcacu ucuucaucgu 1320
 cgaccggcug aagucgcuga ucaaguacaa gggcuaccag guggcgccgg ccgagcugga 1380
 gagcauccug cuccagcacc ccaacaucuu cgacgcccggc guggccgggc ugccggacga 1440
 cgacgcccggc gagcugcccgg ccgcgguugu ggugcuggag cacggcaaga ccaugacgga 1500
 gaaggagauc gucgacuacg uggccagcca ggugaccacc gccagaagc ugcggggcg 1560
 cgugguguuc guggacgagg ucccgaagg ccugaccggg aagcucgacg cccggaagau 1620
 ccgcgagauc cugaucaagg ccaagaagg cggcaagauc gccguguaag acuaguuaa 1680
 agacugacua gcccgauggg ccucccaacg ggcccuccuc ccuccuugc accgagauua 1740
 auaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1800
 aaaaaaugca uccccccccc cccccccccc cccccccccc cucuag 1846

<210> 51
 <211> 1870
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> R2393: PpLuc(nat)-muag-A64-C30-HistonaSL

<400> 51
 gggagaaagc uuaccaugga agacgccaaa aacauaaaga aaggcccggc gccauucua 60
 ccuuuagagg auggaaccgc uggagagcaa cugcauaagg cuaugaagag auacgcccug 120
 guuccuggaa caauugcuuu uacagaugca cauauagagg ugaacaucac guacgcccga 180
 uacuucgaaa uguccguucg guuggcagaa gcuaugaaac gauaugggcu gaauacaaau 240
 cacagaauagc ucguaugcag ugaaaacucu cuucaauucu uuaugccggg guugggcgcg 300
 uuauuuauagc gaguugcagu ugcgcccggc aacgacauuu auaaugaacg ugaauugcuc 360
 aacaguauga acuuuucgca gccuaccgua guguuuuuu ccaaaaaggg guugcaaaaa 420
 auuuugaacg ugcaaaaaaa auuaccaaua auccagaaaa uuauuaucau ggauucuaaa 480
 acggauuacc agggauuuca gucgauguac acguucguca caucucaucu accucccggu 540
 uuuaaugaa acgauuuugu accagagucc uuugaucgug acaaaacaau ugcacugua 600
 augaaugcu cuggaucuac uggguuaccu aaggguugug cccuuccgca uagaacugcc 660
 ugcgucagau ucucgcaugc cagagaucuu auuuuuggca aucaaaucuu uccggauacu 720

ES 2 702 466 T3

gcgauuuuaa guguuguucc auuccaucac gguuuuggaa uguuuacuac acucggauau 780
 uugauaugug gauuucgagu cgucuaaauug uauagauuug aagaagagcu guuuuuacga 840
 ucccuucagg auuacaaaau ucaaagugcg uugcuaguac caaccuauu uucauucuuc 900
 gccaaaagca cucugauuga caaaauacgau uuaucuauuu uacacgaaau ugcuucuggg 960
 ggcgcaccuc uuucgaaaga agucggggaa gcgguugcaa aacgcuucca ucuuccaggg 1020
 auacgacaag gauaugggcu cacugagacu acaucagcua uucugauuac acccgagggg 1080
 gaugauaaac cgggcgcggu cgguaaaguu guuccauuuu uugaagcgaa gguuguggau 1140
 cuggauaccg ggaaaacgcu ggcgguuuau cagagaggcg aaauaugugu cagaggaccu 1200
 augauuaugu ccgguuaugu aaacaauccg gaagcgacca acgccuugau ugacaaggau 1260
 ggauggcuac auucuggaga cauagcuuac ugggacgaag acgaacacuu cuucauaguu 1320
 gaccgcuuga agucuuuaau uaaauacaaa ggauaucagg uggccccgc ugaauuggaa 1380
 ucgauuaugu uacaacaccc caacaucuuc gacgcgggcg uggcaggucu ucccgacgau 1440
 gacgccggug aacuucccg cgccguuguu guuuuggagc acggaagac gaugacggaa 1500
 aaagagaucg uggauuacgu cgccagucua guaacaaccg cgaaaaaguu gcgcggagga 1560
 guuguguuug uggacgaagu accgaaaggu cuuaccggaa aacucgacgc aagaaaaauc 1620
 agagagaucc ucauaaaggc caagaagggc ggaaagucca aaugugagg acuaguuua 1680
 agacugacua gcccgauugg ccuccaaccg ggcccuccuc cccuccuugc accgagauua 1740
 auaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1800
 aaaaaaugca ucccccccc ccccccccc ccccccccc ccaaaggcuc uuuucagagc 1860
 caccagaauu 1870

<210> 52

<211> 1792

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> R2403: RAV-G(GC)-muag-A64-C30-histonaSL

<400> 52

gggagaaagc uuaccauggu gcccaggcc cugcucuucg ucccgcuugc gguguuuccc 60
 cucugcuucg gcaaguucc caucuacacc auccccgaca agcuggggcc guggagcccc 120
 aucgacauc accaccuguc cugcccac aaccucgug ucgaggacga gggcugcacc 180
 aaccugagcg gguucucca cauggagcug aaggugggcu acaucagcgc caucaaug 240

ES 2 702 466 T3

aacggguuca cgugcaccgg cguggucacc gaggcggaga ccuacacgaa cuucgugggc 300
 uacgugacca ccaccuucaa gcggaagcac uuccgcccc a gcccggacgc cugccggggc 360
 gccuacaacu ggaagauggc cggggacccc cgcuacgagg agucccucca caaccccuac 420
 cccgacuacc acuggcugcg gaccgucaag accaccaagg agagccuggu gaucaucucc 480
 ccgagcgugg cggaccucga ccccuacgac cgcucccugc acagccgggu cuccccggc 540
 gggaacugcu ccggcguggc cgugagcucc acguacugca gcaccaacca cgacuacacc 600
 aucuggaugc ccgagaaccc gcgccugggg auguccugcg acaucuucac caacagccgg 660
 ggcaagcgcg ccuccaaggg cagcgagacg ugcggguucg ucgacgagcg gggccucua 720
 aagucccuga agggggccug caagcugaag cucugcggcg ugcugggccu gcgccucaug 780
 gacgggaccu ggguggcgau gcagaccagc aacgagacca aguggugccc ccccggccag 840
 cuggucaacc ugcacgacuu ccggagcgcg gagaucgagc accucguggu ggaggagcug 900
 gucaagaagc gcgaggagug ccuggacgcc cucgagucca ucaugacgac caagagcgug 960
 uccuuccggc gccugagcca ccugcggaa g cucgugccc gguucggcaa ggccuacacc 1020
 aucuucaaca agaccugau ggaggccgac gccacuaca aguccguccg cacguggaac 1080
 gagaucaucc cgagcaaggg gugccugcgg gugggcggcc gcugccaccc ccacgucaac 1140
 gggguguucu ucaacggcau cauccucggg cccgacggca acgugcugau ccccgagaug 1200
 caguccagcc ugcuccagca gcacauggag cugcuggucu ccagcgugau cccgcucaug 1260
 cccccucgg cggaccccuc caccguguuc aagaacgggg acgaggccga ggacuucguc 1320
 gaggugcacc ugcccgacgu gcacgagcgg aucagcggcg ucgaccucgg ccugccgaac 1380
 ugggggaagu acgugcugcu cuccgccggc gccucgaccg ccugaugcu gaucaucuuc 1440
 cucaugaccu gcuggcggc ggugaaccgg agcgagcca cgcagcaca ccugcgggg 1500
 accggccggg aggucuccgu gaccccgag agcgggaaga ucaucuccag cugggagucc 1560
 uacaagagcg gcggcgagac cgggcuguga ggacuaguua uaagacugac uagcccgaug 1620
 ggccucccaa cgggccucc uccccuccu gcaccgagau uaauaaaaa aaaaaaaaaa 1680
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaug caucuuuuuu 1740
 ccccccccc ccccccccc ccccaaaggc uuuuuucaga gccaccagaa uu 1792

<210> 53
 <211> 638
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 702 466 T3

<220>

<223> R3513: EPO(wt.)-A30

<400> 53

```

gggagaaagc uuaccauggg ggugcccga a cgucccaccc ugcugcuuuu acucuccuug      60
cuacugauuc cucugggccu cccaguccuc ugugcucucc cagccucau cugcgacagu      120
cgaguucugg agagguacau cuuagaggcc aaggaggcag aaaaugucac gauggguugu      180
gcagaagguc ccagacugag ugaaaaauu acagucccag auaccaagu caacuucua      240
gcuuggaaaa gauggaggu ggaagaacag gccauagaag uuuggcaagg ccugucccug      300
cucucagaag ccauccugca ggcccaggcc cugcuagcca auuccucca gccaccagag      360
accuucagc uucauauaga caaagccauc aguggucua c guagccuac uucacugcu      420
cggguacugg gagcucagaa ggaauugaug ucgccuccag auaccacccc accugcucca      480
cuccgaacac ucacagugga uacuucugc aagcucuucc gggucua cgc caacuuccuc      540
cgggggaaac ugaagcugua cacgggagag gucugcagga gaggggacag gugaccacua      600
guagaucuaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa      638

