

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 273**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61F 2/00	(2006.01)
A61L 27/22	(2006.01)
C07H 21/00	(2006.01)
C07K 14/505	(2006.01)
C07K 14/785	(2006.01)
C12N 15/11	(2006.01)
C12N 15/67	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 16172704 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3165234**

54 Título: **ARN con una combinación de nucleótidos no modificados y modificados para la expresión de proteínas**

30 Prioridad:

31.07.2009 DE 102009035507
22.10.2009 DE 102009050308

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

14.11.2019

73 Titular/es:

ETHRIS GMBH (100.0%)
Semmelweisstrasse 3
82152 Planegg, DE

72 Inventor/es:

RUDOLPH, CARSTEN y
KORMANN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 731 273 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

ARN con una combinación de nucleótidos no modificados y modificados para la expresión de proteínas

5 La invención se refiere a un polirribonucleótido, en particular ARN mensajero, que contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, para la expresión de proteínas y al uso de ARN de este tipo para la terapia de enfermedades y para procedimientos diagnósticos, en el que en el polirribonucleótido del 5 % al 50 % de los nucleótidos de uridina y del 5 % al 50 % de los nucleótidos de citidina son nucleótidos de uridina modificados o nucleótidos de citidina modificados y en el que los nucleótidos de uridina modificados son 5-yodouridina y los nucleótidos de citidina modificados son 5-yodocitidina.

15 Los ARN mensajeros (ARNm) son polímeros que están constituidos por módulos de nucleósido-fosfato principalmente con adenosina, citidina, uridina y guanosina como nucleósidos, que llevan como soporte intermedio la información genética del ADN en el núcleo celular hacia el citoplasma, donde se traduce en proteínas. Por consiguiente éstos son adecuados como alternativa para la expresión génica.

20 La investigación de los procesos bioquímicos en la célula y la investigación del genoma humano han descubierto relaciones entre genes deficientes y enfermedades. Existe por tanto ya desde hace tiempo el deseo de curar enfermedades que se basan en genes deficientes mediante terapia génica. Las expectativas eran altas, sin embargo los ensayos para esto fracasaron por regla general. Un primer planteamiento para la terapia génica consistía en llevar el ADN intacto de un gen deficiente o defectuoso en un vector al núcleo celular para conseguir la expresión del gen intacto y con ello la facilitación de la proteína deficiente o defectuosa. Estos ensayos eran por regla general no exitosos y los pocos ensayos exitosos estaban cargados con considerables efectos secundarios, en particular una tumorigénesis elevada.

25 Además existen enfermedades que se basan en una deficiencia de proteínas o un defecto de proteínas, sin que haya de atribuirse esto a un defecto genético. También en un caso de este tipo se considera generar *in vivo* las correspondientes proteínas mediante administración de ADN. También la facilitación de factores que desempeñan un papel en el metabolismo y por motivos patológicos o no patológicos están alterados o inhibidos, pudieron tratarse mediante una terapia con ácido nucleico pobre en o libre de efectos secundarios.

30 Se propuso también ya usar ARNm para la terapia de enfermedades congénitas para tratar defectos génicos que conducen a enfermedades. Según esto es ventajoso que deba introducirse el ARNm solo en el citoplasma de una célula, sin embargo no debe introducirse en el núcleo. La introducción en el núcleo es difícil e ineficaz, además existe un riesgo considerable de que se modifique el ADN cromosómico, cuando el vector o partes del mismo se incorporan en el genoma.

35 Si bien pudo mostrarse que el ARN mensajero transcrito *in vitro* puede expresarse realmente en animales mamíferos, sin embargo en el intento de usar ARNm para la terapia de enfermedades surgieron otras dificultades. La falta de estabilidad del ARNm conducía a que la proteína deseada no pudiera disponerse en cantidad suficiente en el tejido de mamífero. Otro inconveniente esencial resultó debido a que ARNm desencadena considerables reacciones inmunológicas. Se parte de que estas reacciones inmunitarias fuertes se producen mediante la unión a receptores tipo Toll, tales como TLR3, TLR7, TLR8 y helicasa-RIG-1.

45 Para impedir una reacción inmunológica se propuso en el documento WO 2007/024708 usar ARN en el que se había sustituido uno de los cuatro ribonucleótidos por un nucleótido modificado. En particular se sometió a estudio cómo se comporta el ARNm en el que se ha sustituido uridina en total por pseudouridina. Se encontró que una molécula de ARN de este tipo era significativamente menos inmunógena. Sin embargo no era aún suficiente la actividad biológica de estos productos para una terapia exitosa. Además ha resultado que pueden prepararse con dificultad o no pueden prepararse en absoluto secuencias de ARN en las que se han sustituido dos o más tipos de nucleótidos completamente mediante modificaciones.

50 Para facilitar proteínas útiles o necesarias para el organismo y/o para poder tratar mediante ácidos nucleicos una enfermedad que se basa en la falta de proteínas o proteínas deficientes, es deseable tener a disposición un ácido nucleico que pueda transfectar células, que permanezca estable de manera suficiente en la célula y proporcione una cantidad suficiente de proteína, de modo que se evite una dosificación demasiado frecuente. Al mismo tiempo no debe provocar este ácido nucleico, sin embargo, reacciones inmunológicas en medida considerable.

55 Por tanto era objetivo de la presente invención proporcionar un agente que fuera adecuado para la terapia de enfermedades provocadas mediante genes deficientes o defectuosos o enfermedades provocadas mediante proteínas deficientes o defectuosas, o que pudiera generar proteínas útiles o necesarias *in vivo*, que no provocara ninguna respuesta inmunitaria o provocara una respuesta inmunitaria muy reducida, fuera estable en entorno fisiológico, es decir que no se degradara inmediatamente tras la administración y fuera adecuado en total como agente para la terapia. Además era objetivo de la invención facilitar un agente para la terapia de enfermedades que pudieran influirse positivamente mediante formación *in-vivo* de proteínas.

Este objetivo se soluciona con un polirribonucleótido, tal como se define en la reivindicación 1. En particular es adecuado ARNm, que codifica una proteína o un fragmento de proteína, cuyo defecto o deficiencia es desventajoso para el organismo o cuya expresión es ventajosa para el organismo. Cuando se usa a continuación el término "polirribonucleótido" o "ARNm", entonces ha de partirse siempre, cuando el contexto no diga lo contrario, de que según esto se trata de un polirribonucleótido o un ARNm, que codifica una proteína o un fragmento de proteína, que está relacionada con una dolencia o carencia, tal como se ha descrito anteriormente, o codifica una proteína o fragmento de proteína que es útil o favorecedora para el organismo.

Se encontró sorprendentemente que los problemas mencionados anteriormente pueden solucionarse con ácido ribonucleico o polirribonucleótidos (a continuación se designa en general también como ARN), en particular con ARN mensajero (ARNm), cuando se usa un ARN que contiene tanto nucleótidos no modificados como nucleótidos modificados, siendo esencial que se encuentre en cada caso una proporción predeterminada de los nucleótidos de citidina en forma modificada tal como se indica en la reivindicación 1.

Además se determinó sorprendentemente que ARN, en el que se han sustituido dos tipos de nucleótidos parcialmente por nucleótidos modificados en cada caso, tal como se indica en la reivindicación 1, muestra una alta eficacia de la traducción y transfección, es decir el ARN transfecta más células y genera por célula más de la proteína codificada de lo que era posible con el ARN conocido. Además, el ARN modificado de acuerdo con la invención es activo durante más tiempo que el ARN conocido por el estado de la técnica o ARN no modificado.

Las ventajas obtenidas con el ARN de acuerdo con la invención no se obtienen ni con el ARN no modificado ni con el ARN completamente modificado. Ha resultado que puede conseguirse tanto una inmunogenicidad reducida como también una elevada estabilidad, cuando la proporción de nucleótidos de uridina y citidina modificados en el ARNm se ajusta de manera dirigida y asciende al menos en cada caso al 5 %, sin embargo no más del 50 %. Si se usa un ARNm sin modificaciones, entonces éste es muy inmunógeno mientras que, cuando todos los nucleótidos de uridina y citidina se encuentran en forma modificada, la actividad biológica es demasiado baja para poder usarse para fines terapéuticos. El ARN en el que la proporción de nucleótidos modificados es muy alta, no puede prepararse en absoluto o puede prepararse en condiciones muy difíciles. Así se determinó que una mezcla de nucleótidos que contiene solo pseudouridina en lugar de uridina y solo citosina modificada y/o adenosina modificada no puede proporcionar ninguna secuencia de ARN. Sorprendentemente pueden prepararse sin embargo secuencias de ARN que se han modificado del modo de acuerdo con la invención, sin más con eficacia razonable.

Además se encontró que el tipo de modificación es crítico. Los ARNm modificados de acuerdo con la invención muestran una baja inmunogenicidad y tienen una larga vida útil.

Se encontró que la estabilidad del ARN de acuerdo con la invención en comparación con los ácidos nucleicos usados hasta ahora es muy elevada. Así se determinó que el ARNm de acuerdo con la invención puede detectarse 10 días tras la transfección en una cantidad 10 veces más alta que el ARNm no modificado. Además de las altas tasas de transfección permite sobre todo la elevada vida útil el uso del ARNm de acuerdo con la invención para fines terapéuticos, dado que la alta estabilidad y con ello la larga vida útil permite realizar una dosificación en intervalos de tiempo más largos que, por consiguiente, son aceptables también para los pacientes.

De acuerdo con la invención se facilita con ello un agente especialmente ventajoso para fines terapéuticos. El ARN de acuerdo con la invención cumple las condiciones previas que se exigen a un producto que va a usarse en la terapia: como ARN debe introducirse éste para el desarrollo de la acción solo en el citoplasma y no en el núcleo celular, no existe el riesgo de una integración en el genoma, el tipo de modificación de acuerdo con la invención impide en gran parte una reacción inmunitaria y la modificación protege además al ARN frente a una rápida degradación. Con ello se logra con el ARN de acuerdo con la invención generar o regenerar funciones fisiológicas en tejidos, por ejemplo funciones que estaban suspendidas por un gen deficiente o defectuoso, restablecerlas *in vivo* y con ello tratar enfermedades provocadas mediante genes deficientes o defectuosos. Además se encontró sorprendentemente que los polirribonucleótidos de acuerdo con la invención pueden influir positivamente en enfermedades, formándose *in vivo* proteínas que pueden influir directa o indirectamente en el transcurso de la enfermedad. De acuerdo con la invención pueden facilitarse, por tanto, también polirribonucleótidos que codifican aquellos factores que son útiles o favorecedores para el organismo generalmente o en una determinada situación, por ejemplo factores de crecimiento, factores de angiogénesis, estimuladores, inductores, enzimas u otras moléculas biológicamente activas.

La invención se explica en más detalle en la siguiente descripción y las figuras adjuntas.

La figura 1 muestra la influencia de distintas modificaciones de nucleótidos sobre la inmunogenicidad y estabilidad de distintos ARNm. La figura 1A es un diagrama, en el que está representado el nivel de TNF- α tras la administración de distintos ARN con nucleótidos modificados de manera distinta. El ARN no modificado y modificado de manera sencilla en un 25 % conduce a un elevado nivel de marcadores de inflamación y muestra la alta inmunogenicidad de este ARN, mientras que para ARN modificado doblemente de acuerdo con la invención se encuentran los marcadores de inflamación en cantidad tolerable. Las figuras 1B y 1C muestran la actividad biológica (eficacia de la transfección y expresión) de ARNm modificado de distinta manera en células humanas y células de

ratón como proporción porcentual de células positivas para proteína de fluorescencia roja (RFP) y la cantidad de RFP por célula. Los diagramas muestran que las proteínas codificadas por ARN no modificado, modificado de manera sencilla y completamente modificado pueden detectarse solo en proporción porcentual más baja, mientras que el ARN parcialmente modificado de manera doble de acuerdo con la invención proporciona cantidades significativamente más altas de proteína debido a su estabilidad más alta.

La figura 2 muestra para ARNm modificado de manera múltiple una estabilidad más alta y duración de la expresión más larga. La figura 2A y B muestran en cada caso diagramas, en los que está representada la duración de expresión de distintos ARNm modificados y no modificados. La figura 2C muestra datos para la inmuno-precipitación de ARN para ARN no modificado, ARN modificado de manera sencilla y ARN modificado de manera múltiple. La figura 2D muestra diagramas en los que está representada la inmunogenicidad de distintos ARNm tras administración intravenosa *in vivo*. Los datos muestran que un ARN modificado de manera doble de acuerdo con la invención presenta una combinación de alta estabilidad y baja inmunogenicidad.

La figura 3 muestra distintos resultados de ensayo que se obtuvieron tras administración por aerosol intratraqueal de ARNm de SP-B modificado en ratones deficientes de manera condicional en SP-B. La figura 3A muestra registros de bioluminiscencia del pulmón de ratones tratados con ARN no modificado y modificado de manera múltiple. Puede observarse claramente que solo de ARN modificado de acuerdo con la invención se expresa también aún tras 5 días una cantidad suficiente de proteína, mientras que en ARN no modificado es baja la expresión ya tras 3 horas. La figura 3B muestra un diagrama en el que está representado el flujo frente al tiempo tras la transfección. Puede distinguirse claramente que la modificación de acuerdo con la invención alarga la duración de la expresión. La figura 3C muestra el esquema de dosificación para ARNm de SP-B. La figura 3D muestra un diagrama que representa la tasa de supervivencia de ratones que se trataron con ARNm modificado en comparación con ratones que se trataron con ARNm control, siendo claramente más larga la tasa de supervivencia en caso de ratones tratados con ARN de acuerdo con la invención. La figura 3E muestra una inmunotinción, en la que puede observarse que con ARN de acuerdo con la invención que codifica SP-B, pudo reconstituirse la SP-B en ratones deficientes en SP-B. La figura 3F muestra como resultado de un análisis de inmunotransferencia tipo Western semicuantitativa la distribución de proteínas en el sobrenadante de BALF libre de células. Las figuras 3G y H muestran registros de preparados de histología pulmonar y preparados de lavado broncoalveolar de ratones tratados de acuerdo con 3C. Mientras que los preparados de pulmón y lavado de ratones que habían obtenido ARN control mostraban daños pulmonares habituales de la deficiencia en SP-B, eran discretos los preparados de ratones tratados con ARN de acuerdo con la invención. La figura 3I muestra un diagrama para la compatibilidad con el pulmón durante el tiempo. La función pulmonar permanece durante un tiempo más largo en caso del tratamiento con ARN de acuerdo con la invención, mientras que en caso de animales tratados con ARN control se encontraron daños pulmonares.

La figura 4 muestra un diagrama en el que se representó la intensidad de fluorescencia de la RFP formada durante el tiempo para ARNm no modificados y modificados de manera distinta. El ARNm modificado se traduce más tarde y menos fuertemente a diferencia del ARNm no modificado.

La figura 5 muestra tres diagramas en los que están representados marcadores de inflamación para ratones tratados con distintos ARNm. Puede observarse claramente que el ARN modificado de acuerdo con la invención no provoca reacciones inflamatorias, mientras que el ARN no modificado conduce a una fuerte reacción inmunitaria.

La figura 6 muestra diagramas en los que están representados distintos parámetros típicos del pulmón para ratones tratados con distintos ARNm de acuerdo con la invención. Los parámetros son elasticidad tisular (HL), amortiguamiento tisular (GL), inercia tisular, resistencia de las vías respiratorias (Rn) y composición del tejido pulmonar Eta (GL/HL). Para los ARN de acuerdo con la invención ninguno de los parámetros estaba empeorado en comparación con el grupo control positivo.

La figura 7 muestra la capacidad de expresión de ARNm modificado de manera distinta en un diagrama en el que está representado la proporción porcentual de células positivas para RFP para ARNm con distinta proporción de nucleótidos modificados. La comparación muestra que solo el ARNm modificado de acuerdo con la invención conduce a una expresión duradera, mientras que el ARNm modificado no de acuerdo con la invención se expresa tanto en células humanas como en células de ratón en medida más baja.

La figura 8 muestra la capacidad de expresión de ARNm modificado de manera distinta en un diagrama en el que está representado la proporción porcentual de células positivas para RFP para ARNm con nucleótidos modificados de manera distinta. La comparación muestra que solo ARNm modificado de acuerdo con la invención conduce a una expresión duradera, mientras que ARNm modificado no de acuerdo con la invención se expresa tanto en células humanas como en células de ratón en medida más baja.

La figura 9 muestra la estabilidad de ARN de acuerdo con la invención liofilizado.

La figura 10A muestra un diagrama en el que está representada la eficacia de la transfección para distintos nucleótidos modificados. Puede distinguirse claramente que la máxima eficacia de la transfección se consigue con ARN en el que están modificados el 10 % de los nucleótidos de uridina y el 10 % de los nucleótidos de citidina y

eventualmente aún el 5 % de otros nucleótidos. La figura 10B muestra un diagrama en el que está representada la formación de TNF- α como marcador de la reacción inmunológica para ARN con nucleótidos modificados de manera distinta. Son los resultados de un ELISA de PBMC humanas, que se transfectaron en cada caso con 5 μ g de ARNm. La tasa de modificación era, si no se indicaba lo contrario, en cada caso el 10 %.

5 Puede distinguirse claramente que ARN, en el que entre el 5 % y el 50 % de los nucleótidos de uridina y nucleótidos de citidina están modificados, tiene una inmunogenicidad claramente reducida en comparación con ARN no modificado.

10 La figura 11 muestra los resultados de distintos ensayos, con los que se midió la estabilidad y la inmunogenicidad de ARNm modificado de acuerdo con la invención, que codifica EPO. El diagrama 11(a) muestra la proporción de eritropoyetina que puede detectarse 14 días tras la administración de ARNm que codifica EPO, que está modificado de manera distinta. Puede distinguirse claramente que tras 14 días, la proporción de EPO en ratones a los que se inyectó ARNm modificado de acuerdo con la invención, es 4,8 veces más alta que en ratones no tratados, sin embargo también 4,8 veces más alta que en caso de ratones tratados con ARN no modificado y es todavía 2,5 veces más alta que en caso de ratones tratados con ARN modificado de manera sencilla.

15 El diagrama 11 (b) muestra valores de hematocrito 14 días o 28 días tras la administración de ARNm que codifica EPO con distintas modificaciones. El diagrama muestra claramente que los ratones tratados con ARNm modificado de acuerdo con la invención tienen un valor de hematocrito considerablemente más alto.

20 En los diagramas de la figura 11(c) está representada la formación de los factores típicos para una reacción inmunológica. Se muestra que los cuatro marcadores de inflamación en la administración de ARNm no modificado son elevados, mientras que en caso de ARN modificado de acuerdo con la invención apenas puede detectarse una reacción inmunológica.

25 Los diagramas de la figura 11(d) muestran los correspondientes valores para IFN- α y IL-12, que son igualmente marcadores de inflamación. También en este caso se muestra que el ARNm modificado de acuerdo con la invención prácticamente no provoca ninguna reacción inmunológica a diferencia de ARNm no modificado.

30 La figura 12 muestra un diagrama en el que está representada la tasa de supervivencia de tres grupos de ratones, que obtuvieron ARNm de SP-B modificado de acuerdo con la invención dos veces en una semana (B) o durante 28 días dos veces por semana (C), o en el grupo de comparación de ARNm de EGFP_{Luc} modificado (A). Se muestra que los ratones solo sobreviven en tanto que obtienen ARNm de SP-B (B, C). Sin alimentación de ARNm de SP-B mueren los ratones (A).

35 La figura 13 muestra el nivel de citocina en el lavado broncoalveolar de ratones 8 horas tras la administración de ARNm de SP-B no modificado, ARNm de SP-B modificado de acuerdo con la invención o de ADN de plásmido de SP-B. Los resultados muestran que a diferencia de la administración intratraqueal de ARNm no modificado o ADN de plásmido, que conducen en cada caso a un fuerte aumento de los marcadores de inflamación IFN γ y IL-12, en caso de la administración de ARNm de SP-B modificado de acuerdo con la invención prácticamente no están elevados los marcadores de inflamación en comparación con el grupo no tratado o con el grupo tratado con perfluorocarbono.

40 La figura 14 muestra valores de hematocrito, tal como se obtienen tras administración repetida de ARNm de mEPO modificado de acuerdo con la invención. Los resultados muestran que la administración repetida de ARNm de mEPO modificado de acuerdo con la invención se tolera bien y conduce a un aumento duradero del hematocrito.

45 La figura 15 muestra la expresión de luciferasa de células que se incubaron con implantes de titanio, que estaban dotados de revestimientos que contienen distintas formas de ARN modificado de acuerdo con la invención. Se mostró que el ARN modificado de acuerdo con la invención, que estaba contenido en un revestimiento de polímero de liberación retardada, que se aplicó sobre placas de titanio y de esto se desprendió poco a poco, no perdió su actividad.