```

<210> 54

<211> 981

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> R3135: HSD17B4-EPO (GC)-albumina7-A64-C30-histonaSL

<400> 54

```

gggucccgca gucggcgucc agcggcucug cuuguucgug ugugugucgu ugcaggccuu      60
auucaagcuu accaugggcg ugcccagcgc gccgaccucg cuccugcugc ucagccugcu      120
gcucaucucc cuggggcugc ccguccucug ccccccccg cgccugaucu gcgacucccg      180
ggugcuggag cgcua caucc ucgaggcaa ggaggcggag aacgugacca ugggcugcgc      240
cgaggggccc cggcugagcg agaacaucac gguccccgac accaagguga acuucua cgc      300
cuggaagcgc auggaggugg aggagcagg caucgagguc uggcagggcc uguccuccu      360
gagcgaggcc auccugcagg cgcaggccu ccuggccaac uccagccagc ccccgagac      420
acugcagcuc cacaucgaca aggccaucuc cgggcugcgg agccugaccu ccuuccugc      480
cgugcugggc gcgcagaagg agcucaugag cccgcccgac acgaccccc cggccccgcu      540
gcggaccucg accguggaca cguucugcaa gcucuuccgc gucuacgcca acuuccugc      600
gggcaagcug aagcucuaca cgggggaggu gugccgccg ggcgaccgcu gaccacuagu      660

```

ES 2 702 466 T3

gcaucacauu uaaaagcauc ucagccuacc augagaauaa gagaaagaaa augaagauca 720
 auagcuuauu caucucuuuu ucuuuuucgu ugguguaaag ccaacacccu gucuaaaaaa 780
 cauaaaauuc uuuaaucauu uugccucuuu ucucugugcu ucaauuaaua aaaauggaa 840
 agaaccuaga ucuaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 900
 aaaaaaaaaa aaaaaaugc aucccccccc ccccccccc ccccccccc cccaaaggcu 960
 cuuuucagag ccaccagaau u 981

<210> 55
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 ggcgctgcct acggaggtgg cagccatctc ettctcggca tc 42

<210> 56
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 gcggctcggc cattttgtcc cagtcagtcc ggaggctcgc gctgcagaag taccgctgc 60
 ggagtaactg caaag 75

<210> 57
 <211> 186
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 57
 catcacatctt aaaagcatct cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa 60
 aagcttattc atctgttttt ctttttcggt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac 120
 ataaatttct ttaatcattt tgcctctttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa 180
 gaatct 186

<210> 58
 <211> 186
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 catcacatctt aaaagcatct cagcctacca tgagaataag agaaagaaaa tgaagatcaa 60
 tagcttattc atctcttttt ctttttcggt ggtgtaaagc caacaccctg tctaaaaaac 120

ES 2 702 466 T3

ataaatttct ttaatcattt tgccctctttt ctctgtgctt caattaataa aaaatggaaa 180
 gaacct 186

<210> 59
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 gctggagcct cggtggccat gcttcttgcc ccttgggctt cccccagcc cctcctcccc 60
 ttcttgcacc cgtacccccg tggctcttga ataaagtctg agtgggcggc 110

<210> 60
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 gctggagcct cggtagccgt tctctctgcc cgctgggctt cccaacgggc cctcctcccc 60
 tccttgcacc ggcccttctt ggtctttgaa taaagtctga gtgggcag 108

<210> 61
 <211> 132
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggcttctt tgttccctaa gtccaactac 60
 taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcctaat aaaaaacatt 120
 tattttcatt gc 132

<210> 62
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Porción de unión del complejo-alfa central de la 3'UTR de un gen de
 alfa-globina

<400> 62
 gcccgatggg cctccaacg ggccctcctc cctccttgc accg 44

<210> 63
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> Virus respiratorio sincitial

ES 2 702 466 T3

<400> 63

Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50 55 60

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Asn
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Thr Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Asn Val Thr
115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
195 200 205

Lys Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
210 215 220

ES 2 702 466 T3

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

ES 2 702 466 T3

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His His Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 64
<211> 2107
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RSV-F-LONG (GC) R2510

<400> 64
ggggcgcguc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu accauggagc 60
ugcccauccu caaggccaac gccaucacca ccauccuggc ggccgugacg uucugcuucg 120
ccagcuccca gaacaucacc gaggaguucu accagagcac cugcuccgcc gucagcaagg 180
gcuaccuguc cgcccuccgg accggguggu acacgagcgu gaucaccauc gagcugucca 240
acaucaagga gaacaagugc aacggcaccg acgcgaaggu gaagcugauc aaccaggagc 300
ucgacaagua caagaacgcc gucaccgagc ugcagcugcu caugcagagc acgaccgccg 360
ccaacaaccg cgcgcgggcg gagcugccgc gguucaugaa cuacaccug aacaacacca 420
agaagacgaa cgugaccuc uccaagaagc gcaagcggcg cuuccugggg uuccugcucg 480
gcgugggggag cgccaucgcc uccggcaucg ccgucagcaa ggugcugcac cuggagggcg 540
aggugaacia gaucaagucc gccuccuga gcaccaacia ggcggucgug uccugagca 600

ES 2 702 466 T3

acgggguguc	cguccucacc	agcaaggugc	uggaccugaa	gaacuacauc	gacaagcagc	660
uccugcccau	cgugaacaag	caguccugcc	ggaucagcaa	caucgagacg	gucaucgagu	720
uccagcagaa	gaacaaccgc	cugcucgaga	ucacccggga	guucagcgug	aacgccggcg	780
ugaccacccc	cgucuccacg	uacaugcuga	ccaacagcga	gcugcucucc	cugaucaacg	840
acaugcccau	caccaacgac	cagaagaagc	ugaugagcaa	caacgugcag	aucgugcgcc	900
agcaguccua	cagcaucaug	uccaucauca	aggaggaggu	ccucgccuac	guggugcagc	960
ugccgcugua	cggggucauc	gacacccccu	gcuggaagcu	ccacacgagc	ccccugugca	1020
ccaccaacac	caaggagggc	uccaacaucu	gccugacgcg	gaccgaccgc	gggugguacu	1080
gcgacaacgc	cggcagcgug	uccuucuucc	cccaggccga	gaccugcaag	guccagagca	1140
accggguguu	cugcgacacc	augaacuccc	ucacgcugcc	gagcgaggug	aaccugugca	1200
acgucgacau	cuucaacccc	aaguacgacu	gcaagaucau	gaccuccaag	accgacguga	1260
gcuccagcgu	gaucaccucc	cucggcgcgga	ucgucagcug	cuacgggaag	acgaagugca	1320
ccgccagcaa	caagaaccgc	ggcaucauca	agaccuucuc	caacgggugc	gacuacguga	1380
gcaacaaggg	cguggacacc	gucuccgugg	gcaacacccu	guacuacgug	aacaagcagg	1440
aggggaagag	ccuguacguc	aagggcgagc	ccaucauca	cuucuacgac	ccccucgugu	1500
ucccguccga	cgaguucgac	gccagcaucu	cccaggugaa	cgagaagauc	aaccagagcc	1560
uggccuucau	ccggaagucc	gacgagcugc	ugcaccacgu	caacgccggg	aagagcacga	1620
ccaacaucau	gaucaccacc	aucaucaucg	ugaucaucgu	gauccuccug	ucccugaucg	1680
cggucggccu	ccugcuguac	ugcaaggccc	gcagcacgcc	cgugaccuc	uccaaggacc	1740
agcugagcgg	gaucaacaac	aucgccuucu	ccaacugagg	acuagugcau	cacauuuaaa	1800
agcaucucag	ccuaccauga	gaauaagaga	aagaaauga	agaucaauag	cuuauucauc	1860
ucuuuuucuu	uuucguuggu	guaaagccaa	caccucugcu	aaaaaacaua	aauuucuuua	1920
aucauuuugc	cucuuuucuc	ugugcuucaa	uuauaaaaa	auggaaagaa	ccuagaucua	1980
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2040
aaaugcaucc	ccccccccc	ccccccccc	cccccccca	aaggcucuuu	ucagagccac	2100
cagaauu						2107