50 La figura 16 muestra la expresión de luciferasa para revestimientos aplicados sobre implantes de titanio, que contenían ARNm modificado. Se mostró que la expresión de proteínas para ARNm modificado de acuerdo con la invención era mucho más alta que para ARN no tratado, sin embargo también era más alta que para ADN de plásmido.

55 Las figuras 17A y 17B muestran la proporción relativa de células positivas para RFP o de la expresión de RFP relativa de ARNm, que presenta sitios de unión a micro-ARN para micro-ARN 142-3p. Se mostró que la proporción de células positivas para RFP para ARN que presenta sitios de unión a micro-ARN era más baja y la expresión de la proteína codificada era considerablemente más baja en las células que contenían el correspondiente micro-ARN 142-3p.

60 La figura 18 muestra la secuencia de un ARN modificado mediante la incorporación de sitios de unión a micro-ARN,

que codifica RFP. Sombreada en gris está representada la secuencia de RFP. Está subrayado la cuádruple repetición en tándem del sitio de unión a micro-ARN para el micro-ARN 142-3p (sombreado en gris claro) con las secuencias espaciadoras (no sombreadas).

5 De acuerdo con la invención se proporciona una molécula de polirribonucleótido con nucleótidos parcialmente modificados de manera múltiple, tal como se indica en la reivindicación 1, un ARNm modificado parcialmente de manera múltiple, un IVT-ARNm, así como el uso de las moléculas de ARN para la preparación de un fármaco para el tratamiento de enfermedades que se basan en genes deficientes o defectuosos o para el tratamiento de enfermedades que pueden paliarse o curarse mediante facilitación de proteínas *in vivo*, tal como factores, estimuladores, inductores o enzimas. Se describe también el ARNm de acuerdo con la invención se combina con sitios de unión diana, secuencias guía diana y/o con sitios de unión a micro-ARN para permitir una actividad del ARNm deseado solo en las células adecuadas; en otra forma de realización, el ARN de acuerdo con la invención se combina con microARN o ARNhp en el sentido 3' de la cola de 3'poliA. En otra forma de realización, se pone a disposición ARN, cuya duración se ha ajustado o alargado mediante otras modificaciones dirigidas.

15 Un objeto de la invención es por consiguiente un ARN definido como en la reivindicación 1, con elevada estabilidad e inmunogenicidad reducida. El ARN de acuerdo con la invención puede generarse de manera en sí conocida. Por regla general se genera éste mediante transcripción de un ADN que codifica la proteína intacta o deseada, que puede influir en una afección o cuya falta o forma deficiente origina una enfermedad.

20 Por ARN debe entenderse en el contexto de la presente invención cualquier molécula de polirribonucleótido que es adecuada, cuando llega a la célula, para la expresión de una proteína o fragmento de la misma o puede traducirse para dar una proteína o fragmento de la misma. El término "proteína" comprende a este respecto cualquier tipo de secuencia de aminoácidos, es decir cadenas de dos o más aminoácidos, que están enlazados en cada caso a través de enlaces peptídicos e incluye conjuntamente péptidos así como proteínas de fusión.

30 El ARN de acuerdo con la invención contiene una secuencia de ribonucleótidos, que codifica una proteína o fragmento de la misma, cuya función se usa o es útil en la célula o en el entorno de la célula, por ejemplo una proteína cuya falta o forma defectuosa es factor desencadenante de una enfermedad o una dolencia, cuya facilitación puede paliar o impedir una enfermedad o una dolencia, o una proteína que puede favorecer un proceso que es útil para el organismo, en una célula o en su entorno. Por regla general contiene el ARN de acuerdo con la invención la secuencia para la proteína completa o una variante funcional de la misma. Además, la secuencia de ribonucleótidos puede codificar una proteína que actúa como factor, inductor, regulador, estimulador o enzima, o un fragmento funcional de la misma, siendo esta proteína una tal cuya función sea necesaria para remediar una alteración, en particular alteración metabólica o para iniciar *in vivo* procesos, tal como la formación de nuevos vasos, tejido etc. Por variantes funcionales se entiende según esto un fragmento que puede asumir en la célula la función de la proteína, cuya función se usa en la célula o cuya falta o defecto es causante de enfermedades. Además puede presentar el ARN de acuerdo con la invención también otras zonas funcionales y/o zonas no codificantes en 3' y 5'. Las zonas no codificantes en 3' y/o 5' pueden ser las zonas que flanquean de manera natural la proteína codificada o sin embargo secuencias artificiales que contribuyen a la estabilización del ARN. El experto en la materia puede detectar para esto las secuencias en cada caso adecuadas mediante ensayos rutinarios.

45 En una forma de realización preferente, el ARN contiene una caperuza m7GpppG, un sitio de entrada a ribosoma interno (IRES) y/o una cola de poliA en el extremo 3', en particular para mejorar la traducción. El ARN puede presentar otras zonas que favorecen la traducción. Es esencial para el ARN de acuerdo con la invención su proporción de nucleótidos modificados tal como se define en la reivindicación 1.

50 Un ARN de acuerdo con la invención con estabilidad elevada e inmunogenicidad reducida se obtiene usándose para su preparación una mezcla de nucleótidos, en la que se ajusta la proporción de nucleótidos de citidina modificados (5-yodocitidina) y de los nucleótidos de uridina modificados (5-yodouridina). Preferentemente se prepara el ARN de acuerdo con la invención con una mezcla de nucleótidos, que contiene nucleótidos tanto no modificados como modificados, en la que están modificados del 5 % al 50 % de los nucleótidos de citidina y del 5 % al 50 % de los nucleótidos de uridina. Los nucleótidos que contienen adenosina y guanósina pueden estar no modificados. Puede usarse igualmente una mezcla de nucleótidos, en la que están modificados igualmente algunos de los ATP y/o GTP, no debiendo superar su proporción el 20 %, y debiendo encontrarse preferentemente su proporción, en caso de que existan, en un intervalo del 0,5 % al 10 %.

60 Por consiguiente se facilita un ARNm que presenta del 5 % al 50 % de nucleótidos de citidina modificados y del 5 % al 50 % de nucleótidos de uridina así como del 50 % al 95 % de nucleótidos de citidina no modificados, del 50 % al 95 % de nucleótidos de uridina no modificados, en el que los nucleótidos de adenosina y guanósina pueden estar no modificados o parcialmente modificados, encontrándose éstos preferentemente en forma no modificada. Preferentemente, del 10 % al 35 % de los nucleótidos de citidina y uridina están modificados y de manera especialmente preferente se encuentra la proporción de los nucleótidos de citidina modificados en un intervalo del 7,5 % al 25 % y la proporción de los nucleótidos de uridina modificados en un intervalo del 7,5 % al 25 %. Se encontró que realmente una proporción relativamente baja, por ejemplo solo en cada caso el 10 % de nucleótidos de citidina y uridina modificados, puede conseguir las propiedades deseadas, con la condición previa de que se trata de

las modificaciones de acuerdo con la invención.

El tipo de modificación de los nucleósidos tiene influencia sobre la estabilidad y con ello la vida útil y actividad biológica del ARNm. Las modificaciones adecuadas están expuestas en la siguiente tabla:

5

Designación	Modificación de base (posición 5)	Modificación de azúcar (posición 2')	De manera natural en ARNm
Uridina			
5-metiluridin-5'-trifosfato (m5U)	CH ₃	-	no
5-yodouridin-5'-trifosfato (I5U)	J	-	no
5-bromouridin-5'-trifosfato (Br5U)	Br	-	no
2-tiouridin-5'-trifosfato (S4U)	S (en posición 2)	-	no
4-tiouridin-5'-trifosfato (S2U)	S (en posición 4)	-	no
2'-metil-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato (U2'm)	-	CH ₃	sí
2'-amino-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato (U2'NH ₂)	-	NH ₂	no
2'-azido-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato (U2'N ₃)	-	N ₃	no
2'-fluoro-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato (U2'F)	-	F	no
Citidina			
5-metilcitidin-5'-trifosfato (m5C)	CH ₃	-	sí
5-yodocitidin-5'-trifosfato (I5C)	J	-	no
5-bromocitidin-5'-trifosfato (BrSC)	Br	-	no
2-tiocitidin-5'-trifosfato (S2C)	S (en posición 2)	-	no
2'-metil-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato (C2'm)	-	CH ₃	sí
2'-amino-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato (C2'NH ₂)	-	NH ₂	no
2'-azido-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato (C2'N ₃)	-	N ₃	no
2'-fluoro-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato (C2'F)	-	F	no
Adenosina			
N6-metiladenosin-5'-trifosfato (m6A)	CH ₃ (en posición 6)	-	sí
N1-metiladenosin-5'-trifosfato (m1A)	CH ₃ (en posición 1)	-	no
2'-O-metiladenosin-5'-trifosfato (A2'm)	-	CH ₃	sí
2'-amino-2'-desoxiadenosin-5'-trifosfato (A2'NH ₂)	-	NH ₂	no
2'-azido-2'-desoxiadenosin-5'-trifosfato (A2'N ₃)	-	N ₃	no
2'-fluoro-2'-desoxiadenosin-5'-trifosfato (A2'F)	-	F	no
Guanosina			
N1-metilguanosin-5'-trifosfato (m1G)	CH ₃ (en posición 1)	-	no
2'-O-metilguanosin-5'-trifosfato (G2'm)	-	CH ₃	sí
2'-amino-2'-desoxiguanosin-5'-trifosfato (G2'NH ₂)	-	NH ₂	no
2'-azido-2'-desoxiguanosin-5'-trifosfato (G2'N ₃)	-	N ₃	no
2'-fluoro-2'-desoxiguanosin-5'-trifosfato (G2'F)	-	F	no

Se encontró que se consiguen resultados especialmente buenos cuando el ARN de acuerdo con la invención contiene 5-yodouridina como nucleótido que contiene uridina modificado y 5-yodocitidina como nucleótido de citidina modificado. En una forma de realización especialmente preferente están presentes estos dos nucleótidos en cada caso en una proporción del 10 % al 30 %. De otro modo pueden agregarse nucleótidos modificados eventualmente, siempre que la proporción total de nucleótidos modificados no supere el 50 % del respectivo tipo de nucleótido.

10

Se prefiere un polirribonucleótido, en el que del 5 % al 30 % y en particular del 7,5 % al 25 % de los nucleótidos de uridina son nucleótidos de 5-yodouridina, y del 5 % al 30 % y en particular del 7,5 % al 25 % de los nucleótidos de citidina son nucleótidos de 5-yodocitidina, pudiendo estar los nucleótidos de adenosina y guanosina no modificados o parcialmente modificados. En una forma de realización preferente presenta este ARNm de acuerdo con la invención adicionalmente una caperuza de 7'-metilguanosina y/o una cola de poli(A). Por consiguiente, en una forma de realización preferente se prepara el ARNm en su forma madura, es decir con una caperuza de GppG, un IRES y/o una cola de poliA.

Los tipos y proporciones de 5-yodouridina o 5-yodocitidina óptimas para un ARN específico pueden determinarse con ensayos rutinarios.

Como óptimo se designa en este contexto un ARNm cuya inmunogenicidad sea baja de modo que éste no carga al organismo tratado y que presenta una estabilidad predeterminada y con ello duración de la expresión predeterminada. El experto en la materia conoce procedimientos para la comprobación y determinación de estas propiedades y se describen a continuación y en los ejemplos.

El ARN de acuerdo con la invención puede prepararse de manera en sí conocida. Es adecuado por ejemplo un procedimiento en el que el ARNm de acuerdo con la invención se prepara mediante transcripción *in-vitro* de una mezcla de ATP, CTP, GTP y UTP, en la que del 5 % al 50 %, preferentemente del 5 % al 30 % y en particular del 7,5 % al 25 % de los nucleótidos de citidina y del 5 % al 50 %, preferentemente del 5 % al 30 % y en particular del 7,5 % al 25 % de los nucleótidos de uridina están modificados tal como se indica en la reivindicación 1 y el resto está no modificado. Los nucleósidos de guanosina y adenosina, en particular adenosina, eventualmente pueden estar igualmente modificados. Es esencial de la invención sin embargo la modificación de UTP y CTP en el intervalo indicado. Cuando la proporción de UTP y/o CTP modificado es más baja o más alta, ya no se consiguen las propiedades ventajosas. Así se encontró que fuera de los intervalos reivindicados ya no es estable el ARNm de ese modo. Con una proporción más baja de modificación pueden temerse además reacciones inmunológicas. Para ajustar la proporción adecuada de nucleótidos no modificados y modificados se genera de manera adecuada el ARN usando una mezcla de nucleótidos, cuyas proporciones de nucleósidos están parcialmente modificadas y parcialmente no modificadas de manera correspondiente a la proporción deseada, estando modificados de acuerdo con la invención al menos el 5 % de los nucleósidos de uridina y al menos el 5 % de los nucleósidos de citidina, no estando modificados en total, sin embargo, más de en cada caso el 50 % de nucleósidos de uridina o nucleósidos de citidina. Otros nucleósidos, es decir adenosinas y guanosinas, pueden estar modificados, sin embargo no debía superarse tampoco para estos nucleósidos un límite superior del 50 % de modificación, preferentemente el 20 %. Preferentemente están modificadas solo las correspondientes proporciones de los nucleósidos de uridina y nucleósidos de citidina.

La longitud del ARNm usado de acuerdo con la invención depende del producto génico o proteína o fragmento de proteína, que debe facilitarse o complementarse. El ARNm puede ser por tanto muy corto, por ejemplo puede presentar solo 20 o 30 nucleótidos, o sin embargo de manera correspondiente a la longitud del gen puede presentar varios miles de nucleótidos. El experto en la materia puede seleccionar la secuencia adecuada en cada caso de manera habitual.

Es esencial que pueda facilitarse la función de la proteína que causa una enfermedad, de la proteína que palia o impide una enfermedad o de la proteína que aporta una propiedad útil, para la que debe usarse el ARNm.

Para la preparación del ARN de acuerdo con la invención se usan 5-yodouridina y 5-yodocitidina como nucleótidos modificados. Además resulta preferente usar 5'-metilcitidina como nucleótido de citidina modificado. Por consiguiente puede usarse para la preparación del ARN de acuerdo con la invención una mezcla de nucleótidos que, además de ATP y GTP, contiene en cada caso del 95 % al 50 % de CTP no modificado y del 95 % al 50 % de UTP no modificado así como del 5 % al 50 % de nucleótidos de 5-yodouridina y del 5 % al 50 % de nucleótidos de 5-yodocitidina. Se prefiere especialmente un polirribonucleótido, en el que del 5 % al 30 % y en particular del 7,5 % al 25 % de los nucleótidos de uridina son nucleótidos de 5-yodouridina, del 5 % al 30 % y en particular del 7,5 % al 25 % de los nucleótidos de citidina son nucleótidos de 5-yodocitidina, siendo los nucleótidos de adenosina y guanosina nucleótidos no modificados. Una combinación de este tipo conduce a la preparación de un ARN parcialmente modificado que se caracteriza por estabilidad especialmente alta. Pudo mostrarse que es especialmente estable el ARN que se preparó con una mezcla de nucleótidos, que contenía como CTP o UTP en cada caso del 5 % al 50 % de nucleótidos de 5-yodouridina o nucleótidos de 5-yodocitidina, es decir un ARN en comparación con ARN no modificado o modificado de manera conocida presentaba una capacidad de vida elevada hasta 10 veces.

Además se prefiere que la molécula de polirribonucleótidos constituida por nucleótidos no modificados y modificados presente una caperuza de 7'-metilguanosina y/o un extremo de poli(A). Además puede presentar el ARN aún secuencias adicionales, por ejemplo zonas no traducidas y ácidos nucleicos funcionales, tal como los conoce bien el experto en la materia.

El ARN de acuerdo con la invención puede facilitarse, por ejemplo, como ARN transcrito *in-vitro* (IVT-ARN). Los materiales necesarios para la realización de la transcripción *in-vitro* los conoce el experto en la materia y pueden

obtenerse en el comercio, en particular tampones, enzimas y mezclas de nucleótidos. El tipo del ADN usado para la preparación del ARN de acuerdo con la invención es igualmente no crítico, siendo éste por regla general ADN clonado.

5 Tal como se ha expuesto anteriormente, se facilita un ARN, en particular ARNm que presenta nucleósidos de uridina modificados y nucleósidos de citidina modificados en una proporción predeterminada, tal como se indica en la reivindicación 1. La proporción óptima para un ARNm específico de nucleósidos de uridina modificados o nucleósidos de citidina modificados puede determinarse con ensayos rutinarios, que el experto en la materia conoce bien.

10 El ARN de acuerdo con la invención se usa preferentemente para la terapia de enfermedades o para la facilitación de proteínas útiles para el organismo. Cuando se usa el ARN de acuerdo con la invención para la terapia de enfermedades, éste presenta preferentemente el transcrito in-vitro para una proteína o fragmento de proteínas, cuyo defecto o deficiencia conduce a un estado patológico o cuya facilitación conduce a un alivio de una dolencia. Para la preparación del ARN de acuerdo con la invención se usa preferentemente un ADN que codifica una proteína o un fragmento de proteína, cuyo defecto o deficiencia está relacionado con una enfermedad o una dolencia. En una forma de realización se usa para la preparación del ARN de acuerdo con la invención el ADN de un gen, cuyo defecto o deficiencia conduce a una enfermedad o a una dolencia. En otra forma de realización se usa para la preparación del ARN de acuerdo con la invención una ADN que codifica una proteína, cuya presencia, eventualmente temporal, es útil o curativa para un organismo. Como enfermedad o dolencia se considera a este respecto cualquier estado en el que existan alteraciones o modificaciones espirituales-mentales y/o corporales de manera subjetiva y/u objetiva, o en el que se hace necesario el desarrollo contrario a las reglas de procesos de vida corporales, mentales o espirituales de asistencia a enfermos y eventualmente puede tener como consecuencia la incapacidad laboral.

25 Por una proteína o fragmento de proteína, cuya presencia puede aliviar una dolencia o que puede ser útil o favorecedor para el organismo, se entiende a este respecto aquellas proteínas o fragmentos de proteínas que deben facilitarse al organismo completa o temporalmente, sin que exista un defecto génico, que éstas faltan o bien debido a cualquier alteración o debido a hechos naturales o ya que éstas pueden aprovechar el organismo en determinadas circunstancias, por ejemplo en el tratamiento de defectos o en el contexto de implantes. A esto pertenecen también formas modificadas de proteínas o fragmentos de proteínas, es decir formas de proteínas que se modifican en el transcurso del metabolismo, por ejemplo formas maduradas de una proteína etc. Pueden facilitarse también proteínas que desempeñan un papel para procesos de crecimiento y angiogénesis, que son necesarias por ejemplo en caso de una regeneración controlada y entonces pueden producirse de manera dirigida mediante la introducción del ARN de acuerdo con la invención. Esto puede ser útil por ejemplo en procesos de crecimiento o para el tratamiento de defectos óseos, defectos de tejidos y en el contexto de implantes y trasplantes.

40 Se encontró que el ARNm modificado de acuerdo con la invención puede usarse ventajosamente para favorecer la encarnación de prótesis implantadas. El ARNm de acuerdo con la invención, cuando éste se encuentra a disposición en la superficie de prótesis que van a colocarse, tales como implantes dentales, endoprótesis coxales, endoprótesis de rodilla o cuerpos de fusión vertebrales, puede liberar factores que pueden favorecer la encarnación, la nueva formación de vasos y otras funciones que son útiles para la prótesis colocadas de nuevo. Así se conoce por ejemplo administrar sustancias de acción biológica, tales como factores de crecimiento como BMP-2 o factores de angiogénesis en el contexto de un implante de prótesis o después de esto. Dado que las sustancias biológicas tienen muy frecuentemente tiempos de vida medio sumamente cortos, era necesario hasta ahora dosificarlas de manera muy elevada, lo que carga al paciente con efectos secundarios fuertes. De acuerdo con la invención se evita este inconveniente, dado que usando el ARN de acuerdo con la invención pueden usarse las proteínas deseadas y/o necesarias dosificadas de manera dirigida y adecuada. Esto reduce o ahorra incluso al paciente los efectos secundarios. En esta forma de realización puede aplicarse el ARN de acuerdo con la invención, que codifica sustancias deseadas y/o necesarias, tales como factores de crecimiento, factores de angiogénesis etc., en un revestimiento que emite de manera dosificada el ARN sobre el implante y puede emitirse a partir de esto entonces de manera dosificada poco a poco, de modo que de manera continua o intermitente pueden generar y eventualmente liberar las células al entorno del implante los factores deseados. Los soportes, por regla general polímeros biocompatibles, sintéticos, naturales o de manera mixta naturales-sintéticos, cuyas propiedades de emisión pueden ajustarse de manera dirigida, se conocen bien y no necesitan por tanto explicarse de manera detallada en el presente documento. Se usan por ejemplo polímeros de polilactida o polilactida/glicolida. De esta manera es posible emitir los factores deseados de manera continua, intermitente, durante un tiempo más largo o más corto y de manera dirigida al sitio deseado.