Reivindicaciones

1. ARNm modificado que comprende al menos un marco de lectura abierto y que comprende al menos una modificación que aumenta la expresión del péptido o proteína codificado, donde la al menos una modificación comprende una modificación del contenido de G/C en su región codificante en comparación con su región codificante de tipo salvaje, donde la secuencia de aminoácidos traducida de la región codificante de tipo salvaje se mantiene, para su uso en un tratamiento médico, donde el ARN modificado se administra mediante inyección neumática.
2. ARNm modificado para uso según la reivindicación 1, donde el ARNm se administra vía intradérmica, intramuscular o subcutánea.
3. ARNm modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la expresión del péptido o proteína codificada por el ARNm modificado está aumentada en al menos 5 veces en comparación con el mismo ARNm modificado no administrado por inyección neumática.
4. ARNm modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el ARNm modificado codifica al menos un antígeno, una proteína terapéutica o un anticuerpo.
5. ARNm modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la al menos una modificación comprende además una modificación seleccionada del grupo consistente en optimización del codón, modificación UTR, cola Poli A) con más de 30 nucleótidos de adenosina, secuencia Poli(C), estructura 5'-CAP excepto de m7GpppN, secuencia tallo-bucle de histona y un nucleótido modificado químicamente.
6. ARNm modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la al menos una modificación es una modificación de UTR y la UTR se modifica introduciendo una UTR de un ARNm estable, seleccionándose preferentemente el ARNm estable de la UTR de α -globina y de la UTR de β -globina.
7. ARNm modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la al menos una modificación es una modificación de UTR y la UTR se modifica introduciendo una 5'-UTR de un gen TOP.
8. ARNm modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el nucleótido modificado químicamente se selecciona de pseudouridina-5'-trifosfato y 5-metilcitidina-5'-trifosfato.
9. ARNm modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el ARNm modificado comprende las siguientes modificaciones: una modificación del contenido de G/C, al menos una modificación de UTR, una cola poli(A) con más de 30 nucleótidos de adenosina y secuencia tallo-bucle de histona.
10. ARNm modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde la secuencia tallo-bucle de histona es una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID No.44.
11. ARNm modificado para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, donde el ARNm modificado comprende adicionalmente un 5'-CAP m7GpppN.
12. ARNm modificado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde la cola poli(A) comprende más de 50 nucleótidos de adenosina, donde la cola poli(A) preferentemente consiste en 64 nucleótidos de adenosina.
13. Composición farmacéutica que comprende un ARNm modificado tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y que comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica para al menos un péptido o proteína terapéutica, y además comprendiendo al menos un excipiente farmacéutico adecuado para el uso en un tratamiento médico, administrándose la composición farmacéutica por inyección neumática.
14. ARNm modificado tal como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o composición farmacéutica como se define según la reivindicación 13 para uso en el tratamiento del cáncer de próstata.
15. ARNm modificado para uso en un método de tratamiento de enfermedades infecciosas, neoplasias, incluyendo cáncer o enfermedades tumorales, enfermedades de la sangre y órganos hematopoyéticos,

5 enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas, enfermedades del sistema nervioso, enfermedades del sistema circulatorio, enfermedades del sistema respiratorio, enfermedades del aparato digestivo, enfermedades de la piel y tejido subcutáneo, enfermedades del sistema musculoesquelético y tejido conectivo, y enfermedades del sistema genitourinario, donde el ARNm modificado comprende al menos una modificación que aumenta la expresión del péptido o proteína codificada y comprende al menos un marco de lectura abierto que codifica dicho péptido o proteína, donde dicha al menos una modificación es una modificación del contenido de G/C en su región de codificación en comparación con su región de codificación de tipo salvaje, donde se conserva la secuencia de aminoácidos de la región de codificación de tipo salvaje y donde el método comprende la administración del ARNm modificado por inyección neumática.

10 **16.** ARNm modificado para uso según la reivindicación 15, donde la proteína codificada por el ARNm es un antígeno, una proteína terapéutica o un anticuerpo.

15 **17.** Kit de partes que comprende un ARNm modificado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en un tratamiento médico, donde el ARNm modificado se administra por inyección neumática.

18. Kit para su uso según la reivindicación 17, que comprende además instrucciones de uso, un adyuvante, un medio para la administración de la composición farmacéutica, un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o una solución farmacéuticamente aceptable para la disolución o dilución del ARNm modificado o de la composición farmacéutica.

20

Expresión de la luciferasa en cobayas

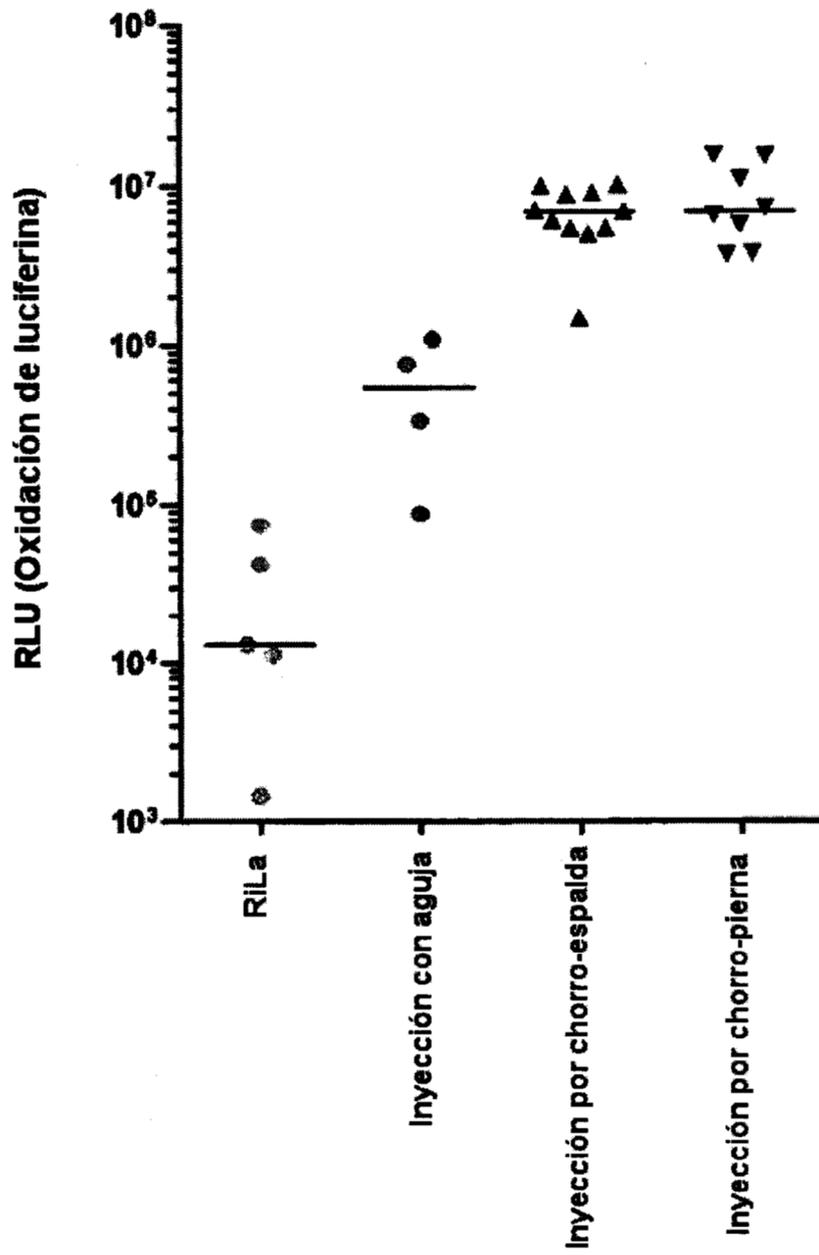


Fig. 1

Expresión de la luciferasa en cobayas

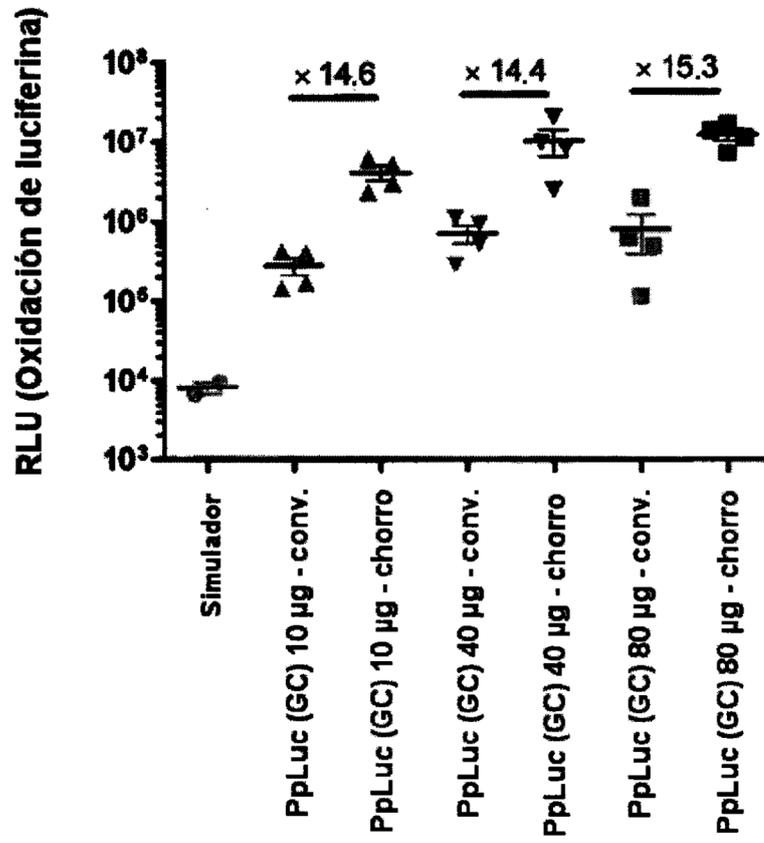


Fig. 2

Expresión de la luciferasa en cobayas

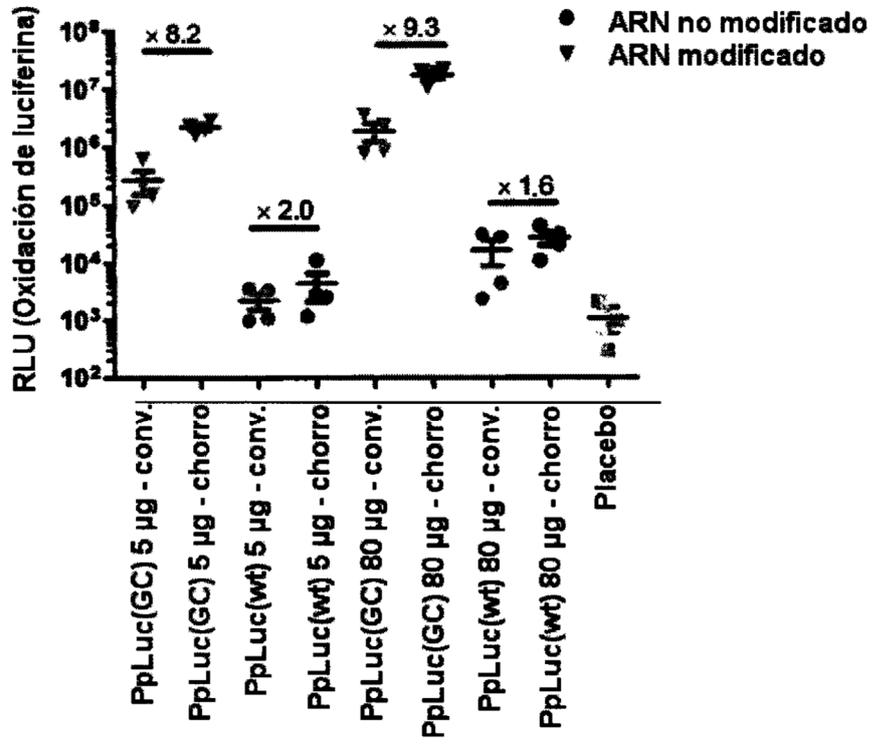


Fig. 3

R1265: PpLuc(GC)-muag-A64-C30-histonaSL

GGGAGAAAGCUUGAGGAUUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGCGCCCUUCUA
CCCGCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
CCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCUUGCCGGUGCUGGGCGC
CCUCUUCUUCGCGUGGGCCGUCGCCCGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCCGGG
CUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUGAU
CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUGCCGCACCGGACCGC
CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACAC
CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCUU
CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAGAUCCAGCGG
GGGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCGCCGG
CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCGAGGG
GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACCAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
GAUGAUCAUGAGCGGCUACGUGAACAAACCCGGAGGCCACCAACGCCUUCUUCGACAAGGA
CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCGU
CGACCGGCGUGAAGUCGUGAUCAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUGGCCGGGCGUGCCGGACGA
CGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCGCGUGGUGGUGCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
GAAGGAGAUUCGUGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
CCGCGAGAUCUGAUCUAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCCCGUGUAAGACUAGUUAUA
AGACUGACUAGCCC GAUGGGCCUCCCAACGGGCCCUCUCCCCUCCUUGCACCGAGAUUA
AUAAA
AAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGC
CACCAGAAU

Fig. 4

R2652: PpLuc(wt)-A30

GGGAGAAAGCUUACCAUGGAAGACGCCAAAAACAUAAGAAAGGCCCGCGCCAUUCUAU
CCUUUAGAGGAUGGAACCGCUGGAGAGCAACUGCAUAAGGCUAUGAAGAGAUACGCCUG
GUCCUGGAACAAUUGCUUUACAGAUGCACAUUCGAGGUGAACAUACGUACGCGGAA
UACUUCGAAAUGUCCGUUCGGUUGGCAGAAGCUAUGAAACGAUAUGGGCUGAAUACAAU
CACAGAAUCGUCGUAUGCAGUGAAAACUCUCUUCAAUUCUUUAUGCCGGUGUUGGGCGCG
UUUUUAUCGGAGUUGCAGUUGCGCCCGCGAACGACAUUUUAUAUGAACGUGAAUUGCUC
AACAGUAUGAACAUUUCGCAGCCUACCGUAGUGUUUGUUUCCAAAAAGGGGUUGCAAAA
AUUUUGAACGUGCAAAAAAAAUACCAUAUAUCCAGAAAAUUAUUAUCAUGGAUUCUAAA
ACGGAUUACCAGGGAUUUCAGUCGAUGUACAGUUCGUCACAUCUCAUCUACCCUCCGGU
UUUAUGAAUACGAUUUGUACCAGAGUCCUUUGAUCGUGACAAAACAUUGCACUGAUA
AUGAAUAGCUCUGGAUCUACUGGGUUAACUAAGGGUGUGGCCCUUCCGCAUAGAACUGCC
UGCGUCAGAUUCUCGCAUGCCAGAGAUCCUAAUUUUGGCAAUCAAAUCAUUCGGGAUACU
GCGAUUUUAAGUGUUGUUCCAUUCCAUCACGGUUUUGGAAUGUUUAUCACUCGGAUUAU
UUGAUAUGUGGAUUUCGAGUCGUCUUAUGUAUAGAUUUUGAAGAAGAGCUGUUUUACGA
UCCUUUCAGGAUUACAAAUUCAAAGUGCGUUGCUAGUACCAACCCUAAUUUCAUUCUUC
GCCAAAAGCACUCUGAUUGACAAAUACGAUUUAUCUAAUUUACACGAAUUGCUCUGGG
GGCGCACCUUUUCGAAAGAAGUCGGGGAAGCGGUUGCAAACGCUUCCAUCUUCAGGG
AUACGACAAGGAUAUGGGCUCACUGAGACUACAUCAGCUAUUCUGAUUACACCCGAGGGG
GAUGAUAACCGGGCGCGGUCGGUAAAGUUGUCCAUUUUUGAAGCGAAGGUUGUGGAU
CUGGAUACCGGAAAACGCUGGGCGUAAUCAGAGAGGCGAAUUAUGUGUCAGAGGACCU
AUGAUUAUGUCCGGUUAUGUAAACAAUCCGGAAGCGACCAACGCCUUGAUUGACAAGGAU
GGAUGGCUACAUCUGGAGACAUAAGCUUACUGGGACGAAGACGAACACUUCUUCUAGUU
GACCGCUUGAAGUCUUUAAUUAAAUAACAAGGAUAUCAGGUGGCCCCCGCUGAAUUGGAA
UCGAUAUUGUUACAACACCCCAACAUCUUCGACGCGGGCGUGGCAGGUCUUCGGACGAU
GACGCCGGUGAACUCCCGCCGCGGUUGUUGUUUGGAGCACGGAAAGACGAUGACGGAA
AAAGAGAUCGUGGAUUACGUCGCCAGUCAAGUAACAACCGCGAAAAAGUUGCGCGGAGGA
GUUGUGUUUGUGGACGAAGUACCGAAAGGUCUUAACCGGAAAACUCGACGCAAGAAAAUC
AGAGAGAUCUCAUAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGUCCAAUUGUGAGGACUAGUAGAU
CUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 5