60 Por un gen deficiente o defectuoso o una deficiencia o carencia se entiende en el contexto de la presente invención aquellos genes que no se expresan, no se expresan correctamente o no se expresan en volumen suficiente y debido a ello causan enfermedades o dolencias, por ejemplo causando éstos alteraciones metabólicas.

65 El ARN de acuerdo con la invención puede usarse de manera adecuada en cualquier caso, en el que debe facilitarse al organismo una proteína que de manera natural existiría en el organismo, sin embargo debido a defectos génicos o enfermedades no existe, existe en forma deficiente o existe en cantidad demasiado baja. Se conocen las proteínas o

los genes que codifican éstas, cuya deficiencia o defecto se relaciona con una enfermedad. A continuación se exponen distintas proteínas y genes, en cuya falta puede usarse el ARN de acuerdo con la invención.

Tabla 2

5

Enfermedades, para las que puede indicarse la administración de ARNm de acuerdo con la invención:		
Órgano	Defecto	
Pulmón	Deficiencia en proteína B de surfactante	
Pulmón	Deficiencia en ABCA3	
Pulmón	Fibrosis quística	
Pulmón	Deficiencia en alfa-1-antitripsina	
Proteínas plasmáticas	Defectos de coagulación tal como Hemofilia A y B	
Proteínas plasmáticas	Defectos de complementos tal como deficiencia en proteína C	
Proteínas plasmáticas	Púrpura trombótica, trombocitopénica (deficiencia en TPP, ADAMTS 13)	
Proteínas plasmáticas	Hemocromatosis congénita (p. ej.: carencia de Hpcidina)	
Defectos inmunitarios combinados graves (SCID) (linfocitos T, B y NK)		
Defectos inmunitarios combinados hereditarios X-cromosómicos (X-SCID)		
ADA-SCID (SCID como consecuencia de la carencia de adenosindesaminasa)		
SCID con mutación de RAG1		
SCID con mutación de RAG2		
SCID con mutación de JAK3		
SCID con mutación de IL7R		
SCID con mutación de CD45		
SCID con mutación de CD3δ		
SCID con mutación de CD3ε		
SCID con carencia de purinnucleósido-fosforilasa (carencia de PNP)		
Granulomatosis séptica (granulocitos)		
Enfermedad	Defecto o mutación	
CGD recesiva-X-cromosómica	Mutación del gen gp91-phox	
CGD positivo para citocromo b tipo 1	Mutación del gen p47-phox	
CGD positivo para citocromo b tipo 2	Mutación del gen p67-phox	
CGD negativo para citocromo b	Mutación del gen p22-phox	
Otras enfermedades de almacenamiento		
Mutación en el gen de glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher	
Mutación en el gen de GALC	Enfermedad de Krabbe	
Enfermedades de almacenamiento lisosómicas	Mucopolisacaridosis	

Enfermedades de almacenamiento de glucógeno		
Tipo	Defecto	Nombre propio
I (a-d)	Ia: glucosa-6-fosfatasa Ib, Ic, Id: glucosa-6-fosfato-translocasa	Enfermedad de Gierke
II	α-glucosidasa lisosómica	Enfermedad de Pompe
III	Enzima desramificadora de glucógeno	Enfermedad de Cori
IV	Enzima ramificadora de 1,4-α-glucano	Enfermedad de Andersen
V	Glucogenofosforilasa del músculo	Enfermedad de McArdle
VI	Sistema glucogenofosforilasa/fosforilasa cinasa (hígado y músculo)	Enfermedad de Hers
VII	Fosfofructocinasa (músculo)	Enfermedad de Tarui
VIII	Fosforilasa del hígado	
IX (a-c)	Fosforilasa del hígado	

Enfermedades de almacenamiento de glucógeno		
Tipo	Defecto	Nombre propio
X	Fosforilasa act. A AMPc	
XI	Defecto de GLUT-2	Síndrome de Fanconi-Bickel
0	UDP-glucógeno-sintasa	
Otras enfermedades de almacenamiento		
	Mutación en el gen de glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher
	Mutación en el gen de GALC	Enfermedad de Krabbe
	Enfermedades de almacenamiento lisosómicas	Mucopolisacaridosis

Otras enfermedades que se basan en genes defectuosos se indican a continuación:

Tipo	Variante	Características clínicas	Enzima defectuosa	
I-H	Síndrome de Hurler-Pfaundler	Dismorfia (gargolismo), retardo cognitivo, malformación del esqueleto (disostosis), enturbiamiento de la córnea, crecimiento reducido, hernias, hepatomegalia	α -L-Iduronidasa	
I-S	Enfermedad de Scheie	Mentalmente no limitado, malformación de esqueleto (disostosis), enturbiamiento de la córnea, lesión valvular	α -L-Iduronidasa	
I-H/S	Variante de Hurler/Scheie	Mentalmente entre I-H y I-S	α -L-Iduronidasa	
II	Síndrome de Hunter	Retardo cognitivo moderado, malformación del esqueleto (disostosis), modificaciones somáticas considerables, sordera prematura	Iduronatosulfatosulfatasa	
III	Síndrome de Sanfilippo	Tipo A	Retardo cognitivo, dismorfia, enturbiamiento de la córnea puede estar ausente, con frecuencia sordera, caminar con paso rápido	
		Tipo B		Heparansulfatosulfamidasa
		Tipo C		α -N-acetilglucosamidasa
		Tipo D		acetil-CoA: α -glucosaminid-N-acetiltransferasas
IV	Síndrome de Morquio	Tipo A	N-acetilglucosamin-6-sulfatosulfatasa	
		Tipo B	Forma de desarrollo leve del tipo A	β -galactosidasa
V	ahora: tipo I-S, véase anteriormente			
VI	Síndrome de Maroteaux-Lasny	Desarrollo cognitivo habitual, grave malformación del esqueleto (disostosis), enturbiamiento de la córnea, crecimiento reducido	N-acetilgalactosamin-4-sulfatosulfatasa	
VII	Síndrome de Sly	Dismorfia moderada y malformaciones del esqueleto, enturbiamiento de la córnea, inteligencia de habitual a limitada	β -glucuronidasa	

- 5 La tabla anterior muestra por consiguiente ejemplos de genes, cuyo defecto conduce a una enfermedad que puede tratarse mediante terapia de sustitución de transcrito con el ARN de acuerdo con la invención. En particular pueden mencionarse en este caso enfermedades hereditarias que afecten por ejemplo al pulmón, tales como deficiencia de SP-B, deficiencia de ABCA3, fibrosis quística y deficiencia de α 1-antitripsina; que afectan a proteínas plasmáticas y generan defectos de coagulación y defectos de complemento; defectos inmunitarios, tales como por ejemplo SCID;
- 10 granulomatosis séptica y enfermedades de almacenamiento. En todas estas enfermedades se encuentra una proteína, por ejemplo una enzima, defectuosa, que puede tratarse mediante tratamiento con el ARN de acuerdo con la invención, que facilita la proteína o un fragmento funcional de la misma codificada por el gen defectuoso.

- Ejemplos de proteínas que pueden codificarse por el ARN de acuerdo con la invención son por tanto eritropoyetina (EPO), hormona del crecimiento (somatotropina, hGH), regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), factores de crecimiento tales como GM-CSF, G-CSF, MPS, proteína C, hepcidina, ABCA3 y proteína B del surfactante. Otros ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con el ARN de acuerdo con la invención son hemofilia A/B, enfermedad de Fabry, CGD, ADAMTS13, enfermedad de Hurler, A- γ -globulinemia
- 15 mediada a través del cromosoma X, inmunodeficiencias relacionadas con adenosindeaminasa y el síndrome de dificultad respiratoria en neonatos, que está relacionado con SP-B. De manera especialmente preferente, el ARNm de acuerdo con la invención incluye la secuencia para proteína B del surfactante (SP-B) o para eritropoyetina. Otros ejemplos de proteínas que pueden codificarse por el ARN modificado de acuerdo con la invención son factores de crecimiento, tal como BMP-2 o factores de angiogénesis.
- 20

Otra área de uso del ARN de acuerdo con la invención resulta para aquellas enfermedades o dolencias en las que ya no se forman o no se forman proteínas en el organismo, por ejemplo debido a fallo orgánico. Actualmente se administra en tales enfermedades una proteína recombinante para la sustitución. De acuerdo con la invención se facilita para ello ahora ARN, de modo que la sustitución de la proteína ausente puede realizarse en el plano del transcrito. Esto tiene varias ventajas. En el caso de que la proteína presente glicosilaciones, entonces se consigue mediante la sustitución en el plano del transcrito que se realice en el organismo la glicosilación típica para los seres humanos. En caso de proteínas recombinantes, es decir generadas normalmente en microorganismos es la glicosilación por regla general distinta que en el organismo que va a sustituirse. Esto puede conducir a efectos secundarios. Generalmente ha de partirse de que la proteína expresada por el ARN de acuerdo con la invención sea idéntica a la propia del organismo con respecto a la estructura y glicosilación, lo que no es el caso por regla general con proteínas recombinantes.

Ejemplos de proteínas, cuya sustitución o uso puede desearse, son proteínas funcionales tales como eritropoyetina, factores de crecimiento, tal como somatotropina (hGH), G-CSF, GM-CSF y trombopoyetina.

Otro campo en el que puede usarse el ARN de acuerdo con la invención es el campo de la medicina regenerativa. Mediante procesos patológicos o mediante alteración se produce enfermedades degenerativas que pueden tratarse y paliarse o incluso curarse mediante alimentación de proteínas que no se producen o se producen muy poco debido a los procesos patológicos o de alteración. Mediante alimentación del correspondiente ARN que codifica estas proteínas puede detenerse el proceso de degeneración o incluso puede conducirse una regeneración. Ejemplos de esto son factores de crecimiento para la regeneración de tejido, que pueden usarse por ejemplo en trastornos del crecimiento, en enfermedades degenerativas, tales como osteoporosis, artrosis o cicatrización perturbada. El ARN de acuerdo con la invención ofrece en el presente documento no solo la ventaja de que puede facilitarse la proteína ausente de manera dirigida y en dosificación correcta, sino que es además posible proporcionar la proteína en un intervalo de tiempo. Así puede facilitarse por ejemplo en caso de cicatrización perturbada el correspondiente factor de curación o factor de crecimiento durante un tiempo limitado mediante administración dosificada del ARN. A través de mecanismos que van a explicarse posteriormente puede provocarse además que el ARN se lleve de manera dirigida al sitio de su acción deseada.

Ejemplos de factores que pueden expresarse con el ARN de acuerdo con la invención para actuar de manera regenerativa son factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), por ejemplo FGF-1-23; factor de crecimiento transformante (TGF), por ejemplo TGF- α , TGF- β , BMP (proteína morfogenética ósea), por ejemplo BMP1 a 7, 8a, b, 10, 15; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), por ejemplo PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D; factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A a F y PlGF); factores de crecimiento similares a insulina, por ejemplo IgF1 y IgF2; factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); interleucinas, por ejemplo interleucina-1B, IL-8, IL-1 a 31; factor de crecimiento nervioso (NGF) y otros factores que estimulan la formación de eritrocitos, neutrófilos, vasos etc.

También en el campo de las enfermedades cancerígenas puede usarse el ARN de acuerdo con la invención de manera dirigida. Mediante la expresión de receptores de linfocitos T apropiados en linfocitos T, que reconocen antígenos tumorales específicos asociados a tumor, pueden volverse éstos aún más eficaces. Se ha mostrado ya que en principio puede usarse con éxito ARNm en este campo. Su uso se ha impedido sin embargo hasta ahora por los efectos inmunogénicos ya descritos anteriormente. Con el ARN poco inmunógeno y altamente estable facilitado de acuerdo con la invención es ahora posible expresar receptores de linfocitos T de manera correspondiente.

El ARN de acuerdo con la invención puede usarse también para expresar factores de transcripción que se ocupan de que se reprogramen células somáticas en células madre embrionarias. Ejemplos de ello son O-cp3/4, Sox2, KLF4 y c-MYC. El ARN estable de acuerdo con la invención, en particular ARNm, que codifica estos factores de transcripción puede conducir por tanto a la generación de células madre, sin que se generen efectos secundarios que pueden producirse durante la transferencia génica considerada hasta ahora a través de vectores virales o no virales.

Una ventaja en la administración del ARN de acuerdo con la invención es que, a diferencia del uso de vectores de ADN, la duración del tratamiento puede ajustarse. En el caso de la inducción de células madre es deseable por regla general que los factores de transcripción sean activos solo de manera temporal para reprogramar células somáticas en células madre. Mediante la administración dosificada del correspondiente ARN que codifica los factores de transcripción puede controlarse temporalmente la actividad. A diferencia de esto, en el procedimiento conocido hasta ahora está presente el riesgo de la integración de los genes aplicados, que conduce a complicaciones, por ejemplo tumorigénesis, e impide además que pueda controlarse la duración.

También en el campo de las vacunas ofrece el ARN de acuerdo con la invención nuevas posibilidades. El desarrollo clásico de vacunas se basa en agentes patógenos muertos o debilitados. Recientemente se consideró también ADN que codifica una proteína del agente patógeno. La preparación de estas vacunas es costosa y dura mucho tiempo. Con frecuencia se producen efectos secundarios que conducen a que se prescinda de vacunaciones. Con el ARNm de acuerdo con la invención es posible facilitar una vacuna que no presente los problemas asociados con agentes patógenos o ADN. Además puede proporcionarse una vacuna de este tipo muy rápidamente, tan pronto como se

encuentren las secuencias antigénicas de un agente patógeno. Esto es especialmente ventajoso en caso de pandemias amenazantes. En una forma de realización de la presente invención se facilita por tanto un ARN que codifica una parte antigénica de un germen patógeno, por ejemplo un antígeno de superficie. Es posible también facilitar un ARNm que codifica una secuencia de aminoácidos, que presenta una combinación de varios epítomos, eventualmente unidos mediante segmentos espaciadores. Una combinación con sustancias inmunomoduladoras es también posible, o bien codificando el ARN una proteína de fusión o como combinación de ácidos nucleicos.

Además, el ARN de acuerdo con la invención puede codificar también aquellas proteínas que como factores, estimuladores, inductores etc., tienen influencia sobre el desarrollo de la enfermedad. Ejemplos son enfermedades que no pueden atribuirse directamente a un defecto génico, sin embargo en las que con ayuda de la expresión de ARNm puede influirse positivamente en el proceso de la enfermedad. Ejemplos son: eritropoyetina para la estimulación de la formación de eritrocitos, G-CSF o GM-CSF para la formación de neutrófilos, factores de crecimiento para la formación de nuevos vasos, para la cicatrización de huesos y heridas como factores para la "ingeniería de tejidos", tratamiento de tumores mediante inducción de la apoptosis o mediante formación de venenos celulares proteinosos, por ejemplo toxina diftérica A, mediante inducción de células madre pluripotentes (iPS) etc.

Se determinó que solo un polirribonucleótido de acuerdo con la invención, que presenta una proporción predeterminada de nucleótidos modificados y no modificados, presenta una baja inmunogenicidad con al mismo tiempo alta estabilidad. Para poder determinar, para un polirribonucleótido determinado, la combinación óptima de nucleótidos modificados y no modificados, pueden determinarse de manera en sí conocida la inmunogenicidad y estabilidad. Para la determinación de la inmunogenicidad de un ARN pueden usarse distintos procedimientos bien conocidos por el experto en la materia. Un procedimiento muy adecuado es la determinación de marcadores de inflamación en células como reacción a la administración de ARN. Un procedimiento de este tipo se describe en los ejemplos. Se miden habitualmente citocinas que están relacionadas con una inflamación, tal como por ejemplo TNF- α , IFN- α , IFN- β , IL-8, IL-6, IL-12, u otras citocinas conocidas por el experto en la materia. También la expresión de marcadores de activación DC puede usarse para la estimación de la inmunogenicidad. Otra indicación de una reacción inmunológica es la detección de la unión a los receptores de tipo Toll TLR-3, TLR-7 y TLR-8 así como una helicasa RIG-1.

La inmunogenicidad se determina por regla general en relación con un control. En un procedimiento habitual se administran a células o bien el ARN de acuerdo con la invención o un ARN no modificado o modificado de otra manera y la secreción de marcadores de inflamación se mide en un determinado intervalo de tiempo como reacción a la administración del ARN. Como patrón, con el que se compara, puede servir o bien ARN no modificado, debiendo ser más baja entonces la respuesta inmunitaria, o ARN, del que se sabe que no provoca ninguna respuesta inmunitaria o provoca una respuesta inmunitaria baja, debiéndose encontrar entonces la respuesta inmunitaria del ARN de acuerdo con la invención en el mismo intervalo y no debiendo ser elevada. Con el ARN de acuerdo con la invención es posible reducir la respuesta inmunitaria en comparación con ARN no modificado en al menos un 30 %, por regla general en al menos un 50 % o incluso en un 75 %, o incluso impedir la completamente.

La inmunogenicidad puede determinarse por medio de la medición de los factores mencionados anteriormente, en particular por medio de la medición del nivel de TNF- α y IL-8 así como la capacidad de unión a TLR-3, TLR-7, TLR-8 y helicasa-RIG1. Por consiguiente para determinar si un ARNm presenta la inmunogenicidad baja deseada, puede medirse la cantidad de uno o varios de los factores mencionados anteriormente tras la administración del respectivo polirribonucleótido. Así puede administrarse por ejemplo a ratones a través de la vena de la cola o i.p. una cantidad de ARNm que va a someterse a estudio y entonces se determinan uno o varios de los factores mencionados anteriormente en la sangre tras un espacio de tiempo predeterminado, por ejemplo tras 7 o 14 días. La cantidad de factor se correlaciona con la cantidad de factor que se encuentra en la sangre de animales no tratados. Ha resultado muy valioso para la determinación de la inmunogenicidad determinar la capacidad de unión a TLR-3, TLR-7, TLR-8 y/o helicasa RIG-1. Indicaciones muy buenas proporcionan también el nivel de TNF- α y el nivel de IL-8. Con el ARNm de acuerdo con la invención es posible reducir la capacidad de unión a TLR-3, TLR-7, TLR-8 y RIG-1 en al menos un 50 % en comparación con ARN no modificado. Por regla general se llega a reducir la unión a los factores mencionados en al menos un 75 % o incluso en un 80 %. En formas de realización preferentes se encuentra la capacidad de unión a TLR-3, TLR-7, TLR-8 y RIG-1 en el mismo intervalo para el ARNm de acuerdo con la invención y para animales a los que no se les administró ARNm. Con otras palabras, el ARNm de acuerdo con la invención no provoca prácticamente ninguna reacción inflamatoria o inmunológica.

En cada caso, el ARN de acuerdo con la invención presenta una baja inmunogenicidad de modo que el estado de salud del paciente no se ve influido. Por tanto, un aumento bajo de los factores mencionados anteriormente puede tolerarse tanto tiempo, en tanto que el estado de salud no se empeore debido a ello. Otras propiedades del ARNm de acuerdo con la invención son su eficacia y estabilidad. Para ello son importantes la eficacia de la transcripción, eficacia de la transfección, eficacia de la traducción y la duración de la expresión de proteínas y pueden determinarse con procedimientos en sí conocidos.

La eficacia de la transcripción indica cómo de eficaz puede generarse ARN a partir de ADN. En este caso pueden producirse problemas con el uso de una alta proporción de nucleótidos modificados. El ARN modificado de acuerdo con la invención puede prepararse con elevada eficacia de transcripción.

Para obtener una expresión estable y suficiente de las proteínas codificadas por el ARN, es importante que suficiente ARN alcancen las células deseadas. Esto puede determinarse, determinándose tras la administración de ARN marcado la proporción de ARN que ha alcanzado las células mediante medición de la marcación. Para la determinación de la marcación puede usarse citometría de flujo. Si se marcó con una molécula fluorescente, entonces puede calcularse la eficacia de la transfección por ejemplo como proporción porcentual de la población de células, en la que es más alta la intensidad de fluorescencia en comparación con células control que se trataron solo con PBS. Se encontró que el ARN modificado de acuerdo con la invención puede prepararse bien, a diferencia del ARN en el que dos o más tipos de nucleótidos están sustituidos en un 100 % por nucleótidos modificados, y que la eficacia de la transfección para ARN de acuerdo con la invención, en el que está modificado solo una parte de los nucleótidos, es ampliamente más alta que en el ARN, en el que está modificado un tipo de nucleótidos en cada caso en un 100 %.