R3454: PpLuc(wt)-A64

GGGAGAAAGCUUACCAUGGAAGACGCCAAAAACAUAAGAAAGGCCCGGCCCAUUCUUAU
CCUUUAGAGGAUGGAACCGCUGGAGAGCAACUGCAUAAGGCUAUGAAGAGAUACGCCUG
GUUCCUGGAACAAUUGCUIUUACAGAUGCACAUAUCGAGGUGAACAUACGUACGCGGAA
UACUUCGAAAUGUCCGUUCGGUUGGCAGAAGCUAUGAAACGAUAUGGGCUGAAUACAAU
CACAGAAUCGUCGUAUGCAGUGAAAACUCUCUCAAUUCUUUAUGCCGGUGUUGGGCGCG
UUAUUUAUCGGAGUUGCAGUUGC GCCCGCGAACGACAUUUUAUAUGAACGUGAAUUGCUC
AACAGUAUGAACAUUUCGCAGCCUACCGUAGUGUUUGUUUCCAAAAGGGGUUGCAAAAA
AUUUUGAACGUGCAAAAAAAAUACCAUAAUCCAGAAAAUUAUAUCAUGGAUUCUAAA
ACGGAUUACCAGGGAUUUCAGUCGAUGUACACGUUCGUCACAUCUCAUCUACCUCGCGU
UUUAAUGAAUACGAUUUUGUACCAGAGUCCUUGAUCGUGACAAAACAAUUGCACUGAUA
AUGAAUAGCUCUGGAUCUACUGGGUACCUAAGGGUGUGGCCUUCGCAUAGAACUGCC
UGCGUCAGAUUCUCGCAUGCCAGAGAUCCUAUUUUUGGCAAUCAAAUCAUUCGGAUACU
GCGAUUUUAAGUGUUGUCCAUCACCGUUUUGGAAUGUUUACUACACUCGGAUUAU
UUGAUAUGUGGAUUUCGAGUCGUCUAAUGUAUAGAUUUGAAGAAGAGCUGUUUUUACGA
UCCCUUCAGGAUUACAAAUCAAAGUGCGUUGCUAGUACCAACCCUAUUUCAUUCUUC
GCCAAAAGCACUCUGAUUGACAAAUACGAUUUAUCUAAUUUACACGAAAUUGCUIUCUGGG
GGCGCACCUCUUUCGAAAGAAGUCGGGGAAGCGGUUGCAAAACGCUUCCAUCUUCAGGG
AUACGACAAGGAUAUGGGUCACUGAGACUACAUCAGCUAUUCUGAUUACACCCGAGGGG
GAUGAUAACCGGGCGCGGUCGGUAAAGUUGUCCAUUUUUGAAGCGAAGGUUGUGGAU
CUGGAUACCGGGAAAACGCUGGGCGUAAUCAGAGAGGCGAAUUAUGUGUCAGAGGACCU
AUGAUUAUGUCCGGUUAUGUAAAACAUCGGAAGCGACCAACGCCUUGAUUGACAAGGAU
GGAUGGCUACAUCUGGAGACAUAGCUUACUGGGACGAAGACGAACACUUCUUCAUAGUU
GACCGCUUGAAGUCUUUAAUAAAUAACAAGGAUAUCAGGUGGCCCCCGCUGAAUUGGAA
UCGAUAUUGUUAACAACACCCCAACAUCUUCGACGCGGGCGUGGCAGGUUCUCCCGACGAU
GACGCCGGUGAACUCCCGCCGCGUUGUUGUUUGGAGCACGGAAAGACGAUGACGGAA
AAAGAGAUCGUGGAUUACGUCGCCAGUCAAGUAACAACCGCGAAAAGUUGCGCGGAGGA
GUUGUGUUUGUGGACGAAGUACCGAAAGGUCUACCGGAAAACUCGACGCAAGAAAAAUC
AGAGAGAUCUCAUAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGUCCAAUUGUGAGGACUAGUAGAU
CUAA
AAAAAA

Fig. 6

R2462: PpLuc(GC)-A64-C30-histonaSL

GGGAGAAAGCUUGAGGAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGCGCCCUUCUA
CCCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCGGA
GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
CCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUAUGCCGGUGCUGGGCGC
CCUCUUAUCGGCGUGGCCGUCGCCCCGGCGAACCACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCGGG
CUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCCUGAU
CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUGCCGCACCGGACCGC
CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGGACAC
CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCGCUGCUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCU
CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAGAUCCGACGCGG
GGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCGCCGG
CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCGAGGG
GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
GAUGAUC AUGAGCGGCUACGUGAACCAACCCGGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGA
CGGCUGGUCGACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCGU
CGACCGGCUAAGUCGUGAUC AAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUGGCCGGGCGUGCCGGACGA
CGACCGCGGCGAGCUGCCGGCCGCGGUGGUGGUCUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
GAAGGAGAUUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
CCGCGAGAUCCUGAUC AAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCCCGUGUAAGACUAGUAGAU
CUAAA
AAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGC
CACCAGAAUU

Fig. 7

R1256: PpLuc(GC)-muag-A64-C30

GGGAGAAAGCUUGAGGAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCGGCGCCCUUCUA
CCCCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCACACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCCU
GGUGCCGGGCACGAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUUGACAUCACCUACGCGGA
GUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUGAACACCAA
CCACCGGAUCGUGGUGUGCUCGGAGAACAGCCUGCAGUUCUUC AUGCCGGUGCUGGGCGC
CCUCUUC AUGCGGCGUGGCCGUCGCCCGGGCGAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCU
GAACAGCAUGGGGAUCAGCCAGCCGACCGUGGUGUUCGUGAGCAAGAAGGGCCUGCAGAA
GAUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAA
GACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCGAUGUACACGUUCGUGACCAGCCACCUCGCCGGG
CUUCAACGAGUACGACUUCGUCGCCGGAGAGCUUCGACCGGGACAAGACCAUCGCCUGAU
CAUGAACAGCAGCGGCAGCACCGGCCUGCCGAAGGGGGUGGCCUGCCGCACCGGACCGC
CUGCGUGCGCUUCUCGCACGCCCGGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCGGACAC
CGCCAUCCUGAGCGUGGUGCCGUUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACGACCCUGGGCUA
CCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUGGUCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUGCG
GAGCCUGCAGGACUACAAGAUCCAGAGCGCGCUCGUCGUGCCGACCCUGUUCAGCUUCU
CGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUGUCGAACCUGCACGAGAUCCGAGCGG
GGGCGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUGGCCAAGCGGUUCCACCUCGCCGG
CAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACCGAGACCACGAGCGCGAUCCUGAUCACCCCGAGGG
GGACGACAAGCCGGGCGCCGUGGGCAAGGUGGCCGUCUUCGAGGCCAAGGUGGUGGA
CCUGGACACCGGCAAGACCCUGGGCGUGAACAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGGCC
GAUGAUCAUGAGCGGCUACGUGAACAAACCCGGAGGCCACCAACGCCUCAUCGACAAGGA
CGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCGU
CGACCGGCUGAAGUCGUGAUC AAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGGCCGAGCUGGA
GAGCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUGGCCGGGCGUGCCGGACGA
CGACGCCGGCGAGCUGCCGGCCGGGUGGUGGUCGUGGAGCACGGCAAGACCAUGACGGA
GAAGGAGAUUCGUCGACUACGUGGCCAGCCAGGUGACCACCGCCAAGAAGCUGCGGGGCGG
CGUGGUGUUCGUGGACGAGGUCCGAAGGGCCUGACCGGGAAGCUCGACGCCCGGAAGAU
CCGCGAGAUCCUGAUCAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAAGACUAGUUAUA
AGACUGACUAGCCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCCGAGAUUA
AUAAA
AAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCUUCAG

Fig. 8

R2393: PpLuc(nat)-muag-A64-C30-histonaSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGGAAGACGCCAAAAACAUAAGAAAGGCCCGCGCCAUUCUAU
CCUUUAGAGGAUGGAACCGCUGGAGAGCAACUGCAUAAGGCUAUGAAGAGAUACGCCUCG
GUUCCUGGAACAAUUGCUUUACAGAUGCACAUAUCGAGGUGAACAUACGUAACGCGGAA
UACUUCGAAAUGUCCGUUCGGUUGGCAGAAGCUAUGAAACGAUAUGGGCUGAAUACAAA
CACAGAAUCGUCGU AUGCAGUGAAAACUCUCUCAAUUCUUUAUGCCGGUGUUGGGCGCG
UUUUUAUCGGAGUUGCAGUUGCGCCCGCGAACGACAUUUUAUAUGAACGUGAAUUGCUC
AACAGUAUGAACAUUUCGCAGCCUACCGUAGUGUUUGUUUCCAAAAAGGGGUUGCAAAA
AUUUUGAACGUGCAAAAAAAUUAACCAUAAUCCAGAAAUUUAUUAUCAUGGAUUCUAAA
ACGGAUUACCAGGGAUUUCAGUCGAUGUACACGUUCGUCACAUCUCAUCUACCUCGGU
UUAAAUGAAUACGAUUUUGUACCAGAGUCCUUUGAUCGUGACAAAACA AUUGCACUGAUA
AUGAAUAGCUCUGGAUCUACUGGGUUAACUAAGGGUGUGGCCCUUCCGCAUAGAACUGCC
UGCGUCAGAUUCUCGCAUGCCAGAGAUCCUAUUUUUGGCAAUCAAAUCAUUCGGAUACU
GCGAUUUUAAGUGUUGUCCAUUCCAUACCGUUUUGGAAUGUUUACUACACUCGGAUUA
UUGAUUUGUGGAUUUCGAGUCGUCUUAUGUAUAGAUUUGAAGAAGAGCUGUUUUACGA
UCCCUUCAGGAUUAACAAAUCAAAGUGCGUUGCUAGUACCAACCCUAUUUUCAUUCUUC
GCCAAAAGCACUCUGAUUGACAAAUACGAUUUAUCUAAUUUACACGAAAUUGCUUCUGGG
GGCGCACCUUUCGAAAGAAGUCGGGGAAGCGGUUGCAAAACGCUUCCAUUCUCCAGGG
AUACGACAAGGAUUGGGCUCACUGAGACUACAUCAGCUAUUCUGAUUACACCCGAGGGG
GAUGAUAAACC GGGCGCGGUCGGUAAAGUUGUCCAUUUUUUGAAGCGAAGGUUGUGGAU
CUGGAUACC GGGAAAACGCUGGGCGUUAUUCAGAGAGGCGAAUUAUGUGUCAGAGGACCU
AUGAUUAUGUCCGGUUAUGUAAACA AUCCGGAAGCGACCAACGCCUUGAUUGACAAGGAU
GGAUGGCUACAUCUGGAGACAUAGCUUACUGGGACGAAGACGAACACUUCUUAUAGUU
GACCGCUUGAAGUCUUUAAUUAUUAAUACA AAGGAUUCAGGUGGCCCGCUGAAUUGGAA
UCGAUUAUGUUAACAACACCCCAACAUCUUCGACCGGGCGUGGCAGGUCUUCGGACGAU
GACGCCGGUGAACUUCGGCCCGCGUUGUUGUUUUGGAGCACGGAAGACGAUGACGGAA
AAAGAGAUCGUGGAUUACGUCGCCAGUCAAGUAACAACCGCGAAAAAGUUGCGCGGAGGA
GUUGUGUUUGUGGACGAAGUACCGAAAGGUCUUAACGGAAAACUCGACGCAAGAAAAUC
AGAGAGAUCUCUAUAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGUCCAAAUUGUGAGGACUAGUUUA
AGACUGACUAGCCCGAUGGGCCUCCCAACGGGCCUCCUCCCCUCCUUGCACCGAGAUUA
AUAA
AAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGC
CACCAGAAUU

Fig. 9

R2403: RAV-G(CG)-muag-A64-C30-histonaSL

GGGAGAAAGCUUACCAUGGUGCCCCAGGCCUUCUCUUCGUCCCGUCUGGUGUUC
CUCUGCUUCGGCAAGUCCCCAUCUACACCAUCCCCGACAAGCUGGGGCCGUGGAGCCCC
AUCGACAUCCACCACCUGUCCUGCCCCAACAAACCUCGUGGUCGAGGACGAGGGCUGCACC
AACCUGAGCGGGUUCUCCUACAUGGAGCUGAAGGUGGGCUACAUCAGCGCCAUCAAGAUG
AACGGGUUCACGUGCACCGGGCUGGUCACCGAGGCGGAGACCUACACGAACUUCGUGGGC
UACGUGACCACCACCUCAAGCGGAAGCACUUCGCCCCACGCCGGACGCCUGCCGGGCC
GCCUACAACUGGAAGAUGGCCGGGACCCCCGCUACGAGGAGUCCUCCACAACCCCUAC
CCCGACUACCACUGGUCGCGGACCGUCAAGACCACCAAGGAGAGCCUGGUGAUAUCUCC
CCGAGCGUGGGCGACCUCGACCCCUACGACCGCUCCUGCACAGCCGGGUCUUCGCCGGC
GGGAACUGCUCCGGCGUGGCCGUGAGCUCCAGUACUGCAGCACCACACGACUACACC
AUCUGGAUGCCCAGAACCCGCGCCUGGGGAUGUCCUGCGACAUCUUCACCAACAGCCGG
GGCAAGCGCGCCUCCAAGGGCAGCGAGACGUGCGGGUUCGUCGACGAGCGGGGCCUCUAC
AAGUCCCUGAAGGGGGCCUGCAAGCUGAAGCUCUGCGGGCUGCUGGGCCUGCGCCUCAUG
GACGGGACCUGGGUGGCGAUGCAGACCAGCAACGAGACCAAGUGGUGCCCCCGGCCAG
CUGGUCAACCUGCACGACUUCGGAGCGACGAGAUCCGAGCACCUCGUGGUGGAGGAGCUG
GUCAAGAAGCGCGAGGAGUGCCUGGACGCCUCGAGUCCAUCAUGACGACCAAGAGCGUG
UCCUUCGGCGCCUGAGCCACCUGCGGAAGCUCGUGCCCAGGGUUCGGCAAGGCCUACACC
AUCUUCAACAAGACCUGAUGGAGGCCGACGCCACUACAAGUCCGUCCGCACGUGGAAC
GAGAUCAUCCCAGCAAGGGGUGCCUGCGGGUGGGCGGCCGUCGCCACCCCCACGUAAC
GGGUGUUCUUAACGGCAUCAUCCUCGGCCCCGACGGCAACGUGCUGAUCCCCGAGAUG
CAGUCCAGCCUGCUCACGACACAUGGAGCUGCUGGUCUCCAGCGUGAUCCCGCUCAUG
CACCCCUUGGCGGACCCUCCACCGUGUUCAAGAACGGGGACGAGGCCGAGGACUUCGUC
GAGGUGCACCUGCCCGACGUGCACGAGCGGAUCAGCGGGCUGCACCUCGGCCUGCCGAAC
UGGGGAAGUACGUGCUGCUCUCCGCCGGCGCCUGACCGCCUGAUGCUGAUAUCUUC
CUCAUGACCUGCUGGCGCCGGGUGAACCGGAGCGAGCCCACGCAGCAACCUCCGCGGG
ACCGGCCGGGAGGUCUCCGUGACCCCGCAGAGCGGGAAGAUCAUCUCCAGCUGGGAGUCC
UACAAGAGCGGCGGGGAGACCGGGCUGUGAGGACUAGUUUAUAGACUGACUAGCCCGAUG
GGCCUCCCAACGGGCCCUCCUCCCUCCUUGCACCAGAUUAAUAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAUGCAUCCCCCCC
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAUU

Fig. 10

R3513: EPO(wt)-A30

GGGAGAAAGCUUACCAUGGGGGUGCCC GAACGUCCC ACCUGCGUCUUUUACUCUCCUUG
CUACUGAUUCCUCUGGGCCUCCCAGUCCUCUGUGCUCCCCACGCCUCAUCUGCGACAGU
CGAGUUCUGGAGAGGUACAUCUUAGAGGCCAAGGAGGCAGAAA AUGUCACGAUGGGUUGU
GCAGAAGGUCCCAGACUGAGUGAAAUAUUACAGUCCCAGAUACCAAAGUCAACUUCUAU
GCUUGGAAAAGAAUGGAGGUGGAAGAACAGGCCAUAGAAGUUUGGCAAGGCCUGUCCUG
CUCUCAGAAGCCAUCCUGCAGGCCCAGGCCUGCUAGCCAAUCCUCCCAGCCACCAGAG
ACCCUUCAGCUUCAUAUAGACAAAGCCAUCAGUGGUCUACGUAGCCUCACUUCACUGCUU
CGGGUACUGGGAGCUCAGAAGGAAUUGAUGUCGCCUCCAGAUACCACCCACCUGCUCCA
CUCCGAACACUCACAGUGGAUACUUUCUGCAAGCUCUUCGGGUCUACGCCAACUCCUC
CGGGGAAACUGAAGCUGUACACGGGAGAGGUCUGCAGGAGAGGGGACAGGUGACCACUA
GUAGAUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 11