La eficacia de la traducción se refiere a la eficacia con la que se traduce el ARN en la proteína. Cuanto más alta sea la eficacia de la traducción, más baja puede ser la dosis de ARN que debe usarse entonces para el tratamiento. La eficacia de la traducción puede determinarse, comparándose la proporción de traducción para ARN modificado de acuerdo con la invención con la tasa de traducción de ARN no modificado. La eficacia de la traducción es por regla general en el ARN de acuerdo con la invención algo más bajo que en ARN no modificado. Esto se vuelve más que equilibrado sin embargo mediante la estabilidad mucho más alta, que se expresa en la duración de la expresión de proteínas.

El ARN de acuerdo con la invención proporciona en particular una alta estabilidad que conduce a una expresión de proteínas prolongada. En particular cuando el ARN modificado de acuerdo con la invención está previsto para el tratamiento de enfermedades que se basan en defectos génicos, es este más valioso cuanto más tiempo permanezca en la célula. Cuanto más rápido se degrade el ARN más rápido finaliza la expresión de proteínas y con más frecuencia debe administrarse el ARN. Por el contrario puede reducirse mucho la frecuencia de dosificación con un ARN estable, que permanece durante mucho tiempo en la célula. Se encontró que el ARN modificado de acuerdo con la invención se expresa de manera estable hasta 4 semanas.

Para otras formas de realización, es decir cuando ARN está previsto solo para una expresión temporal, puede ajustarse la duración de la expresión de proteínas influyendo en la estabilidad.

Otra propiedad valiosa del ARN de acuerdo con la invención es por tanto que la duración de la acción puede ajustarse de manera dirigida a través de la estabilidad, de modo que la duración de la expresión de proteínas puede cortarse de modo que tenga lugar en un intervalo de tiempo deseado. Por otro lado puede usarse un ARN de acción muy larga ahí donde esto sea necesario. El ARN modificado de acuerdo con la invención, cuya expresión puede durar hasta 4 semanas, es por tanto idealmente adecuado para el tratamiento de enfermedades crónicas, dado que en este caso debe dosificarse solo las 4 semanas. También para formas de realización en las que el ARN codifica factores que deben alimentarse al organismo durante un tiempo mayor para paliar o impedir enfermedades, es ventajosa la alta estabilidad y la prolongada expresión de proteínas, por ejemplo para el uso de ARN que codifica eritropoyetina. De manera especialmente ventajosa puede usarse el ARN de acuerdo con la invención también para el tratamiento de hemofilia. En este caso es necesario hasta ahora administrar semanalmente el factor deficiente. Con la facilitación del ARN de acuerdo con la invención puede reducirse la frecuencia de la administración, de modo que el ARN que codifica el factor debe administrarse tan solo 2 semanas o incluso las 4 semanas.

La estabilidad del ARNm de acuerdo con la invención puede determinarse con procedimientos en sí conocidos. Son adecuados en particular procedimientos para la determinación de la capacidad de vida de las células que contienen ARN modificado de acuerdo con la invención en comparación con células que contienen ARN no modificado o completamente modificado, por ejemplo en comparación con ARN no modificado o modificado de manera conocida. Puede seguirse también la producción de la proteína codificada a lo largo del tiempo. Por estabilidad de un ARN se entiende en el presente documento que el ARN, cuando éste se ha llevado a la célula, puede expresar la proteína deseada o puede traducirse en la proteína o un fragmento funcional de la misma, sigue pudiendo expresar durante mayor tiempo, no se degrada pronto y no se inactiva.

Un procedimiento para someter a ensayo la estabilidad y la duración de supervivencia de ARN en una célula, consiste por tanto en determinar cuánto tiempo puede detectarse una proteína codificada por el ARN en la célula o cuánto tiempo ejerce su función. Los procedimientos para esto se describen en los ejemplos. Así, por ejemplo, un ARNm con una secuencia que codifica una molécula indicadora puede introducirse en la célula, eventualmente junto con un ARN que codifica una proteína deseada y tras espacios de tiempo predeterminados puede determinarse entonces la presencia de la molécula indicadora y eventualmente la proteína. Se conocen bien en el estado de la técnica moléculas indicadoras adecuadas y pueden usarse también en el presente documento aquéllas usadas habitualmente. En una forma de realización preferente se usa RFP, proteína de fluorescencia roja, como molécula indicadora.

Tal como se ha explicado anteriormente, puede usarse el ARN de acuerdo con la invención para la terapia, de modo que en la célula a la que se lleva el ARN puede formarse una proteína que no se expresa de manera natural o no se expresa en volumen deseado. El ARN de acuerdo con la invención puede usarse a este respecto tanto cuando la

proteína no se forma debido a una deficiencia de un gen, como también en los casos en los que no se forma una proteína debido a una enfermedad o en aquellos casos en los que la alimentación de la proteína sea ventajosa para el organismo. El ARN puede usarse también para completar una proteína expresada en volumen no suficiente. La dosis empleada en cada caso depende de la función que debe cumplir el ARN. Tal como se ha explicado anteriormente, la duración de la acción del ARN de acuerdo con la invención puede ajustarse de manera dirigida. La duración del tratamiento depende de la respectiva indicación. Si se usa el ARN para la terapia crónica de una enfermedad que se basa en un gen deficiente, será la duración de la acción tan larga como sea posible, mientras que pueda ajustarse ésta con otras indicaciones de manera dirigida en un intervalo de tiempo.

De acuerdo con una forma de realización especialmente preferente se usa como ARN un IVT-ARNm que codifica la proteína B del surfactante. Cuando esta proteína es deficiente en mamíferos se produce la formación del síndrome de disnea de prematuros y neonatos, también denominado síndrome de dificultad respiratoria. Este síndrome conduce debido a una enfermedad pulmonar en neonatos con frecuencia a la muerte. El uso de un ARNm modificado de manera múltiple transcrito *in vitro* que codifica SP-B, en el que están modificados del 5 % al 50 % de los nucleósidos de uridina y del 5 % al 50 % de los nucleósidos de citidina, tal como se indica en la reivindicación 1, conduce a que se forme la proteína y se atenúe o se cure la enfermedad.

De acuerdo con otra forma de realización preferente se usa como ARN un IVT-ARNm, que codifica eritropoyetina. La eritropoyetina es una proteína muy importante para el organismo, que por ejemplo en enfermedades renales ya no está a disposición en cantidad suficiente y por tanto debe alimentarse. Actualmente se usa para ello eritropoyetina recombinante, que se generó en microorganismos o células animales y por tanto presenta una glicosilación que no ocurre de manera natural. Con el uso de la EPO recombinante se producían en muy pocos casos efectos secundarios graves, por ejemplo una aplasia eritrocitaria.

El IVT-ARNm facilitado de acuerdo con la invención contiene un ácido ribonucleico que codifica eritropoyetina, en el que están modificados del 5 % al 50 % de los nucleótidos de uridina y del 5 % al 50 % de los nucleótidos de citidina, tal como se indica en la reivindicación 1. En una forma de realización especialmente preferente se facilita un ARNm que codifica EPO, en el que están modificados del 15 % al 25 % de los nucleótidos de uridina y del 15 % al 25 % de los nucleótidos de citidina. Se encontró que este ARNm presenta una inmunogenicidad fuertemente reducida en comparación con ARN no modificado. Al mismo tiempo muestra éste una eficacia de la transfección superior al 90 % y una estabilidad tal que el valor de hematocrito es elevado todavía tras 14 días. Dado que la EPO formada por el ARN de acuerdo con la invención en el organismo presenta la correcta glicosilación, no ha de temerse por efectos secundarios. Mediante la administración intermitente dirigida del ARN modificado de acuerdo con la invención, que codifica EPO, pudo mantenerse el valor de hematocrito durante mucho más tiempo al nivel deseado.

De acuerdo con la invención se facilita un ARN estable no inmunógeno, que puede emplearse *in vivo* en mamíferos y que facilita la proteína necesaria en una forma que es muy similar a la proteína propia del organismo existente de manera natural, si no es idéntica y en particular presenta la glicosilación propia del organismo.

El ARNm de acuerdo con la invención puede usarse directamente así, tal como está. Sin embargo existe también la posibilidad de modificar ARNm adicionalmente para introducir propiedades útiles adicionales. El ARNm puede modificarse por un lado, añadiéndose a la cadena codificante otras secuencias codificantes o no codificantes. Éste puede modificarse por otro lado también, uniéndose otras moléculas a grupos funcionales previstos en los nucleótidos modificados.

El ARNm de acuerdo con la invención puede combinarse con ligandos determinados que se unen a receptores de superficie específicos para las células diana, de modo que es posible una transfección mediada por receptor de la célula diana. Para ello pueden modificarse por un lado vehículos que son adecuados para la introducción de ARNm en células, o sin embargo el propio ARNm con un ligando. Ejemplos de vehículos adecuados para la introducción de ARNm en células son agentes catiónicos. A esto pertenecen lípidos catiónicos, polímeros catiónicos o también nanopartículas, nanocápsulas, nanopartículas magnéticas y nanoemulsiones. El experto en la materia conoce vehículos adecuados y se han descrito en la bibliografía. El experto en la materia también conoce bien ligandos adecuados y se han descrito en la bibliografía y pueden obtenerse. Como ligandos pueden usarse por ejemplo: transferrina, lactoferrina, clembuterol, azúcar, ácidos urónicos, anticuerpos, aptámeros etc.

El ARNm puede modificarse sin embargo también incluso con un ligando. Para ello son adecuados preferentemente ARNm con nucleósidos modificados que llevan en la posición 2' de la ribosa un grupo amino primario o un grupo azido. Pueden encontrarse ejemplos en la tabla anteriormente. Las modificaciones de este tipo se prefieren especialmente, dado que contribuyen a la actividad biológica. A través de estas modificaciones puede incorporarse fácilmente el ligando mediante formación de amida o la química "clic", por ejemplo a través de técnicas de bioconjugados.

Se describe también incorporar una secuencia de ARN que puede unirse a proteínas, por ejemplo receptores, (aptámeros), en el extremo 5' del ARNm. Este modo de proceder tiene la ventaja de que el ligando puede incorporarse ya en el plano de ADN directamente en la matriz y puede clonarse y mediante la IVT se incorpora en el ARNm. Ya no es necesaria, por tanto, ninguna modificación posterior del ARNm con el ligando.

Se describe también modificar el ARNm mediante modificaciones adicionales con polímeros inertes, por ejemplo polietilenglicol (PEG). El experto en la materia conoce bien procedimientos para esto, pueden usarse procedimientos tal como se conocen para ligandos. Así, por ejemplo, en una pequeña parte de los nucleótidos modificados usados para el ARNm de acuerdo con la invención puede preverse un sitio de unión para polietilenglicol, al que se une el PEG tras la transcripción. El polietilenglicol sirve para la estabilización extracelular del ARNm, es decir protege la molécula de polirribonucleótido, en tanto que éste haya llegado a la célula. Al entrar en la célula se disocia el PEG. La unión entre PEG y ARN se forma, por tanto, preferentemente de modo que se facilite la disociación al entrar en la célula. Para ello puede preverse por ejemplo un grupo funcional, que se disocie dependiendo del pH. También otras moléculas que estabilizan ARN pueden preverse a través de correspondientes sitios activos en los nucleótidos modificados. De esa manera puede protegerse el ARNm mediante estabilización estérica frente a la degradación enzimática y puede impedirse una interacción con partes constituyentes de biofluidos. El ARNm así modificado puede designarse como ARNm "sigiloso" ("*stealth*").

Un procedimiento preferente para la protección y para la estabilización de ARN se describe en el documento EP 11 98 489.

El ARN de acuerdo con la invención se protege preferentemente con los procedimientos descritos en el documento EP 11 98 489. Se encontró que por un lado el ARN modificado de acuerdo con la invención puede estabilizarse y protegerse también ventajosamente con este procedimiento, y por otro lado que no se limite o no se limite esencialmente la actividad de ARN de acuerdo con la invención tratado correspondientemente. Preferentemente se trata por tanto ARN modificado de acuerdo con la invención de acuerdo con el documento EP 11 98 489.

Un ejemplo de la regulación específica de célula es la incorporación de sitios de unión a micro-ARN para micro ARN 142-3p, que se expresa en células hematopoyéticas, sin embargo no en células de otro origen. Mediante esto se controla la expresión de modo que la traducción de ARNm en células hematopoyéticas está fuertemente reducida en comparación con otras células. De manera correspondiente puede controlarse la expresión en otros tipos de célula de manera dirigida mediante incorporación de los sitios de unión a micro-ARN adecuados en cada caso, que son conocidos por el experto en la materia.

Es igualmente posible combinar el ARNm de acuerdo con la invención con una diana o un sitio de unión para al menos un micro-ARN, que está presente solo en células sanas, sin embargo no en células afectadas por la enfermedad.

De esta manera se consigue que la proteína codificada por el ARNm se genere solo en las células que requieren la proteína. La elección de las dianas adecuadas se realiza con procedimientos rutinarios, que son bien conocidos por el experto en la materia. Un procedimiento habitual que se realiza en el plano de ADN es la clonación de un sitio de unión a micro-ARN en el 3'UTR (Gu *et al*, Nat Struct Mol Biol. 2009 Feb;16(2):144-50., Brown *et al*, Nat Biotechnol. 2007 Dec; 25(12):1457-67., Brown *et al*, Nat Med. mayo de 2006; 12(5):585-91., documento WO 2007000668). Ventajosamente se usa un ARN dotado de un sitio de unión para micro-ARN cuando el ARN codifica un veneno celular. En este caso es deseable especialmente llevar la proteína venenosa para células solo hasta allí donde debe desarrollar su acción. Para esta forma de realización puede ser ventajoso también ajustar la duración de la acción del ARN, modificándose de manera dirigida el ARN de modo que su estabilidad se encuentre en un intervalo de tiempo predeterminado.

Además puede combinarse el ARN de acuerdo con la invención con microARN o ARNhp en el sentido de 3' de la cola de 3'poliA. Esto tiene la ventaja de que el híbrido ARNm-microARN/ARNhp puede disociarse intracelularmente por Dicer y con ello pueden liberarse dos moléculas activas que intervienen en las distintas cascadas de la producción de la enfermedad. Un híbrido de este tipo puede facilitarse para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer o asma. El ARN de acuerdo con la invención es adecuado, por consiguiente, al mismo para complementar un ARNm deficiente e intervenir en una cascada de microARN defectuosa.

De acuerdo con la invención se facilita por consiguiente un ARN con propiedades ventajosas, que pueden someterse a ensayo con un procedimiento de selección, en el que se usa una secuencia que codifica una proteína indicadora, por ejemplo la proteína de fluorescencia roja (RFP). Cuando la toxicidad y la estabilidad de secuencias de un gen indicador con nucleótidos no modificados, modificados de manera sencilla o modificados de manera múltiple con distintas modificaciones se someten a ensayo para determinar su inmunogenicidad y la eficacia de la transfección, se muestra que solo el ARNm modificado de acuerdo con la invención, es decir modificado de manera múltiple, en el que en cada caso están sustituidos al menos el 5 % de los nucleósidos de uridina o nucleósidos de citidina por nucleósidos modificados, conduce a una inmunogenicidad muy reducida en comparación con los monocitos primarios humanos en sangre, y simultáneamente puede proporcionar altas tasas de transfección de más del 80 %. Esto puede someterse a ensayo por ejemplo en células epiteliales alveolares tipo II en seres humanos o en el ratón. Además, la duración de la expresión de ARN para ARN modificados de acuerdo con la invención es significativamente más larga que en caso de ARN conocido. Se encontró que principalmente debido a la estabilidad más alta y a la inmunogenicidad más baja del ARNm modificado de manera múltiple de acuerdo con la invención perdura durante más tiempo la expresión que en caso de preparados conocidos. En una valoración cuantitativa, un derivado modificado de acuerdo con la invención 10 días tras la transfección mostraba una cantidad 10 veces más

alta de producto de expresión que el ARN no modificado o modificado solo de manera sencilla.

5 Se describe también un procedimiento para la selección de secuencias de nucleótidos para someter a ensayo la inmunogenicidad y la calidad de la expresión, en el que se asocia la secuencia de ARNm con al menos un receptor seleccionado de TLR3, TLR3, TLR8 y helicasa-RIG-1 y se mide la capacidad de unión en comparación con una secuencia control. Como consecuencia control se usa una secuencia, cuya capacidad de unión se conoce. Cuanto más débil sea la unión a al menos uno de estos receptores, más prometedora es la secuencia.

10 Las propiedades del ARNm de acuerdo con la invención, en particular IVT-ARNm pueden someterse a ensayo con un procedimiento de selección en un ARN que expresa una proteína indicadora. Como proteína indicadora se prefiere la proteína de fluorescencia roja (RFP). Las secuencias que codifican esta proteína que presentan nucleótidos con distintas modificaciones, pueden someterse a estudio para determinar su inmunogenicidad y eficacia de transfección. Así pueden usarse para ensayos distintas modificaciones de ARNm, por ejemplo se sustituyen nucleósidos de uridina parcialmente por nucleósidos de 2-tiouridina (a continuación designado también como s2U) y se sustituyen nucleósidos de citidina parcialmente por nucleósidos de 5-metilcitidina (a continuación designado también como m5C).

20 Las figuras 1A, 1B, 1C y 2A y 2B muestran los resultados que se obtienen en la realización de un procedimiento de selección de este tipo. En los ejemplos pueden encontrarse particularidades más detalladas. Los resultados representados en las figuras se basan en ensayos que se han realizado para ARN de RFP y muestran que solo el ARNm modificado de manera múltiple, en el que están modificados en cada caso al menos el 5 % de los nucleósidos de uridina y en cada caso al menos el 5 % de los nucleósidos de citidina, puede conducir a una inmunogenicidad muy reducida en comparación con monocitos primarios humanos en sangre, tanto *ex vivo* como *in vivo* y al mismo tiempo puede proporcionar altas tasas de transfección de más del 80 % tanto en células epiteliales alveolares tipo II en seres humanos como en el ratón. Además, la duración de la expresión para ARNm modificados de acuerdo con la invención es significativamente más larga que para ARNm no modificado.

30 Además se describe un procedimiento para someter a ensayo si un ARN considerado es adecuado para la terapia, usando un ensayo de inmunoprecipitación de ARNm (RIP). Un ensayo RIP adecuado se describe en más detalle en los ejemplos. Los estudios han mostrado que las células del sistema inmunitario se activan mediante ARNm indicador no modificado a través de una unión de ARN al receptor tipo Toll (TLR) 3, TLR7, TLR8 y helicasa-RIG-1. Si los resultados muestran que la unión de un ARNm sometido a ensayo a TLR3, TLR7, TLR8 y/o RIG-1 está muy reducida en comparación con ARNm no modificado, es esto un indicio de la inmunogenicidad reducida. Pudo mostrarse que en este sentido las modificaciones múltiples usadas de acuerdo con la invención son significativamente más eficaces que las modificaciones s2U individuales. En los ejemplos se sometió a estudio la influencia de ARN en el nivel de IFN- γ , IL-12 y IFN- α , después de haber inyectado el ARN a ratones por vía intravenosa. Se mostró que el s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de RFP modificado de manera múltiple impedía una respuesta inmunitaria. De manera conjunta muestran los resultados obtenidos en los ejemplos que el ARNm modificado de manera múltiple reduce significativamente la unión a TLR y RIG-1 y con ello la respuesta inmunitaria disminuye en caso de expresión al mismo tiempo elevada y prolongada. Un ARN modificado de manera múltiple, en particular IVT-ARNm es por tanto un candidato adecuado para el tratamiento *in-vivo* de una enfermedad que se basa en un gen deficiente. Un candidato especialmente prometedor se explica brevemente a continuación y se describe en más detalle en los ejemplos.

45 Para someter a ensayo si es posible usar ARN modificado de acuerdo con la invención para el tratamiento en el pulmón, se introdujo ARNm modificado de manera múltiple, que codifica una proteína de fusión de proteína verde fluorescente potenciada, *enhanced green fluorescent protein*, y luciferasa (EGFP_{Luc}), directamente en el pulmón de un ratón y se sometió a ensayo si se expresaba luciferasa en comparación con ARN de EGFP_{Luc} no modificado. La expresión de luciferasa alcanzaba tras tres horas en el pulmón un máximo, aunque el flujo de luminiscencia total tras 50 24 horas disminuyó rápidamente hasta proporciones muy bajas 5 días tras el tratamiento. A diferencia de esto se observaron altos valores de expresión en ratones que se habían tratado con ARNm de EGFP_{Luc} modificado de manera múltiple, hasta 5 días tras el tratamiento.