R3135: HSD17B4-EPO(GC)-albumin7-A64-C30-histonaSL

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUCGUUGCAGGCCUU
AUUCAAGCUUACCAUGGGCGUGCCCGAGCGGCCGACCCUGCUCCUGCUGCUCAGCCUGCU
GCUCAUCCCCUGGGGCGUGCCCGUCCUCUGCGCCCCCCCCGCGCCUGAUCUGCGACUCCCG
GGUGCUGGAGCGCUACAUCUCGAGGCCAAGGAGCGGAGAACGUGACCAUGGGGCGUGCGC
CGAGGGGCCCCGGCUGAGCGAGAACAUCACGGUCCCCGACACCAAGGUGAACUUCUACGC
CUGGAAGCGCAUGGAGGUGGAGGAGCAGGCCAUCGAGGUCUGGCAGGGCCUGUCCCUCCU
GAGCGAGGCCAUCCUGCAGGCGCAGGCCUCCUGGCCAACUCCAGCCAGCCCCGGAGAC
ACUGCAGCUCCACAUCGACAAGGCCAUCUCCGGGCGUGCGGAGCCUGACCUCCUCCUGCG
CGUGCUGGGCGCGCAGAAGGAGCUCAUGAGCCCCGCCGACACGACCCCCCGCCCCGCU
GCGGACCCUGACCGUGGACACGUUCUGCAAGCUCUCCGCGUCUACGCCAACUUCUGCG
GGGCAAGCUGAAGCUCUACACCGGGGAGGUGUGCCGCCGGGGCGACCGCUGACCACUAGU
GCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAUGAAGAUC
AUAGCUUAUUCUUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAA
CAUAAUUUCUUUAUCAUUUUGCCUCUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAUGGAA
AGAACCUAGAUCUAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCU
CUUUUCAGAGCCACCAGAAU

Fig. 12

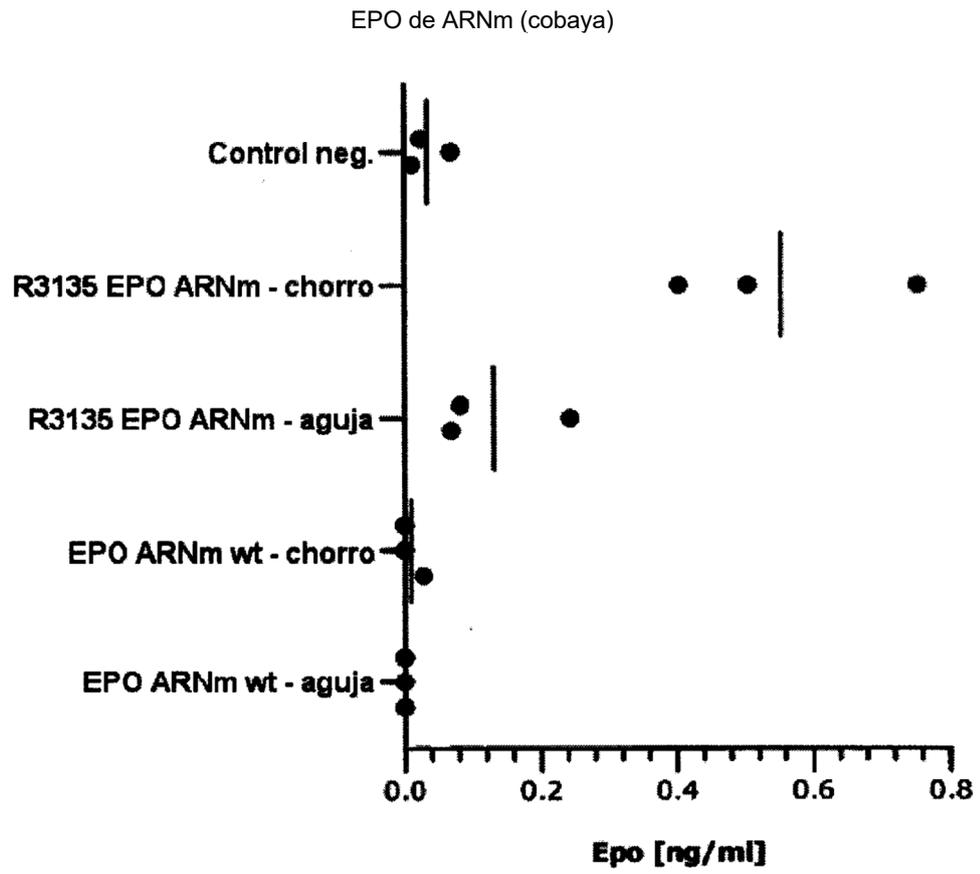


Fig. 13

RSV-F largo (GC) R2510

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUGGGCAUCAAGCUUACCAUGGAGC
UGCCCAUCCUCAAGGCCAACGCCAUCACCACCAUCCUGGCGGCCGUGACGUUCUGCUUCG
CCAGCUCCCAGAACAUCACCAGGAGUUCUACCAGAGCACCUGCUCCGCCGUCAGCAAGG
GCUACCUGUCCGCCUCCGGACCAGGGUGGUACACGAGCGUGAUCACCAUCGAGCUGUCCA
ACAUCAAGGAGAACAAGUGCAACGGCACCCGACGCGAAGGUGAAGCUGAUAACCAGGAGC
UCGACAAGUACAAGAACGCCGUCACCAGCUGCAGCUGCUCAUGCAGAGCACGACCGCCG
CCAACAACCCGCGCGCGGCGGAGCUGCCGCGGUUCAUGAACUACACCCUGAACAAACCA
AGAAGACGAACGUGACCCUCUCCAAGAAGCGCAAGCGGCGCUUCCUGGGUUCUGCUUCG
GCGUGGGGAGCGCCAUCGCCUCCGGCAUCGCCGUCAGCAAGGUGCUGCACCUGGAGGGCG
AGGUGAACAAAGAUCAAGUCCGCCUCCUGAGCACCAACAAGCGGUGCGUCCUGAGCA
ACGGGGUGUCCGUCACCAGCAAGGUGCUGGACCUGAAGAACUACAUCGACAAGCAGC
UCCUGCCCAUCGUGAACAAAGCAGUCCUGCCGGAUCAGCAACAUCGAGACGGUCAUCGAGU
UCCAGCAGAAGAACAACCGCCUGCUCGAGAUACCCGGGAGUUCAGCGGUAACGCCGGCG
UGACCACCCCGUCUCCACGUACAUGCUGACCAACAGCGGAGCUGCUCUCCUGAUAACG
ACAUGCCCAUCACCAACGACCAGAAGAAGCUGAUGAGCAACAACGUGCAGAUCGUGCGCC
AGCAGUCCUACAGCAUCAUGUCCAUCAUCAAGGAGGAGGUCCUCGCCUACGUGGUGCAGC
UGCCCGUGUACGGGGUCAUCGACACCCUCCUGGGAAGCUCCACACGAGCCCCUGUGCA
CCACCAACACCAAGGAGGGCUCCAACAUUCGCCUGACCGCGACCCGACCCGGGUGGUACU
GCGACAACCGCCGCGAGCGUGUCCUUCUUCUCCCCAGGCCGAGACCUGCAAGGUCCAGAGCA
ACCGGGUGUUCUGCGACACCAUGAACUCCUCACGUCGCCGAGCGAGGUGAACCUGUGCA
ACGUCGACAUCUUAACCCCAAGUACGACUGCAAGAUCAUGACCUCCAAGACCCGACGUGA
GCUCCAGCGUGAUCACCUCCUCCGGCGCGAUCGUCAGCUGCUACGGGAAGACGAAGUGCA
CCGCCAGCAACAAGAACCAGCGGCAUCAUCAAGACCUUCUCCAACGGGUGCGACUACGUGA
GCAACAAGGGCGUGGACACCGUCUCCGUGGGCAACACCCUGUACUACGUGAACAAAGCAGG
AGGGGAAGAGCCUGUACGDCAAGGGCGAGCCCAUCAUCAACUUCUACGACCCCCUUGUGU
UCCCGUCCGACGAGUUCGACGCCAGCAUCUCCAGGUGAACGAGAAGAUCAACCAGAGCC
UGGCCUUCAUCCGGAAGUCCGACGAGCUGCUGCACCACGUCACGCCGGGAAGAGCACGA
CCAACAUCAUGAUCACCACCAUCAUCAUCGUGAUCAUUCGUGAUCUCCUGUCCUGAUCG
CGGUCGGCCUCCUGCUGUACUGCAAGGCCCGCAGCACGCCCGUGACCCUCUCCAAGGACC
AGCUGAGCGGGAUCAACAACAUCCGUUCUCCAACUGAGGACUAGUGCAUCACAUUUAAA
AGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCUUC
UCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUUCUUUA
AUCAUUUUGCCUCUUUCUGUGCUUCAUUUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUA
AA
AAUGCAUCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCAC
CAGAAU