55 En particular se facilita mediante la presente invención un ARN cuyo potencial terapéutico permite el tratamiento de la enfermedad que se atribuye a la deficiencia de SP-B, concretamente s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de SP-B. SP-B es un péptido anfipático relativamente pequeño que se codifica por un gen individual y mediante procesamiento proteolítico se genera un precursor con 381 aminoácidos en células epiteliales alveolares del tipo II, que revisten los alveolos. Se mejora la distribución, la adsorción y la estabilidad de los lípidos tensioactivos que se requieren para la reducción de la tensión superficial en los alveolos. En caso de falta de SP-B se producen síntomas como paredes alveolares espesas, infiltración celular y edemas intersticiales. Este daño pulmonar va acompañado de congestión, es decir un número elevado de eritrocitos, y un número elevado de macrófagos, neutrófilos y correspondientes proporciones de citocinas inflamatorias en el líquido de lavado broncoalveolar. La deficiencia congénita en seres humanos y estudios en ratones transgénicos han dado como resultado que SP-B desempeña un papel esencial en la supervivencia tras el parto. La deficiencia congénita en SP-B que se produce mediante mutaciones en el gen de 65 SP-B, es esencial para la sustitución del surfactante y conduce a un fallo mortal del tracto respiratorio en neonatos durante los primeros meses de vida. Un trasplante de pulmón es, por tanto, la única intervención terapéutica

disponible actualmente. Por tanto, una terapia con ARNm para la deficiencia en SP-B, que se posibilita con el ARN de acuerdo con la invención, es un tratamiento alternativo importante.

5 El ARN de acuerdo con la invención puede usarse para el tratamiento de esta enfermedad, preferentemente con perfluorocarbono como soporte.

10 Por tanto se describe también un preparado farmacéutico que comprende perfluorocarbono y $s2U_{(0,25)}m5C_{(0,25)}ARNm$ de SP-B. Esta combinación permite reconstituir SP-B en el pulmón de pacientes con deficiencia en SP-B, de modo que se eleven las posibilidades de supervivencia. Para ello es suficiente, debido a la alta estabilidad del ARN de acuerdo con la invención, una dosificación en intervalos regulares, por ejemplo de 1 a 3 veces a la semana. Preferentemente se administra para ello el ARNm de SP-B como aerosol por vía intratraqueal mediante pulverización con alta presión. Se encontró que el ARNm de acuerdo con la invención puede mejorar los síntomas descritos anteriormente y con ello la función pulmonar, lo que puede mostrarse mediante comprobación de los parámetros pulmonares, tal como se explica en detalle en los ejemplos.

15 El ARNm de acuerdo con la invención puede usarse de manera eficaz en procedimientos terapéuticos y hace posible un tratamiento de enfermedades que se basan en proteínas deficientes o defectuosas. Es posible una administración sistémica del ARNm modificado de manera múltiple. Existen casos en los que es indeseable la traducción de ARNm en células que no están afectadas por el defecto génico, por ejemplo ya que se producen efectos secundarios indeseados. Para poder traducir el ARNm de manera dirigida solo en las células que requieren la proteína codificada, por ejemplo en células en las que existe un defecto génico, puede complementarse el correspondiente vector en secuencias que permiten un direccionamiento del tejido afectado, por ejemplo a través de ligandos. En otra forma de realización, al vector que contiene el ARNm pueden añadirse secuencias a las que se unen micro-ARN endógenos, que no se expresan en las células diana, de modo que se degradan los ARNm en todas las células que contienen los correspondientes micro-ARN endógenos, mientras que permanecen en las células diana. Debido a ello pueden minimizarse los efectos secundarios.

20 El ARN de acuerdo con la invención puede administrarse de manera en sí conocida a pacientes que requieren la proteína o fragmento de proteína codificada por ARN, por ejemplo ya que estos tienen una enfermedad a base de un gen deficiente. Para ello se formula el ARN como preparado farmacéutico con coadyuvantes farmacéuticamente aceptables habituales. La forma del preparado depende del sitio y del tipo de administración. Dado que el ARN de acuerdo con la invención se caracteriza por una estabilidad especialmente alta, puede formularse de manera múltiple dependiendo de dónde y en qué forma debe administrarse. Se encontró que el ARN de acuerdo con la invención es estable de modo que éste puede liofilizarse, en esta forma puede procesarse, por ejemplo triturarse o molerse, y puede guardarse y entonces puede reconstituirse en caso necesario y conserva su actividad biológica.

30 Si el ARN se administra de manera sistémica, se formula éste habitualmente como líquido inyectable con coadyuvantes habituales, tales como agentes de ajuste de la tonicidad y estabilizadores, preferentemente como forma de dosificación unitaria. Como estabilizadores se usan los conocidos habitualmente, tales como por ejemplo lípidos, polímeros y nanosistemas o liposomas. En una forma de realización preferente se proporciona una composición adecuada para la administración parenteral, que contiene ARN modificado de acuerdo con la invención que codifica EPO.

45 En una forma de realización preferente, en particular cuando el ARN codifica la proteína SP-B, se proporciona el ARN de acuerdo con la invención en una forma adecuada para la incorporación a través del pulmón, por ejemplo mediante inhalación. El experto en la materia conoce para ello las formulaciones adecuadas. El preparado está en este caso en una forma que puede introducirse a través de nebulizadores o inhaladores habituales en el tracto respiratorio, por ejemplo como líquido que va a nebulizarse o como polvo. Se conocen dispositivos para la administración como líquido, siendo adecuados nebulizadores de ultrasonido o nebulizadores con una membrana oscilante perforada, que trabajan con fuerzas de cizallamiento bajas en comparación con nebulizadores de chorro de boquilla. Igualmente son adecuados aerosoles de polvo. Tanto con ARNm complejo con lípidos catiónicos como ARNm desnudo está disponible tras la liofilización con el azúcar sacarosa como polvo, que puede triturarse a continuación hasta obtener un tamaño habitual para el pulmón y muestra además actividad biológica.

55 Se describe en particular una composición farmacéutica prevista para la administración pulmonar combinada con perfluorocarbono, que se administra antes o simultáneamente con la composición farmacéutica para elevar la eficacia de transfección.

60 En otra forma de realización preferente se proporciona ARN modificado de acuerdo con la invención en un polímero de liberación retardada como soporte para el revestimiento de implantes. Para ello puede usarse tanto el ARN modificado de acuerdo con la invención en sí como también un ARN protegido con polímero de envoltura y/o complejo de polímero.

65 Otro objeto de la invención son implantes en cuya superficie se encuentra un revestimiento de un polímero de liberación retardada, que contiene ARN que codifica factores útiles para el arraigo del implante. De acuerdo con la invención se tienen en consideración a este respecto tanto revestimientos que contienen ARNm que codifica solo un

factor, como también aquellos revestimientos que contienen ARNm que codifican varios factores, por ejemplo distintos factores de crecimiento o factores de crecimiento y factores de angiogénesis u otros factores favorables para el arraigo. Los distintos factores pueden proporcionarse también en tal forma que se emitan de manera escalonada temporalmente.

5 Además ha de entenderse por la expresión “ARN que codifica uno o varios factores de crecimiento y uno o varios factores de angiogénesis” tanto una secuencia de ARN que codifica más de una proteína, individualmente o como proteína de fusión, como también una mezcla de distintas secuencias de ARN que codifican distintas proteínas, codifican cada secuencia de ARN en cada caso para una proteína.

10 La invención se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

15 Para poder valorar la aplicabilidad terapéutica de un IVT-ARNm, se evaluó si podría obtenerse IVT-ARNm no inmunógeno para una administración *in-vivo*. En una primera etapa se sometió a estudio por tanto ARNm transcrito *in vitro* para la proteína de fluorescencia roja (RFP) con nucleósidos modificados, en cuanto a la inmunogenicidad y la eficacia de la transfección. Los resultados muestran que ARNm modificado de manera múltiple, en el que están sustituidos el 25 % de la uridina por 2-tiouridina (s2U) y el 25 % de la citidina por 5-metilcitidina (m5C) proporciona (s2U_(0,25)m5C_(0,25))IVT-ARNm que tiene una inmunogenicidad muy reducida en comparación con células sanguíneas mononucleares primarias humanas, tal como se muestra en la figura 1A, y una alta tasa de transfección de más del 80 % en células epiteliales del tipo alveolar II tanto en seres humanos (figura 1B) como también en el ratón (figura 1C). Además, la duración de la expresión de ARNm se había prolongado significativamente (figura 2A). Los resultados muestran que esta expresión prolongada se basa principalmente en la estabilidad más alta del ARNm modificado de manera múltiple de acuerdo con la invención. Una evaluación cuantitativa absoluta mostraba una cantidad aproximadamente 10 veces más grande de s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de RFP 7 días tras la transfección (figura 2B). La eficacia de la traducción estaba algo reducida para el ARNm de RFP modificado y por tanto no podía contribuir a una actividad más alta y durante más tiempo (figura 4).

30 En la siguiente etapa se sometió a estudio el mecanismo en el que se basa la respuesta inmunitaria reducida, usándose un ensayo de inmunoprecipitación de ARN modificado (*RIP-Assay*). Los estudios han mostrado que las células del sistema inmunitario se activan mediante ARNm indicador no modificado (1), mediante la unión de ARN a receptor tipo Toll (TLR) 3 (2), TLR7 (3), TLR8 (4) y helicasa RIG-1 (5). Los resultados muestran que la unión del ARNm de RFP modificado de manera múltiple de acuerdo con la invención a TLR3, TLR7, TLR8 y RIG-1 estaba fuertemente reducida en comparación con ARNm de RFP no modificado. En este sentido, las modificaciones múltiples eran esencialmente más eficaces que una modificación s2U individual (figura 2C). Tal como podía esperarse de los estudios de unión, el ARNm de RFP no modificado elevaba IFN- γ , IL-12 y IFN- α en extensión considerable, cuando se inyectó por vía intravenosa en ratones, mientras que el s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de RFP modificado de manera múltiple impedía una respuesta inmunitaria (figura 2D). Estos resultados muestran en total que el ARNm modificado de manera múltiple de acuerdo con la invención reducía fuertemente la unión a TLR y RIG-1 y con ello la respuesta inmunitaria y al mismo tiempo elevaba y prolongaba la expresión, lo que hace que un ARNm de este tipo sea un candidato prometedor para ensayos *in-vivo*.

45 Por tanto se sometió a ensayo si un s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm, que codificaba para una proteína de fusión compuesta de proteína de fluorescencia intensamente verde y luciferasa (EGFP_{Luc}), que se introdujo directamente en los pulmones del ratón podía reforzar y prolongar la expresión de luciferasa *in vivo*, en comparación con ARNm de EGFP_{Luc} no modificado. Para este fin se usó un dispositivo de pulverización a alta presión en sí conocido para administración intratraqueal, tal como se describe por ejemplo en (6), administrándose previamente perfluorocarbono (Fluorinert FC-77) (7) para elevar la eficacia de la transfección. La expresión de luciferasa alcanzó un máximo tras 3 horas en los pulmones *in vivo*, aunque la luminiscencia total disminuyó rápidamente tras 24 horas hasta un nivel bajo 5 días tras el tratamiento (figura 3A y B). A diferencia de esto se observaron altos valores de expresión en ratones que se trataron con s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de EGFP_{Luc}, hasta el 5º día tras el tratamiento (figura 3A y B).

55 Esto muestra que el potencial terapéutico del ARNm modificado de manera múltiple de acuerdo con la invención es muy prometedor para la terapia. Se sometió a ensayo por tanto un s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de SP-B modificado de manera múltiple de acuerdo con la invención, para el tratamiento de ratones deficientes en SP-B. SP-B es un péptido anfipático relativamente pequeño que se codifica por un gen individual y mediante procesamiento proteolítico se transforma en un precursor con 381 aminoácidos en células epiteliales alveolares del tipo II, que revisten los alveolos (8, 9). Se mejora la distribución, la adsorción y la estabilidad de los lípidos tensioactivos que se requieren para la reducción de la tensión superficial en los alveolos. Cuando el gen para esta proteína es deficiente, se producen tras el parto trastornos en el tracto respiratorio que pueden conducir rápidamente a la muerte. Se observó que una carencia congénita en seres humanos y en ratones transgénicos desempeña un papel importante para la supervivencia postmortal (10). Una deficiencia congénita en SP-B que se produce mediante mutaciones en el gen de SP-B, impide la formación de los lípidos tensioactivos, lo que conduce a un fallo respiratorio durante los primeros meses tras el nacimiento (11). Un trasplante de pulmón es la única intervención terapéutica que es posible actualmente (12). Por tanto, una terapia con ARNm para la deficiencia en SP-B sería un tratamiento alternativo para

garantizar la viabilidad con esta carencia.

Por tanto se seleccionó un modelo de ratón noqueado (*knockout*) para la deficiencia en SP-B, para someter a ensayo una terapia génica con ARNm modificado de manera múltiple de acuerdo con la invención de SP-B. Para esto se seleccionó un modelo de ratón, en el que se expresó el ADNc de SP-B de ratón bajo el control de doxiciclina exógena en ratones noqueados para SP-B^{-/-}. La retirada de doxiciclina en ratones noqueados para SP-B^{-/-} adultos conducía a un contenido reducido en SP-B en el pulmón, lo que conducía a un fallo respiratorio cuando la concentración de SP-B caía por debajo del 25 % del nivel normal. Los ratones transgénicos acondicionados que recibieron doxiciclina sobrevivieron normalmente (13, 14). La estrategia terapéutica empleada comprendía lo siguiente: (i) pretratamiento de los ratones con perfluorocarbono antes de la alimentación de ARNm de SP-B para aumentar la expresión, (ii) administración repetida de ARNm de SP-B dos veces a la semana cada tres o cuatro días durante cuatro semanas (figura 3C). Para realizar un ensayo para demostrar este principio, se administró s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de SP-B a través de un nebulizador de alta presión por vía intratraqueal como aerosol a ratones noqueados para SP-B^{-/-} condicionales. Este tratamiento puso a salvo a los ratones frente a un fallo respiratorio y prolongó su intervalo de vida promedio hasta $28,8 \pm 1,1$ días (figura 3D), hasta el momento final del estudio. A diferencia de esto, tras la retirada de doxiciclina mostraron los ratones noqueados para SP-B^{-/-} no tratados síntomas de un problema respiratorio agudo en el intervalo de 3 a 4 días. Esto se observó también tras la administración de perfluorocarbono solo o perfluorocarbono con s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de EGFP_{Luc} como control, falleciendo los ratones entonces en el intervalo de $3,8 \pm 0,4$ días (figura 3D, y datos no mostrados). Además se confirmó una reconstitución exitosa de SP-B en los pulmones de los ratones tratados con s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de SP-B mediante inmunotinción (figura 3E) y análisis de inmunotransferencia de tipo Western semicuantitativa (figura 3F) para SP-B. La histología pulmonar era normal en ratones que se habían tratado durante 4 semanas con s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de SP-B, mientras que los pulmones de los ratones que habían obtenido s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de EGFP_{Luc} control mostraron paredes alveolares espesadas, infiltraciones celulares y edemas intersticiales tras 4 días (figura 3G). Este daño pulmonar estaba acompañado de una congestión (número elevado de eritrocitos) y un número elevado de macrófagos, neutrófilos y un elevado nivel de citocinas inflamatorias (figura 3H y figura S4) en el líquido de lavado broncoalveolar (BALF), mientras que esto se impidió en gran parte en los ratones tratados con ARNm de SP-B. Se mostró que la retirada de doxiciclina empeoró la función pulmonar sin tratamiento (14, 15). Se observó que un tratamiento más largo de ratones noqueados para SP-B^{-/-} con s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de SP-B mantenía la función pulmonar normal, al que igual que en los ratones noqueados para SP-B^{-/-} que recibieron doxiciclina (figura 3I y figura S5).

En resumen muestran estos resultados que todos los parámetros funcionales y patológicos de la deficiencia en SP-B en el pulmón se mejoraban esencialmente y eran comparables con ratones noqueados para SP-B^{-/-} condicionales, que recibieron doxiciclina.

Los resultados muestran la actividad terapéutica del ARNm modificado de manera múltiple en un modelo de ratón para una enfermedad pulmonar mortal. El empleo posterior de la terapia con ARNm sin embargo puede mejorarse aún tal como sigue: (i) una traducción de ARNm indeseada en células de tejido no afectado podría conducir a acciones indeseadas fuera del campo diana, (ii) cuando el ARNm modificado de manera múltiple llega también a tejido no afectado, debe facilitarse una cantidad suficiente de ARNm y (iii) es necesaria una dosificación repetida para una actividad breve de ARNm. Para mejorar esto puede recurrirse a la biología de micro-ARN, para impedir una traducción de ARNm indeseada en células no afectadas por la enfermedad. La incorporación de secuencias diana de micro-ARN endógenos que no se expresan en la célula diana, puede provocar de manera dirigida la degradación de ARNm en células no afectadas por la enfermedad, manteniéndose sin embargo el ARNm en las células diana, de manera que se minimizan los efectos secundarios (16, 17).

En otro planteamiento pueden combinarse sistemas de emisión, los determinados ligandos, que unen receptores específicos a superficies celulares, para que se permita una transfección mediada por receptores de la célula diana. Dado que actualmente puede prepararse ARNm en grandes cantidades (18) y son posibles procedimientos de preparación eficaces para la preparación también de ARNm modificado de manera múltiple a escala superior, es posible el uso clínico del ARNm de acuerdo con la invención y pueden desarrollarse sistemas de ARNm específicamente apropiados para cualquier enfermedad (19, 20), pudiéndose mantener en un mínimo la frecuencia de dosificación y la breve actividad, lo que no es posible con las terapias conocidas actualmente. De esta manera se proporciona de acuerdo con la invención una terapia molecular eficaz para el tratamiento de enfermedad que se basa en una deficiencia génica.

Ejemplo 2

Para demostrar que en ratones deficientes en SP-B se consigue una mejora del estado o un aumento de la esperanza de vida solo mediante uso del ARNm modificado de acuerdo con la invención, que codifica SP-B, se realizó otro ensayo. Se usaron el modelo de ratón y las condiciones tal como se describieron en el ejemplo 1.

Se formaron tres grupos de ratones. Un grupo de ratones deficientes en SP-B recibió dos veces en una semana ARNm modificado de acuerdo con la invención (B), un segundo grupo recibió durante 28 días dos veces por semana ARNm modificado de acuerdo con la invención (C), y para la comparación recibió un tercer grupo de ratones ARNm

de EGFP-Luc modificado (A).

Se mostró que los ratones que no recibieron SPB-ARNm modificado de acuerdo con la invención, murieron tras breve tiempo. Los ratones que recibieron el ARN de acuerdo con la invención sobrevivieron solo mientras que recibían el ARN de SP-B de acuerdo con la invención. Esto confirma que el ARN de acuerdo con la invención es biológicamente activo y puede sustituir una proteína necesaria.

En detalle se realizó el ensayo tal como sigue. Los ratones noqueados para SP-B, tal como se ha descrito en el ejemplo 1, recibieron o bien ARNm de EGFP-Luc modificado (A) (n = 10) o ARNm de SP-B modificado dos veces en una semana (B) (n = 4) o ARNm de SP-B modificado durante 28 días dos veces por semana (C) (n = 4). Se trazaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se realizó un ensayo de Wilcoxon-Gehan. Se encontró que la administración intratraqueal de ARNm de SP-B doblemente modificado dos veces en el intervalo de una semana en el pulmón de ratones SP-B transgénicos (B), en los que se controla el gen de SP-B mediante la adición de doxiciclina en agua potable, prolonga el tiempo de supervivencia promedio de los ratones tras la retirada de doxiciclina del agua potable antes del inicio del tratamiento hasta $10,2 \pm 0,5$ días (B), en comparación con $3,4 \pm 0,2$ días tras administración de un ARNm de EGFP-Luc control.

Los resultados están representados en el diagrama de la figura 12. Se muestra que la administración intratraqueal del ARNm de SP-B doblemente modificado de acuerdo con la invención es realmente salvadora de vidas. Sin adición del ARNm de acuerdo con la invención mueren los ratones tras breve tiempo. Este ensayo muestra también que por un lado ARNm de SP-B genera in vivo la SP-B necesaria para la vida y por otro lado que el ARNm de SP-B debe aplicarse continuamente para proteger a los animales de experimentación de la muerte.