Fig. 14

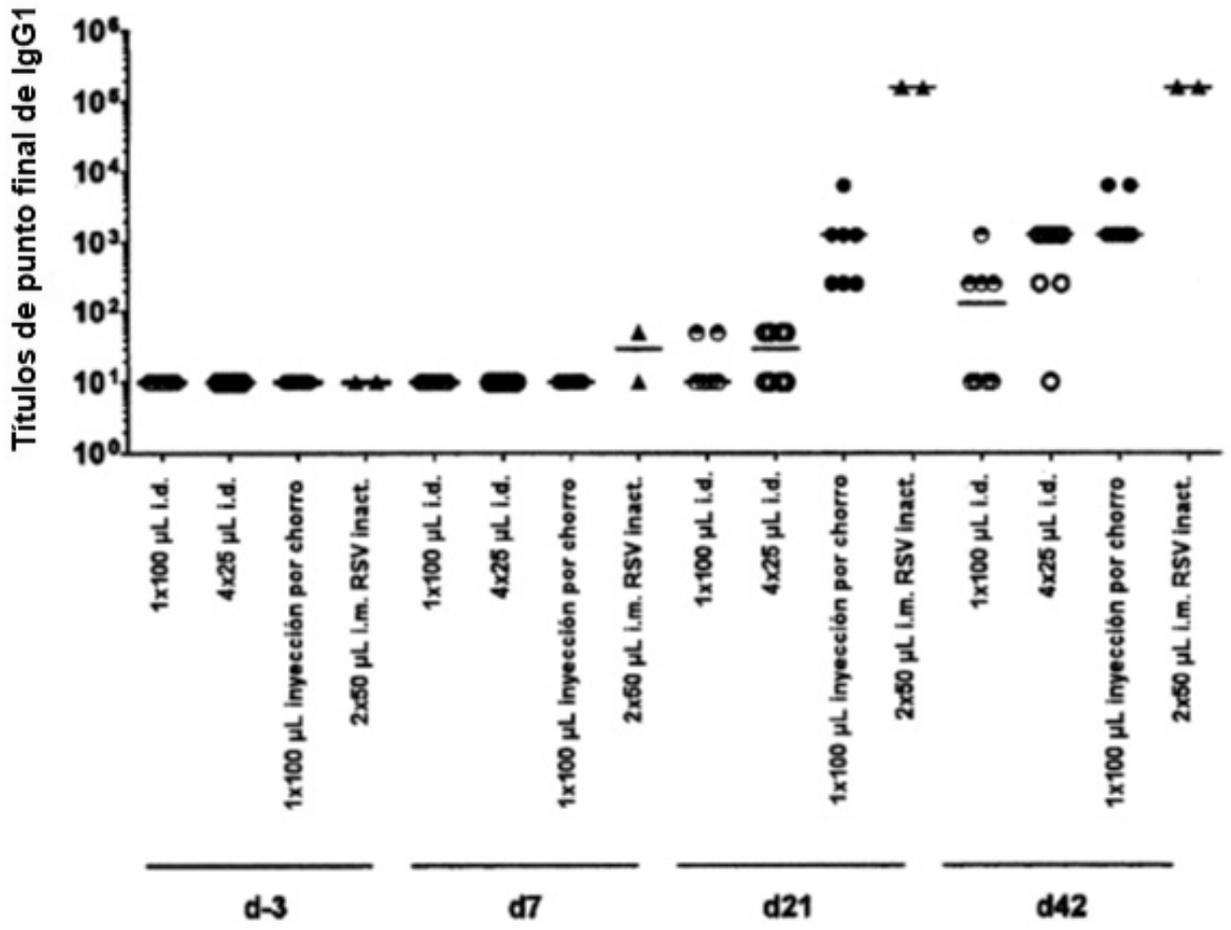


Fig. 15A

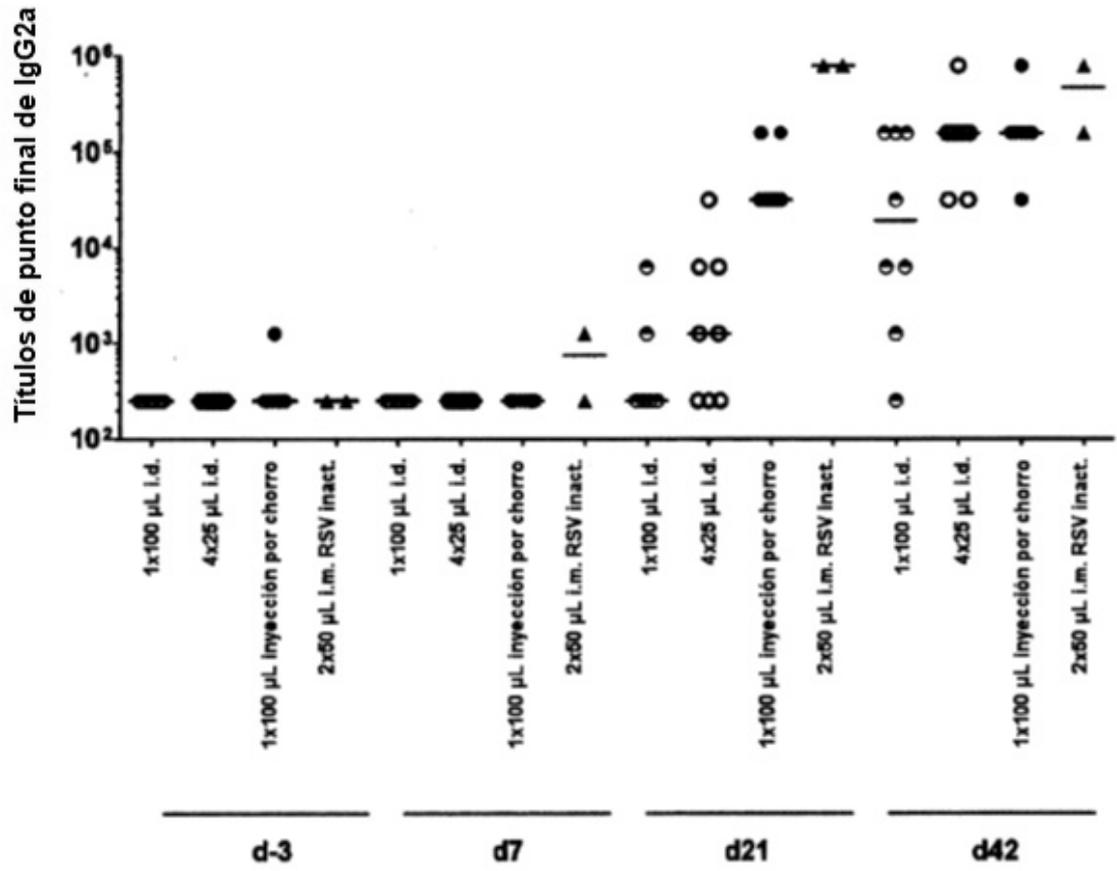


Fig. 15 B

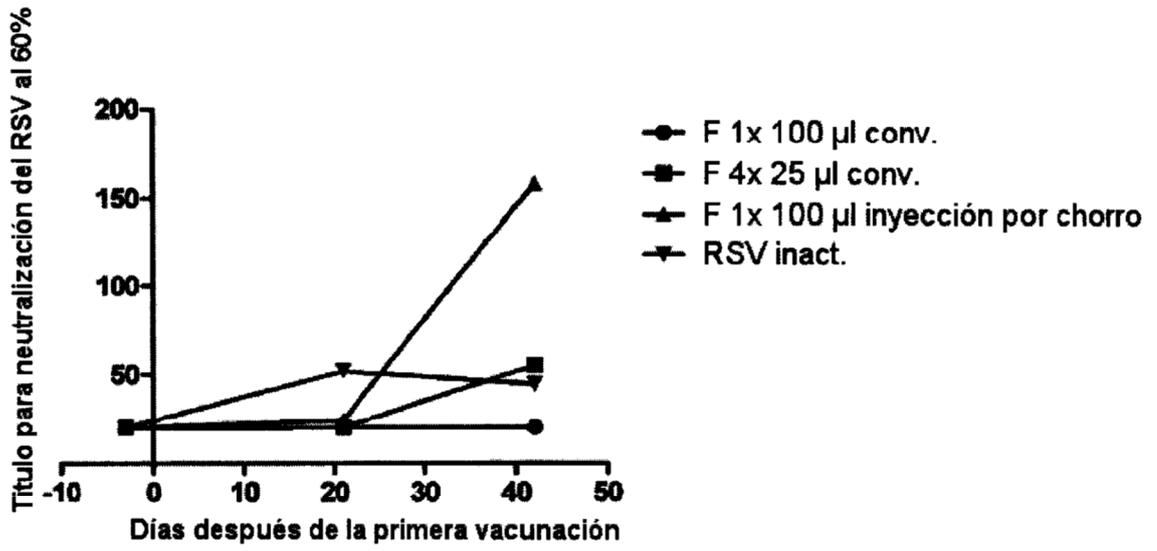


Fig. 16