Ejemplo 3

En otro ensayo, en el que se usaron los ratones descritos en el ejemplo 1, que recibieron todos doxiciclina, se sometió a estudio si el ARN de acuerdo con la invención provocaba en una fase temprana tras la administración reacciones inflamatorias. Para ello se formaron 5 grupos y se midieron el nivel de citocina, $IFN\gamma$ y IL-12, 8 horas tras la administración de distintos preparados en el lavado broncoalveolar de ratones. Los seis grupos recibieron los siguientes preparados: a) comparación, no tratados, es decir ni perfluorocarbono ni ARN; b) comparación, perfluorocarbono; c) comparación, perfluorocarbono y ARNm de SP-B no modificado; d) invención, perfluorocarbono y s2U_(0,25)m5C_(0,25)ARNm de SP-B modificado; e) comparación, perfluorocarbono y ADN de plásmido de SP-B; (n = 4). Se administraron en cada caso 20 μ g (50 μ l) de un preparado. Los resultados están mostrados en la figura 13. En la figura 13 se muestra el valor medio \pm error estándar. Se usan las siguientes abreviaturas en la figura 13: Doxi - doxiciclina, Pfc - perfluorocarbono, pDNA - ADN de plásmido (*P < 0,05 en comparación con el grupo no tratado).

Los resultados muestran que en la administración intratraqueal de ARNm no modificado o ADN de plásmido se eleva mucho el marcador de inflamación IL-12 en el lavado broncoalveolar, mientras que la administración de ARNm doblemente modificado en comparación con ratones no tratados no conduce a ningún aumento de IL-12. La administración de ARNm doblemente modificado si bien eleva el nivel del marcador de inflamación $IFN\gamma$ fácilmente, sin embargo solo en tanto que se observe éste también tras administración de perfluorocarbono. A diferencia de esto, la administración de ARNm no modificado o la administración de ADN de plásmido conduce también a un claro aumento del nivel de $IFN\gamma$. Con el uso del ARNm modificado de acuerdo con la invención no ha de temerse por consiguiente una reacción inflamatoria, mientras que la administración de ARNm no modificado o también de ADN de plásmido provoca rápidamente reacciones de inflamación.

Ejemplo 4

Para mostrar las posibilidades de uso del ARNm modificado de acuerdo con la invención se sometieron a estudio distintos tipos de modificaciones y su influencia sobre la eficacia de la transfección y eficacia de la traducción así como sobre la inmunogenicidad. Se transfectaron células A459 con en cada caso 200 ng de ARNm y después se sometió a estudio cuántas de las células se habían transfectado y en cuántas células se había traducido la proteína fluorescente. Esta evaluación se realizó a través de la intensidad de fluorescencia media (MFI). Los resultados están mostrados en la figura 10A. Se sometió a ensayo ARNm modificado de acuerdo con la invención y en comparación con esto un ARNm modificado no de acuerdo con la invención, en el que se usaron dos modificaciones distintas de nucleótidos de uridina así como ARNm no modificado. Las moléculas de ARNm modificado de acuerdo con la invención eran:

s2U/m5C o s4U/m5C, en el que los nucleótidos modificados tenían en cada caso una proporción del 10 % así como moléculas de ARN que adicionalmente a en cada caso el 10 %/10 % de s2U/m5C o s2U/5mC, contenían otro 5 % de nucleótidos modificados, concretamente una vez C_{2'}NH₂ y una vez un 5 % de G'₃N₃. Los resultados muestran que el ARNm modificado de acuerdo con la invención muestra una eficacia de la transfección muy alta, mientras que el ARNm no modificado y el ARNm modificado no de acuerdo con la invención muestran en cada caso una eficacia de la transfección y de la traducción ampliamente más baja.

Para el ARNm modificado descrito anteriormente se sometió a ensayo además la inmunogenicidad, sometiéndose a estudio el nivel de TNF- α en PBMC humanas, tras la administración de en cada caso 5 μ g de ARNm. Los resultados están representados en la figura 10B. Tal como se muestra de manera unívoca, es el nivel de TNF- α muy elevado con la administración de ARNm no modificado o con ARNm en el que se usaron dos tipos de nucleótidos de uridina modificados. El nivel de TNF- α , en el caso de los ARN modificados de acuerdo con la invención, es más bajo en al menos el 50 % que en caso del ARN no modificado.

Ejemplo 5

10 Procedimiento para la preparación de ARNm modificado de manera múltiple de acuerdo con la invención

a) Constructos para la transcripción *in-vitro*

15 Para la transcripción *in-vitro* de ADNc de RFP (678 pb) se usó un plásmido que contenía un promotor SP6, pCS2+DsRedT4. Para la transcripción *in-vitro* de ADNc de SP-B (1146 pb) se usó un plásmido de pVAX1 que contenía un promotor T7 (Invitrogen). Para generar el vector para la transcripción *in-vitro* de EGFPLuc (2,4 kb) se usó un constructo pST1-2 β -Globin-UTR-A-(120) que contenía un promotor T7, que se obtuvo tal como se describe en (19). Los constructos se clonaron usando técnicas convencionales de biología molecular.

20 Generación de ARNm modificado

Para generar moldes para la transcripción *in-vitro* se linealizaron los plásmidos de pCS2+DsRed.T4, EGFPLuc y SP-B con XbaI. Los ADN de vector linealizados se purificaron con el kit NucleoSpin-Extrakt-II (Macherey-Nagel) y se evaluaron espectrofotométricamente. La transcripción *in-vitro* se realizó con el ultrakit SP-6 y T7 mMACHINE (Ambion). El kit SP-6 tapó el ARNm con 7-metilGpppG, mientras que el kit T7 generó la caperuza antisentido análoga (ARCA; 7-metil-(3'-O-metil)GpppGm7G(5)ppp(5')G en una reacción de transcripción con rendimiento ultraalto. Para generar modificaciones de ARN se añadieron los siguientes trifosfatos de ribonucleótidos modificados a la mezcla de reacción en las proporciones indicadas: 2'-tiouridin-5'-trifosfato, 5'-metilcitidin-5'-trifosfato, pseudouridin-5'-trifosfato y N-metiladenosin-5'-trifosfato (todos de TriLink BioTechnologies y con respecto a la pureza controlados con HPLC y RMN-³¹P). Tras la transcripción *in-vitro* se poliadeniló enzimáticamente el ARN del plásmido de pVAX1-SP-B usando el kit de cola de poli(A) (Ambion). Las colas de poli(A) eran aproximadamente de 200 nt de longitud. Todos los ARNm tapados (RFP, EGFPLuc y SP-B) se purificaron usando el kit MEGAclear (Ambion) y se analizaron para determinar el tamaño y la pureza con el ensayo Agilent RNA6000 Nano en un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies).

35

Transfecciones de células

Transfección de células pulmonares

40 Las líneas de células epiteliales alveolares del tipo II de seres humanos y del ratón, A549 o MLE12, se cultivaron en medio esencial mínimo (Invitrogen), que estaba complementado con un 10 % de suero de ternera fetal (FCS), un 1 % de penicilina-estreptomina y un 0,5 % de gentamicina. Un día antes de la transfección se colocaron en placa 80.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Las células (más del 90 % de confluencia) se transfectaron con 200 ng de ARNm usando Lipofectamin 2000 (Invitrogen) de acuerdo con la instrucciones del fabricante. Tras 4 horas se lavaron las células con PBS y se añadió medio que contenía suero. Para análisis para la expresión a largo plazo se fragmentaron regularmente las células (cuando la confluencia era > 90 %).

45

Transfección en PBMC humana

50 Las PBMC humanas crioconservadas en nitrógeno líquido (CTL-Europe GmbH) se descongelaron cuidadosamente a 37 °C usando complemento de lavado anti-agregado CTL, añadiéndose lentamente RPMI-1640 esterilizado por filtración (Invitrogen). Para todos los ensayos descritos se usó una única carga caracterizada de PBMC para hacer reproducibles los datos.

55 Citometría de flujo

Un análisis de citometría de flujo se realizó en las células A549 y MLE12, que se habían transfectado con ARNm de RFP, tal como se ha descrito anteriormente. Las células se recogieron de la superficie de la placa con un 0,25 % de tripsina/EDTA, se lavaron tres veces con PBS y se suspendieron nuevo en PBS para medir la fluorescencia usando un FACSCalibur (BD Biosciences). La eficacia de la transfección se calculó a partir de la proporción porcentual de población de células que sobrepasaba la intensidad de fluorescencia de las células control que se habían tratado solo con PBS. Al menos se contaron 2500 células por tubo. Los datos se analizaron con Cellquest Pro.

60

Detección de citocina

Se realizaron ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) usando kit de IL-8 y TNF- α humano (RayBio), kit de IFN- γ y IL-12-(P40/P70) de ratón (RayBio) y kit de IFN- α de ratón (RnD Systems).

5

Traducción in vitro en tiempo real

Se tradujo 500 ng de ARNm de RFP in vitro usando lisado Retic IVT (Ambion). Se añadió metionina en una concentración final de 50 μ M. La mezcla se incubó a 30 °C en un baño de agua y en distintos momentos se extrajeron muestras y se midió la intensidad de fluorescencia a 590 nm en un contador WallacVictor² 1420 Multilabel (Perkin Elmer).

10

RT-PCR cuantitativa

El ARN total se extrajo a partir de células A549 con RNeasy Minikit (Qiagen) o a partir de PBMC humanas (véase a continuación el protocolo de RIP) y se sometió a una transcripción inversa (RT) en una mezcla de reacción de 20 μ l usando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad) de acuerdo con el manual del producto. El ADNc se amplificó usando iQ SYBR Green Supermix y iCycler (Bio-Rad) en mezclas de reacción duplicadas con los siguientes cebadores: RFP: 5'-GCACCCAGACCGCCAAGC (directo), RFP: 5'-ATCTCGCCCTTCAGCACGC (inverso). Los valores C_t se obtuvieron usando el software iCycler IQ 3.1 (Bio-Rad), que calculaba automáticamente los ciclos básicos y los valores umbrales.

15

20

Inmunoprecipitación de ARN (RIP)

Se transfectaron 1 x 10⁶ PBMC humanas (CTL-Europe GmbH) con 5 μ g de ARNm usando 12,8 μ l de Lipofectamin 2000 en 1 ml de OptiMEM 1. Tras 4 horas se complementaron los medios con un 10 % de FCS. Tras 24 horas se transfirió la suspensión celular a tubos y se sedimentaron las células mediante centrifugación de 10 minutos con 350 rpm. A continuación se usó una versión modificada del protocolo ChIP-IT-Express (ActiveMotive) para realizar la RIP. Se usó agua tratada con DEPC (Serva Electrophoresis) para la preparación de todos los reactivos necesarios. De acuerdo con el manual de ChIP-IT se añadió a las células la solución de fijación y a continuación la solución Glycin-Stop-Fix y 1 x PBS helado y las células se sedimentaron a 4 °C. Entonces se suspendieron las células de nuevo en tampón de lisis, al que se habían añadido los inhibidores de la proteasa PIC y PMSF, y se incubaron durante 30 min sobre hielo. Tras centrifugación durante 10 minutos con 2.400 rpm a 4 °C se sometió el sobrenadante a la reacción de captura. Los complejos de TLR-ARNm/RIG-ARNm se capturaron durante la noche en esferas magnéticas en tiras de 8-Napf-PCR, tal como se describe en el manual de ChIP-IT-Express. Además se añadió inhibidor de la SUPERase-RNasa (Applied Biosystems/Ambion) hasta una concentración final de 1 U/ μ l. Se usaron como anticuerpos IgG1 de ratón-TLR3 anti-humano, IgG1 de conejo-TLR7, IgG1 de ratón-TLR8 (todos de Imgenex) y IgG1 de conejo-RIG-1 (ProSci Incorporated). Tras el lavado de las esferas magnéticas se diluyeron los complejos de anticuerpos de TLR-ARNm/RIG-ARNm, se reticularon de manera inversa y se trataron con proteinasa K de acuerdo con el protocolo de ChIP-IT-Express. Finalmente se sometió el ARNm eluido a una transcripción inversa y a una RT-PCR cuantitativa, tal como se ha descrito anteriormente.

25

30

35

40

Bioluminiscencia *in-vivo*

Se disolvió el sustrato de D-luciferina en agua, se ajustó el valor de pH hasta 7 y el volumen final se ajustó de modo que se consiguió una concentración de 30 mg/ml. Se aplicaron 50 μ l de esta solución en los orificios nasales de los ratones anestesiados y se absorbieron mediante inhalación (1,5 mg de luciferina/ratón). Tras 10 min se midió la bioluminiscencia con un sistema de obtención de imágenes IVIS100 (Xenogen) tal como se describe en (21) usando los siguientes ajustes de cámara: campo visual 10, f1 f-stop, tiempos de alta resolución y de exposición de 1 a 10 min. La señal en la región del pulmón se evaluó cuantitativamente y se analizó, sustrayéndose el fondo usando el software Living Image versión 2.50 (Xenogen).

45

50

Ensayos con animales

Se mantuvieron ratones BALB/C hembras de 6 a 8 semanas de edad (Charles River Laboratories) en condiciones específicas libres de patógenos y se mantuvieron con un ciclo de 12 horas de claridad : 12 horas de oscuridad en jaulas individualmente aireadas, y se les proporcionó con pienso y agua *ad libitum*. Los animales se aclimataron al menos 7 días antes del inicio de los ensayos. Todas las manipulaciones de animales estaban permitidas y se controlaron por la comisión ética local y se realizaron según las directrices de la ley alemana de protección de animales. Para todos los ensayos, excepto para la inyección en la vena de la cola, se anestesiaron los animales i.p. con una mezcla de medetomidina (0,5 mg/kg), midazolam (5 mg/kg) y fentanilo (50 μ g/kg). Tras el respectivo ensayo se suministró a los animales un antídoto s.c., que estaba compuesto de atipamezol (50 μ g/kg), flumazenilo (10 μ g/kg) y naloxona (24 μ g/kg). Se extrajo sangre para los ensayos ELISA en distintos momentos mediante punción de la vena retrobulbar, usando capilares de 1,3 mm con heparina (Marienfeld).

55

60

65

Inyección en la vena de la cola:

Se mezclaron 25 µg de ARNm de RFP *in vivo* con Megafectin (MP Biomedicals Europe) en una proporción de ARNm con respecto al lípido de 0,25 y se añadió Enhancer-3 según la recomendación del fabricante. La integridad y el tamaño de partícula de los complejos inyectados se determinó con difracción de luz dinámica (DLS) usando un analizador de potencial zeta Zeta-PALS (Brookhaven Instruments Corp.). Los ratones se colocaron en un dispositivo inhibidor y se inyectaron 100 µl de la solución de ARNm/megafectina (equivalente a 5 µg de ARNm) en la cola de la vena en el intervalo de 30 segundos usando una aguja de calibre 27 y una jeringa de 1 ml.

10 Administración intratraqueal mediante nebulización a alta presión:

Se anestesiaron ratones BALB/c y ratones noqueados para SP-B^{-/-}, tal como se ha descrito en (14), y se fijaron a un sistema de placas (Halowell EMC) de modo que los dientes superiores estaban en un ángulo de 45°. Se usó un otoscopio de luz fría modificada Beta200 (Heine Optotechnik) para iluminar óptimamente la faringe. Con una pequeña espátula se abrió la mandíbula inferior del ratón y se usó una pinza roma para desplazar la lengua, y se despejó de manera máxima la orofaringe. Se usó un micropulverizador modelo 1A-1C, que estaba unido con una jeringuilla de alta presión modelo FMJ-250 (ambos de PennCentury-Inc.), por vía endotraqueal y sucesivamente se administraron 25 µl de Fuorinert FC-77 (Sigma) y 25 µl de ARNm de luciferasa (10 µg) o 50 µl de solución de ARNm de SP-B (20 µg). La jeringuilla del micropulverizador se retiró tras 5 s y el ratón se cogió del soporte tras 5 min.

20 Mediciones de la función pulmonar

Se anestesiaron ratones homocigóticos noqueados para SP-B^{-/-} ± doxiciclina ± ARNm modificado tal como se ha descrito anteriormente. Para impedir la respiración espontánea se inyectó bromuro de vecuronio (0,1 mg/kg) por vía intraperitoneal. Las mediciones mecánicas de pulmón se realizaron, tal como se ha descrito en (22). Dicho brevemente se usó una cánula de acero roma (diámetro exterior de 1 mm) en la tráquea con traqueostomía. El respirador con bomba de émbolo servía tanto como respirador como también como dispositivo de medición (flexiVent, SAV). Durante la ventilación tidal se ajustó el respirador a ventilación controlada limitada en volumen y presión (Vt = 10 µl/g; Pmáx = 30 cm de H₂O, PEEP 2 - 3 cm de H₂O) a 2,5 Hz y un 100 % de oxígeno. El Vt empleado era 8,4 ± 1,4 µl/g en animales que recibieron doxiciclina y 8,9 ± 0,4 ml/g de PC en animales que recibieron doxiciclina y ARNm (N.S.). Las propiedades dinámico-mecánicas del sistema de respiración al igual que la impedancia inicial del pulmón se midieron en intervalos de 5 minutos en animales, después de que se hinchara dos veces con 15 µl/g durante 1 s, para generar una historia de volumen estándar. Para la medición oscilatoria se interrumpió la ventilación en el nivel PEEP. Para determinar la impedancia del sistema respiratorio (Zrs) mediante oscilaciones forzadas (FOT), que estaban constituidas por una señal pseudoestadística oscilatoria de 8 s, se empleó una amplitud de 3 ml/g. La señal forzada tenía frecuencias entre 1,75 y 19,6 Hz (23, 24). Los datos se recogieron a 256 Hz y se analizaron con un intervalo de 4 s con un 66 % de solapamiento. Los datos de impedancia del pulmón se representaron como resistencia (parte real) y capacidad de reacción (parte imaginaria) del sistema de respiración dentro del dominio de frecuencias. Los datos de impedancia del pulmón (Zrs) se fragmentaron, usándose el modelo de fases constante del pulmón, tal como se propone por Hantos *et al.* (25). En este modelo, Zrs está constituida por una resistencia a la respiración (Rn), una inercia de las vías respiratorias (inercia), una elasticidad de tejido (H_L) y una atenuación del tejido (G_L) según la ecuación:

$$Zrs = Raw + j\omega law + (G_L - jH_L)/\omega^\alpha,$$

45 siendo ω la frecuencia angular y ω la dependencia con la frecuencia de Zrs ($\omega = (2/\omega \tan^{-1}(1/\omega))$). La histeresividad pulmonar ($\eta = G_L/H_L$) es una medida de la composición de tejido pulmonar, introduciéndose tanto la atenuación del tejido como también la elasticidad del tejido (26, 27). Para cada medición se somete a ensayo el modelo de fases constante de manera automática hasta obtener la adaptación. La calidad de la adaptación se representa como coherencia de la determinación (COD), los datos se rechazan cuando la COD está por debajo de 0,85.

Análisis de la proteína de surfactante

55 El contenido en proteína total de los sobrenadantes de lavado se determinó con el kit de ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad). Se separaron 10 µg de proteína total en condiciones no reductoras en geles de bis-tris al 10 % NuPage usando un sistema NOVEX Xcell II Mini-Cell (Novex). Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (ImmobilonP) con un módulo de transferencia NuPage (Novex). La proteína de surfactante B (SP-B) se detectó con antisuero de conejo policlonal, que estaba dirigido contra SP-B (c329, realizado por Dr. W. Steinhilber, Altana AG) y a continuación se realizó un ensayo de quimioluminiscencia mejorada (Amersham Biosciences) con anti-IgG de cabra anti-conejo policlonal conjugada con peroxidasa de rábano (1:10.000; Dianova).
60 Con estas condiciones pudo detectar el ensayo aproximadamente 2,5 ng de SP-B por carril (28). Como sistema de detección de la quimioluminiscencia se usó DIANA III dev. 1.0.54 con el analizador de imágenes Aida (Ray test Isotopenmessgeräte GmbH) y los datos se evaluaron cuantitativamente con Quantity One 4.6.7 (Bio-Rad).

Análisis microscópico de la fluorescencia

Se sometieron secciones fijadas (3 % de paraformaldehído) e incrustadas en parafina a una inmunohistoquímica, tal como se recomienda por el fabricante (Abcam, www.abcam.com/technica). Los soportes se incubaron con anticuerpo de anti-SP-B de ratón anti-humano y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con rojo Texas (los dos de Abcam, 1:500) y se contratiñeron con DAPI. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia de Zeiss Axiovert 135.

Estadística

Se analizaron las diferencias en la expresión de ARNm entre grupos mediante ensayos de reasignación-aleatorización fijados por parejas con el software REST 2005 (29). Los tiempos de vida medio para la disminución de la bioluminiscencia se calcularon con Prism 5.0. Todos los otros análisis se realizaron usando el ensayo de Wilcoxon-Mann-Whitney con SPSS 15 (SPSS Inc.). Los datos están indicados como valor medio \pm SEM (error estándar del valor medio) o como mediana \pm IQR (rangos intercuartílicos) y $P < 0,05$ (bilateral) se considera como estadísticamente significativo.

Ejemplo 6

ARNm modificado de manera múltiple de acuerdo con la invención que codifica EPO.

Con un procedimiento esencialmente, tal como se ha descrito en el ejemplo 3, se preparó ARNm modificado, que contenía una parte codificante para EPO. Este ARNm se sometió a ensayo para determinar su eficacia de la expresión. Para ello se inyectaron i.m. en cada caso 5 μ g de ARNm modificado de acuerdo con la invención o ARNm no modificado en ratones. Cada grupo de ratones tenía cuatro miembros. En el día 14 y en el día 28 tras la administración del ARN se evaluó cuantitativamente la proporción de EPO en el suero con un ensayo ELISA. El valor de hematocrito se evaluó en sangre completa de ratones en el mismo ensayo. Los datos mostrados en la figura 11 adjunta representan en cada caso el valor medio \pm SEM. El diagrama de dispersión muestra los valores de hematocrito individuales, las barras muestran valores medios. * $P < 0,05$ en comparación con el grupo no tratado en el respectivo momento; + $P < 0,05$ en comparación con el grupo mEPO no modificado en el respectivo momento.

(c) Los datos muestran el valor medio \pm SEM. Las PBMC humanas se transfectaron con 5 μ g de ARNm para RFP no modificado o modificado y las tasas de recuperación se determinaron con RIP usando anticuerpos específicos para TLR-3, TLR-7 y TLR-8. Las cuadrículas significan valores medios \pm IQR. Las rayas muestran los valores mínimos o máximos. * $P < 0,5$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparación con el grupo mEPO no modificado.

(d) Se inyectaron 5 μ g de ARNm de mEPO no modificado y modificado a ratones por vía intravenosa (en cada caso $n = 4$). Tras 24 horas se evaluaron el nivel de interferón- γ , IL-12 e interferón- α en suero cuantitativamente con ELISA.

Tal como puede deducirse de los diagramas, para el ARN modificado de acuerdo con la invención están los marcadores de inflamación en un intervalo poco llamativo, mientras que para ARN no modificado o ARN modificado solo con nucleótidos de uridina modificados son muy elevados los marcadores de inflamación.

De acuerdo con la invención se facilita por consiguiente un ARNm que codifica EPO, que es muy estable y al mismo tiempo no provoca a provoca pocas reacciones inmunológicas. Un ARNm de este tipo puede usarse ventajosamente para el tratamiento de carencia de eritropoyetina. Debido a la alta estabilidad es necesaria una dosificación solo de 2 a 4 semanas.

Ejemplo 7

Se sometió a estudio cómo repercute la administración repetida de ARNm modificado de acuerdo con la invención que codifica EPO en los valores de hematocrito. Mediante esto debe mostrarse si el ARNm modificado de acuerdo con la invención permanece activo durante un tiempo más largo, cuando se administra éste al organismo. Una reacción inmunológica al ARNm de acuerdo con la invención reduciría por ejemplo la actividad.

Se administraron por tanto 10 μ g de ARNm de mEPO modificado (tal como se ha descrito en el ejemplo 6) en los días 0, 21 y 34 a ratones por vía intramuscular ($n = 10$). El valor de hematocrito se determinó entonces en la sangre completa de los ratones en los días 0, 21, 34, 42 y 51. Los resultados están mostrados en la figura 14. Los datos en el diagrama muestran el promedio \pm error estándar * $P < 0,05$ en comparación con el valor de hematocrito en el día 0.

Los resultados demuestran que la administración repetida del ARNm modificado de acuerdo con la invención conduce a un aumento duradero por mucho tiempo del valor de hematocrito. Esto muestra que el ARNm permanece activo aunque se administre éste múltiples veces.

Ejemplo 8

5 El ARNm modificado de acuerdo con la invención es también adecuado para llevar al entorno de implantes proteínas que favorecen la curación o el arraigo, para favorecer debido a ello el proceso de curación o el arraigo. Para demostrar que el ARNm modificado de acuerdo con la invención se expresa de manera estable y permanente, cuando se aplica éste en forma de un revestimiento sobre superficies de titanio, se aplicó sobre placas de titanio un revestimiento que contenía ARNm que codificaba para luciferasa. Se comprobó entonces si pudo determinarse luciferasa en el entorno, libre o en células, y cuánto tiempo.

10 Se usaron para el ensayo dos secuencias que codifican dos proteínas distintas, concretamente un ARN para luciferasa, que se secreta por la célula que expresa ésta como modelo para aquellas proteínas que deben emitirse en el entorno, tales como por ejemplo factores de crecimiento o factores de angiogénesis. Además se usó ARN que codifica una luciferasa, que no se secreta, sino que permanece en la célula como modelo para aquellas proteínas que deben provocar algo en la célula. Para el modelo de secreción se usó ARN que codificaba para luciferasa de *Metridia*, en el que en comparación con el tipo natural estaban sustituidas el 25 % de las unidades de uridina por s2U y estaban sustituidas el 25 % de las unidades de citidina por m5C. Para el modelo de proteína de no secreción se usó un ARNm que codifica una luciferasa de luciérnaga, en el que igualmente estaban sustituidas el 25 % de las unidades de uridina por s2U y estaban sustituidas el 25 % de las unidades de citidina por la m5C modificada.

20 Se encontró que los preparados de ARNm de acuerdo con la invención, que estaba protegido como complejo con polímero, tras la emisión del material de revestimiento permanecían activos y se expresaban durante un tiempo mucho más largo. Se mostró que la proteína codificada en cada caso por el ARNm modificado de acuerdo con la invención pudo detectarse durante un tiempo más largo.

25 Para los ensayos se incrustó el ARNm modificado de acuerdo con la invención, protegido mediante un complejo de polímero, en un material de soporte que se aplicó como capa sobre placas de titanio. El material de soporte era polilactida (PDLLA), un material bien conocido para este fin, que puede liberar el ARNm contenido de manera dirigida paulatinamente. La ventaja de un revestimiento de este tipo es que la emisión puede ajustarse de manera dirigida. Los resultados muestran que los fragmentos de polilactida que se liberan durante la degradación no alteran la actividad del ARNm, de modo que este sistema es muy adecuado. El propio ARNm se estabilizó mediante un polímero de envoltura.

30 Para los ensayos se usó ARNm modificado o ADN de plásmido (pDNA) que codifica luciferasa de *Metridia*. Se complejaron en cada caso 9 µg de ADNp de luciferasa de *Metridia* o s2U(0,25)5C(0,25)ARNm doblemente modificado en 200 µl de H₂O (+ eventualmente 500 µg de lactosa) con 9,4 µg de L-PEI (L-polietiliminina) en 200 µl de H₂O. Después se añadieron los complejos en 100 µl de una solución de polímero de envoltura (2,4 µl de P6YE5C 409,1 mM) y se liofilizaron durante la noche (el polímero de envoltura P6YE5C se preparó tal como se describe en el documento EP 11 98 489). Después se suspendieron los complejos en 72 µl de una mezcla de PDLLA (poli-DL-lactida)/EtOAc (50 mg/ml de PDLLA) en hielo y se dispersaron con ayuda de un microhomogeneizador Potter. Con esta dispersión se revistieron placas de titanio sometidas a autoclave (r = 3 mm, en cada caso 18 µl) en una placa de 96 pocillos. Tras otra liofilización durante la noche se añadieron células A549 en 200 µl de medio RPMI-1640 (5000 células/200 µl). A partir del segundo día se quitaron en cada caso 50 µl de sobrenadante, se cambió el medio y con ayuda de en cada caso 100 µl de solución de coelenterazina (0,003 mM de concentración final) se determinó en los siguientes días la expresión de la luciferasa de *Metridia*.

45 En otro ensayo se sometió a prueba la actividad del ARNm modificado de acuerdo con la invención que codifica luciferasa de *Metridia*, cuando éste se depositó sobre partículas de fosfato de calcio y se introdujo en esta forma en el revestimiento. Para ello se mezclaron en cada caso 4 µg de s2U(0,25)m5C(0,25)ARNm de luciferasa de *Metridia* en 600 µl de 1 x HBS con 33 µl de CaCl₂ 2,5 M. Tras 30 min se revistieron con esto placas de titanio sometidas a autoclave (r = 3 mm, en cada caso 18 µl) en una placa de 96 pocillos. Tras liofilización durante la noche se añadieron células A549 en 200 µl de medio RPMI-1640 (5000 células/200 µl). A partir del segundo día se quitaron en cada caso 50 µl de sobrenadante, se cambió el medio y con ayuda de en cada caso 100 µl de solución de coelenterazina (0,003 mM de concentración final) se determinó en los siguientes días la expresión de la luciferasa de *Metridia*.

55 Los resultados pueden sacarse del diagrama en la figura 15. Los resultados aclaran que el ARNm modificado de acuerdo con la invención permanece aún activo también cuando se protege éste con una envoltura de polímero, se introduce en una matriz de liberación retardada y se aplica sobre implantes de titanio. El ARNm modificado de acuerdo con la invención permanece además biológicamente activo y se traduce continuamente en la proteína codificada. También permanece la capacidad de secreción, lo que se muestra en que puede detectarse la luciferasa de *Metridia* en el medio de cultivo celular (como modelo para factores de crecimiento de hueso secretados, tales como por ejemplo BMP-2). Los resultados muestran además sorprendentemente que el revestimiento con ARNm modificado proporciona una expresión de proteínas más alta que el revestimiento de implantes de titanio con el ADN de plásmido análogo. Cuando los complejos de ARNm/PEI se dotan de un polímero de envoltura antes de la incorporación en el revestimiento de implante de titanio, se obtiene una expresión de proteínas aún más alta que con

el uso de los mismos complejos, sin embargo sin polímero de envoltura (en la figura ARNm mod./IPEI-P6YE5C). Además se encontró que la adición de lactosa como coadyuvante es posible sin que el ARNm modificado pierda su actividad biológica.

- 5 Los resultados muestran también que el ARNm modificado precipitado sobre partículas de fosfato de calcio conserva su actividad y puede ejercer sus propiedades ventajosas en el revestimiento de implante de titanio. La actividad biológica permanece. Esto es especialmente importante, dado que puede incorporarse fosfato de calcio directamente en los huesos.
- 10 Tal como se ha indicado anteriormente, se realizó otro ensayo con ARN o ADN que codifica luciferasa de luciérnaga. Para ello se complejaron en cada caso 9 µg de ADNp de luciferasa de luciérnaga o s2U0,25m5C0,25ARNm modificado en 200 µl de H₂O con 9,4 µg de L-PEI en 200 µl de H₂O. Después se añadieron los complejos en 100 µl de una solución de polímero de envoltura (2,4 µl, P6YE5C 409,1 mM) y se liofilizaron durante la noche. A continuación se disolvieron los complejos en 72 µl de una mezcla de poli-DL-ácido láctico (PDLLA)/acetato de etilo (EtOAc) (50 mg/ml de PDLLA) en hielo y se dispersaron con ayuda de un microhomogeneizador Potter. Con esta dispersión se revistieron placas de titanio sometidas a autoclave (r = 3 mm, en cada caso 18 µl) en una placa de 96 pocillos. Tras otra liofilización durante la noche se añadieron células A549 en 200 µl de medio RPMI-1640 (5000 células/200 µl). En el segundo día se añadió a los pocillos en cada caso 1 µl de D-luciferina 350 mM, se incubó durante 20 min y se determinó la expresión de luciferasa por Bio-Imaging. Los resultados están mostrados en la figura 16. Tal como puede deducirse del diagrama en la figura 16, pueden revestirse implantes de titanio con ARNm modificado de acuerdo con la invención, permaneciendo biológicamente activo también además el ARNm y traduciendo la proteína codificada. La proteína formada permanece en la célula y puede detectarse intracelularmente. Además muestran los resultados que el revestimiento con ARNm modificado conduce a una expresión de proteínas más alta que el revestimiento de implantes de titanio con el ADN de plásmido análogo.

25

Ejemplo 9

Para controlar la expresión del ARNm modificado de acuerdo con la invención de modo que se exprese la proteína codificada solo en células en las que se desea esto, sin embargo en otras células no, se insertó un sitio de unión a micro-ARN en el ARNm para permitir una regulación específica de célula de la expresión de ARNm.

30

Para ello se cultivaron células HEK293 en MEM con un 10 % de FCS y un 1 % de penicilina-estreptomina. 24 h antes de la transfección se sembraron 100.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Inmediatamente antes de la transfección se sustituyó el medio por 400 µl de Optimem (Invitrogen). Se cultivaron células U937 en medio RPMI-1640 con un 10 % de FCS y un 1 % de penicilina-estreptomina. Inmediatamente antes de la transfección se sembraron 800.000 células U937 en 400 µl de medio Optimem (Invitrogen) por pocillo en una placa de 24 pocillos. Para cada pocillo se diluyeron 100 ng de ARNm de EGFP y 250 ng de miARN de ARNm de RFP de BS (véase a continuación) con Optimem hasta 50 µl. Se completaron 2 µl de Lipofectamine 2000 hasta 50 µl con Optimem y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se pipeteó la solución de ARNm en la solución de Lipofectamine-2000 y se incubó durante otros 20 min a temperatura ambiente. La solución resultante se pipeteó en los pocillos con las células y tras 4 h se añadió penicilina-estreptomina (5 µl) y se continuó la incubación en la incubadora durante la noche. Después se lavaron las células HEK293 con PBS y mediante adición de tripsina se desprendieron del fondo de los pocillos, antes de que se centrifugaran durante 5 min a 300 G. Las células U937 se centrifugaron igualmente durante 5 min a 300 G. Se sacó el sobrenadante y se lavaron las células a continuación en cada caso dos veces con PBS. A continuación se resuspendieron las células en 500 µl de PBS para el análisis de FACS. En los dos diagramas de la figura 17 está representada la proporción de la expresión de EGFP con respecto a la expresión de RFP como número de células positivas (figura 17a) y como intensidad de fluorescencia promedio de RFP (figura 17b).

45

50 Los resultados muestran que mediante la incorporación de un sitio de unión a micro-ARN en ARNm transcrito *in vitro* puede regularse la expresión de manera específica de célula. En el miARN de ARNm de RFP de BS se encuentra en el sentido 3' de la secuencia de RFP y en el sentido 5' de la cola de poliA la secuencia no traducida de una repetición cuádruple de un sitio de unión a micro-ARN, que están separados entre sí mediante secuencias espaciadoras cortas (SEQ ID N.º 1). Se usó un sitio de unión a micro-ARN, que se une al micro-ARN 142-3p. Este micro-ARN se expresa en células hematopoyéticas, como células U937, sin embargo no en células de otro origen, como células HEK-293. Cuando se une micro-ARN 142-3p al mi-ARN de ARNm de RFP de BS, por ejemplo en las células U937, se conduce la degradación del ARNm a través de la interferencia de ARN. Debido a ello se reduce la formación de RFP, es decir menos células expresan RFP con más baja intensidad que aquellas células en las que no está presente micro-ARN 142-3p. Para mostrar que este principio funciona bien también con el ARNm modificado de acuerdo con la invención, se cotransfectaron células U937 y HEK-293 en cada caso con ARNm de EGFP (sin sitio de unión a micro-ARN) y miRNA de ARNm de RFP de BS (con repetición en tándem cuádruplicada del sitio de unión a micro-ARN para el micro-ARN 142-3p) y a continuación se midió la expresión de EGFP y RFP por medio de FACS. Ya que el miRNA de ARNm de RFP de BS se degrada debido a la interferencia de ARN más rápidamente que en las células HEK-293, mientras que el ARNm de EGFP es igualmente estable en las dos células, se espera que la proporción de EGFP con respecto a RFP en células HEK-293 sea más alta que en células U937.

60

65

Esto pudo confirmarse en los ensayos realizados. La figura muestra claramente el número de células U937 positivas para RFP tras la normalización con respecto al número de células positivas para EGFP es claramente más bajo que en las células HEK-293. Lo mismo vale para la cantidad de RFP formada por célula. Los resultados muestran con ello también claramente que puede controlarse la extensión de la actividad biológica de ARNm transcrito *in vitro* mediante la incorporación de sitios de unión a micro-ARN tras la transfección en células. Mediante esto puede suprimirse la traducción de ARNm en aquellas células en las que es indeseable la traducción de ARNm. Debido a ello pueden reducirse también los efectos secundarios.

El ARNm usado para los ensayos en este ejemplo tiene la siguiente secuencia (SEQ ID N.º 1). Sombreado en gris está representada la secuencia de RFP. La secuencia subrayada muestra la cuádruple repetición en tándem del sitio de unión a micro-ARN para el micro-ARN 142-3p con secuencias espaciadoras. La secuencia se clonó tras la síntesis por medio de BamHI-EcoRV en el vector pVAX1.

GGATCC

CTAGAGTCGACTCCATAAAGTAGGAAACACTACACG

ATTCCATAAAGTAGGAAACACTACAACCGGTTCCATAAAGTAGGAAACACTACATCACTC

CATAAAGTAGGAAACACTACACAAA

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATATC

Bibliografía

1. K. Kariko *et al.*, *Mol Ther* (16 de septiembre, 2008)
2. L. Alexopoulou, A.C. Holt, R. Medzhitov, R.A. Flavell, *Nature* **413**, 732 (18 de octubre, 2001)
3. S.S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, C. Reis e Sousa, *Science* **303**, 1529 (5 de marzo, 2004)
4. F. Heil *et al.*, *Science* **303**, 1526 (5 de marzo, 2004)
5. M. Yoneyama *et al.*, *Nat Immunol* **5**, 730 (julio, 2004)
6. M. Bivas-Benita, R. Zwier, H.E. Junginger, G. Borchard, *Eur J Pharm Biopharm* **61**, 214 (octubre, 2005)
7. D.J. Weiss *et al.*, *Mol Ther* **8**, 927 (diciembre, 2003)
8. T.E. Weaver, J.A. Whitsett, *Am J Physiol* **257**, L100 (agosto, 1989)
9. S.W. Glasser *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 4007 (junio 1987)
10. J.A. Whitsett, T.E. Weaver, *N Engl J Med* **347**, 2141 (26 de diciembre, 2002)
11. L.M. Noguee, D.E. de Mello, L.P. Dehner, H.R. Colten, *N Engl J Med* **328**, 406 (11 de febrero, 1993)
12. A. Hamvas *et al.*, *J Pediatr* **130**, 231 (febrero, 1997)
13. J.C. Clark *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7794 (15 agosto, 1995)
14. K.R. Melton *et al.*, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L543 (septiembre, 2003)
15. M. Ikegami, J.A. Whitsett, P.C. Martis, T.E. Weaver, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**, L962 (diciembre, 2005)
16. B.D. Brown, M.A. Venneri, A. Zingale, L. Sergi, L. Naldini, *Nat Med* **12**, 585 (mayo, 2006)
17. B.D. Brown *et al.*, *Nat Biotechnol* **25**, 1457 (diciembre, 2007)
18. S.A. McKenna *et al.*, *Nat Protoc* **2**, 3270 (2007)
19. S. Holtkamp *et al.*, *Blood* **108**, 4009 (15 de diciembre, 2006)
20. M.L. Read *et al.*, *Nucleic Acids Res* **33**, e86 (2005)
21. M.K. Aneja, R. Imker, C. Rudolph, *J Gene Med* **9**, 967 (noviembre 2007)
22. P. Dames *et al.*, *Nat Nanotechnol* **2**, 495 (agosto 2007)
23. J.J. Pillow, T.R. Korfhagen, M. Ikegami, P.D. Sly, *J Appl Physiol* **91**, 2730 (diciembre 2001)
24. T.F. Schuessler, J.H. Bates, *IEEE Trans Biomed Eng* **42**, 860 (septiembre 1995)
25. Z. Hantos, A. Adamicza, E. Govaerts, B. Daroczy, *J Appl Physiol* **73**, 427 (agosto 1992)
26. C.M. Alleyne, I.D. Frantz, 3rd, J.J. Fredberg, *J Appl Physiol* **66**, 542 (febrero 1989)
27. P.D. Sly, R.A. Collins, C. Thamrin, D.J. Turner, Z. Hantos, *J Appl Physiol* **94**, 1460 (abril 2003)
28. M. Griese *et al.*, *Respir Res* **6**, 80 (2005)
29. M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, *Nucleic Acids Res* **30**, e36 (1 de mayo, 2002)

Aparte de eso, la publicación se refiere a los siguientes puntos:

- 5 1. Polirribonucleótido con una secuencia que codifica una proteína o un fragmento de proteína, en el que el polirribonucleótido contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en el que del 5 al 50 % de los nucleótidos de uridina y del 5 al 50 % de los nucleótidos de citidina son nucleótidos de uridina modificados o nucleótidos de citidina modificados.
- 10 2. Polirribonucleótido con una secuencia que codifica una proteína o un fragmento de proteína, obtenible a partir de una mezcla de nucleótido de los nucleótidos ATP, GTP, CTP y UTP, en el que del 5 al 50 % de los nucleótidos de citidina y del 5 al 50 % de los nucleótidos de uridina están modificados.
- 15 3. Polirribonucleótido según el punto 1 o el punto 2, caracterizado por que el polirribonucleótido es ARNm.
4. Polirribonucleótido según el punto 3, caracterizado por que el ARNm es ARNm transcrito *in vitro* (IVT-ARNm).
5. Polirribonucleótido según una de los puntos anteriores, caracterizado por que el ARN codifica una proteína o un fragmento de proteína, cuyo defecto o deficiencia puede desencadenar una enfermedad, que puede paliar, impedir o sanar una dolencia, o que puede contribuir a una función útil o necesaria.
- 20 6. Polirribonucleótido según una de los puntos anteriores, caracterizado por que del 15 al 30 %, preferentemente del 7,5 al 25 % de los nucleótidos de uridina y del 15 al 30 %, preferentemente del 7,5 al 25 % de los nucleótidos de citidina están modificados.
- 25 7. Polirribonucleótido según uno de los puntos anteriores, caracterizado por que contiene al menos dos tipos de nucleósidos de uridina modificados y/o al menos dos tipos de nucleósidos de citidina modificados.
8. Polirribonucleótido según el punto 7, caracterizado por que al menos un tipo de los nucleósidos de uridina y/o nucleósidos de citidina modificados presenta como modificación un grupo funcional para el acoplamiento de uno o más vehículos funcionales.
- 30 9. Polirribonucleótido según uno de los puntos anteriores, caracterizado por que las uridinas modificadas se seleccionan de 2-tiouridina, 5-metiluridina, pseudouridina, 5-metiluridin-5'-trifosfato (m5U), 5-yodouridin-5'-trifosfato (I5U), 4-tiouridin-5'-trifosfato (S4U), 5-bromouridin-5'-trifosfato (Br5U), 2'-metil-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato (U2'm), 2'-amino-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato (U2'NH₂), 2'-azido-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato (U2'N₃), 2'-fluoro-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato (U2'F).
- 35 10. Polirribonucleótido según uno de los puntos anteriores, caracterizado por que las citidinas modificadas se seleccionan de 5-metilcitidina, 3-metilcitidina, 2-tiocitidina, 2'-metil-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato (C2'm), 2'-amino-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato (C2'NH₂), 2'-fluoro-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato (C2'F), 5-yodocitidin-5'-trifosfato (I5C), 5-bromocitidina-5'-trifosfato (Br5U), 2'-azido-2'-desoxicitidin-5'-trifosfato (C2'N₃).
- 40 11. Polirribonucleótido según uno de los puntos anteriores, caracterizado por que presenta una caperuza m7GpppG y/o al menos un sitio de entrada a ribosoma interno (IRES) y/o una cola de poliA en el extremo 5'.
- 45 12. Polirribonucleótido según uno de los puntos anteriores para el uso en terapia de reemplazo de transcriptor.
13. Polirribonucleótido según uno de los puntos anteriores, caracterizado por que contiene una secuencia de ARNm que codifica al menos un factor que es útil y apoya al organismo en general o en una situación determinada.
- 50 14. Polirribonucleótido según uno de los puntos anteriores, caracterizado por que contiene una secuencia de ARN que codifica un factor de crecimiento, factor de angiogénesis, estimulador, inductor, una enzima u otra molécula biológicamente activa.
- 55 15. Polirribonucleótido según uno de los puntos anteriores, caracterizado por que contiene una secuencia de ARN que codifica la proteína B del surfactante (SP-B), EPO, ABCA3, BMP-2 o un fragmento de los mismos.
16. Polirribonucleótido según el punto 13, que contiene una secuencia que codifica SP-B, para su uso para el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria en neonatos.
- 60 17. Polirribonucleótido según el punto 13, que contiene una secuencia que codifica EPO, para su uso para el tratamiento de carencia de EPO.

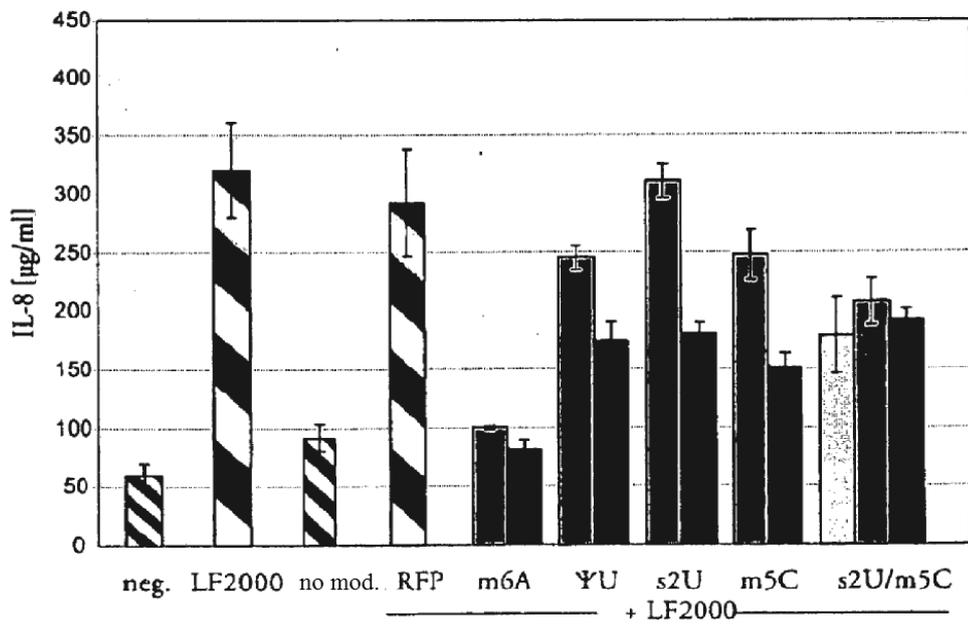
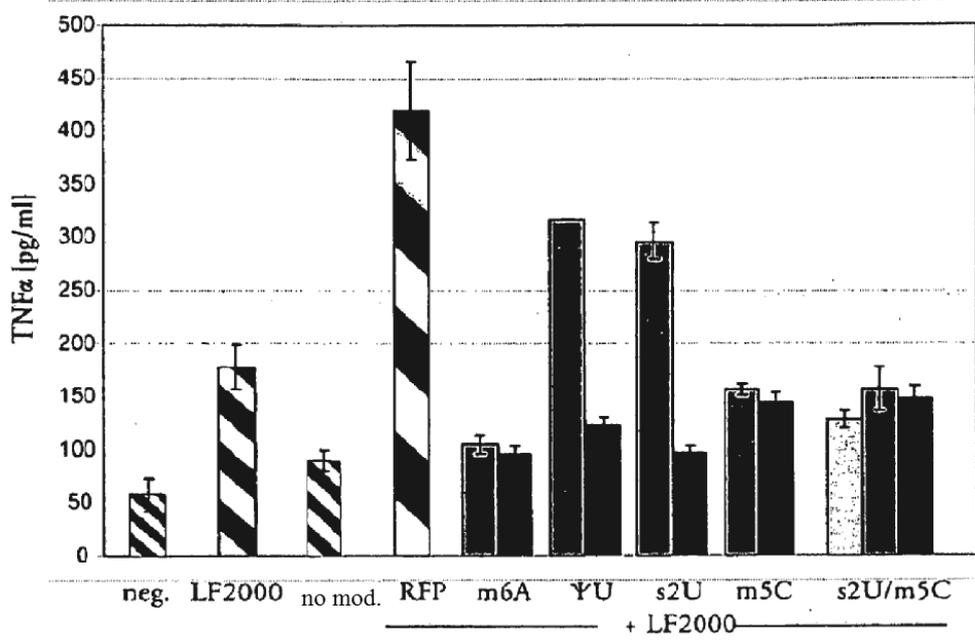
18. Polirribonucleótido según el punto 13, que contiene al menos una secuencia que codifica un factor de crecimiento, factor de angiogénesis, estimulador, inductor o una enzima, para su uso para el revestimiento de un implante.
- 5 19. Polirribonucleótido según uno de los puntos anteriores, que contiene además al menos una secuencia objetivo o una secuencia diana para micro-ARN endógenos, que no se expresan en las células diana.
20. Polirribonucleótido según el punto 8, caracterizado por que el vehículo funcional es una secuencia objetivo, un grupo PEG y/o un ligando de direccionamiento.
- 10 21. Composición farmacéutica que contiene al menos un ARN según uno de los puntos anteriores junto con coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.
- 15 22. Composición farmacéutica según el punto 21 en una forma para la administración intratraqueal y/o pulmonar o en forma de una capa que va a aplicarse sobre un implante.
23. Composición farmacéutica según el punto 22, que presenta adicionalmente al menos un perfluorocarbono para la administración antes o durante la administración de la composición que contiene ARN.
- 20 24. Composición farmacéutica según el punto 23, que contiene perfluorocarbono y ARNm de s2U_(0,25)m5C_(0,25)SP-B.
- 25 25. Implante con un revestimiento de ARN modificado según uno de los puntos 1 a 20 en un polímero de liberación retardada como soporte.
26. Implante según el punto 25, que es un implante dental, una endoprótesis coxal, endoprótesis de rodilla o un cuerpo de fusión vertebral.
27. Implante según el punto 25 o 26, en el que el polímero de soporte contiene al menos un tipo de ARN modificado.
- 30 28. Implante según uno de los puntos 25 a 27, en el que el polímero de soporte contiene ARN que codifica al menos una proteína útil en relación con un implante.
- 35 29. Implante según uno de los puntos 25 a 28, en el que el polímero de soporte contiene ARN que codifica uno o varios factores de crecimiento y uno o varios factores de angiogénesis.
- 40 30. Procedimiento para la selección de secuencias de nucleótidos para someter a ensayo la inmunogenicidad y la calidad de la expresión, en el que se asocia la secuencia de ARNm con al menos un receptor seleccionado de TLR3, TLR3, TLR8 y helicasa-RIG-1 y se mide la capacidad de unión.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polirribonucleótido con una secuencia que codifica una proteína o un fragmento de proteína, en el que el polirribonucleótido contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en el que del 5 al 50 % de los nucleótidos de uridina y del 5 al 50 % de los nucleótidos de citidina son nucleótidos de uridina modificados o nucleótidos de citidina modificados y en el que los nucleótidos de uridina modificados son 5-yodouridina y los nucleótidos de citidina modificados son 5-yodocitidina.
- 10 2. Polirribonucleótido según la reivindicación 1, caracterizado por que el polirribonucleótido es ARNm.
3. Polirribonucleótido según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que del 5 al 30 % de los nucleótidos de uridina y del 5 al 30 % de los nucleótidos de citidina están modificados.
- 15 4. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que del 7,5 al 25 % de los nucleótidos de uridina y del 7,5 al 25 % de los nucleótidos de citidina están modificados.
- 20 5. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que contiene una secuencia de ARN que codifica una hormona del crecimiento tal como somatotropina, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), factores de crecimiento tales como GM-SCF, G-CSF, proteína C, hepcidina, ABCA3 y proteína B del surfactante, un factor de angiogénesis, estimulador, inductor, una enzima, un receptor de linfocitos T, eritropoyetina (EPO), BMP-2 o un fragmento de los mismos.
- 25 6. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polirribonucleótido contiene un ARN que codifica SP-B, SP-C o ABCA3, para su uso para el tratamiento de enfermedades pulmonares.
7. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polirribonucleótido contiene un ARN que codifica CFTR para su uso para el tratamiento de fibrosis quística.
- 30 8. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polirribonucleótido puede expresar receptores de linfocitos T a medida, para su uso para el tratamiento de enfermedades cancerígenas.
9. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polirribonucleótido contiene una secuencia que codifica una parte antigénica de un agente patógeno, para su uso como vacuna.
- 35 10. Polirribonucleótido según la reivindicación 6, que contiene una secuencia que codifica SP-B, para su uso para el tratamiento de síndrome de dificultad respiratoria en neonatos.
- 40 11. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene una secuencia que codifica EPO, para su uso para el tratamiento de carencia de EPO.
12. Polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene al menos una secuencia que codifica un factor de crecimiento, factor de angiogénesis, estimulador, inductor o una enzima, para su uso para favorecer el proceso de curación y el arraigo de un implante.
- 45 13. Composición farmacéutica que contiene al menos un ARN según una de las reivindicaciones 1 a 5 junto con coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.
14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, en la que como coadyuvante está contenido al menos un agente de estabilización seleccionado de lípidos, polímeros, nanosistemas y liposomas.
- 50 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 13 o 14 en una forma para la administración intratraqueal y/o pulmonar.
- 55 16. Vehículo que está constituido por un polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 5 y un agente catiónico.
17. Implante con un revestimiento de ARN modificado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 en un polímero de liberación retardada como soporte.
- 60 18. Implante según la reivindicación 17, que es un implante dental, una endoprótesis coxal, endoprótesis de rodilla o un cuerpo de fusión vertebral.
- 65 19. Implante según la reivindicación 17 o 18, en el que el polímero de soporte contiene al menos un tipo de ARN modificado y/o en el que el polímero de soporte contiene ARN que codifica al menos una proteína útil en relación con un implante y/o en el que el polímero de soporte contiene ARN que codifica uno o varios factores de crecimiento y uno o varios factores de angiogénesis.

20. Uso de un polirribonucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 5 para el revestimiento de un implante.

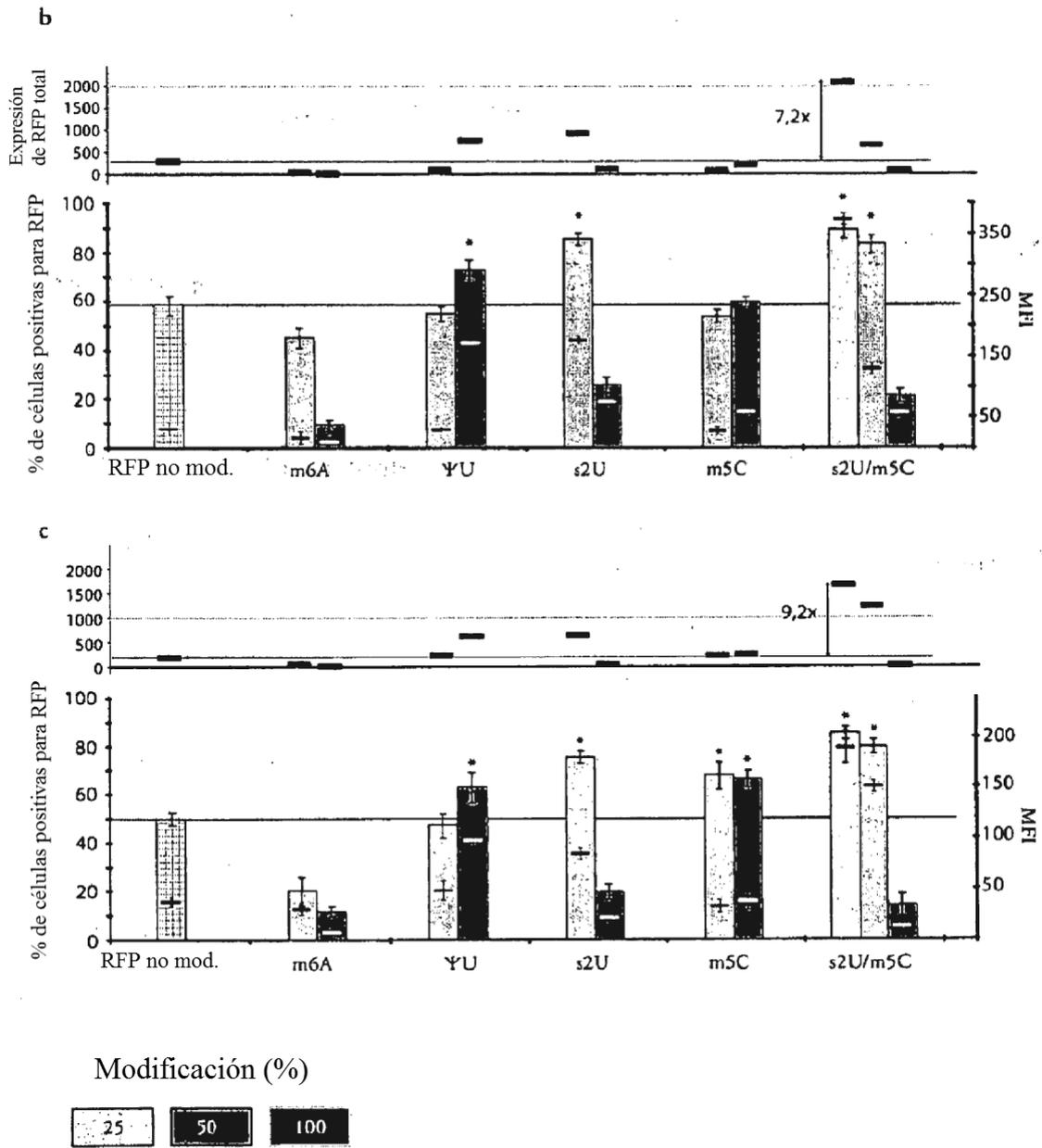
a



Modificación (%)

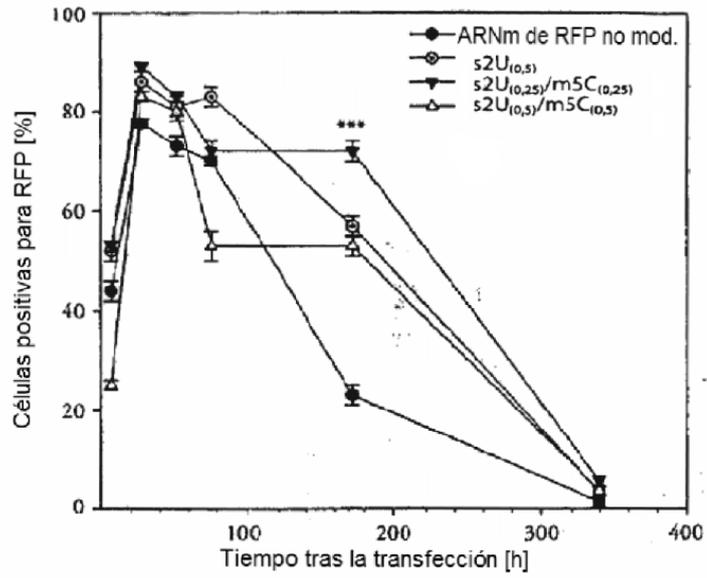


Figura 1a

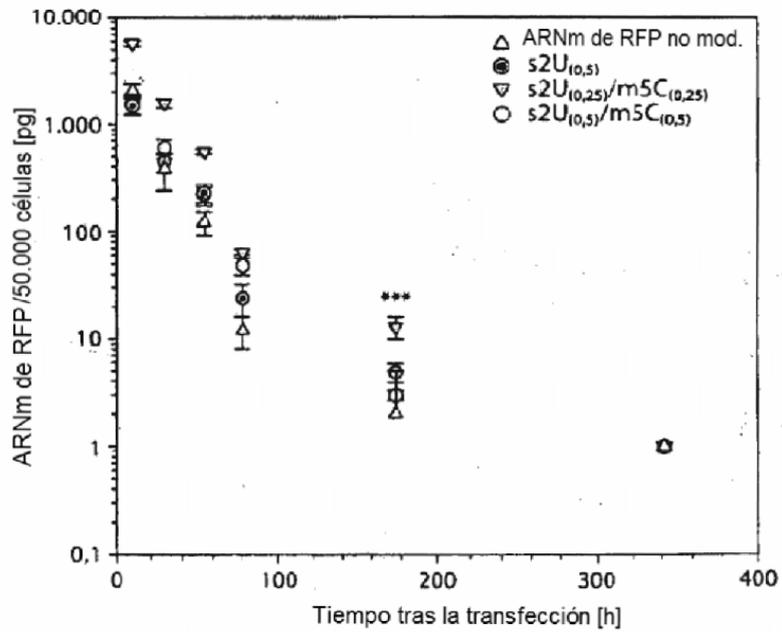


Figuras 1b y 1c

a



b



Figuras 2a y 2b

c

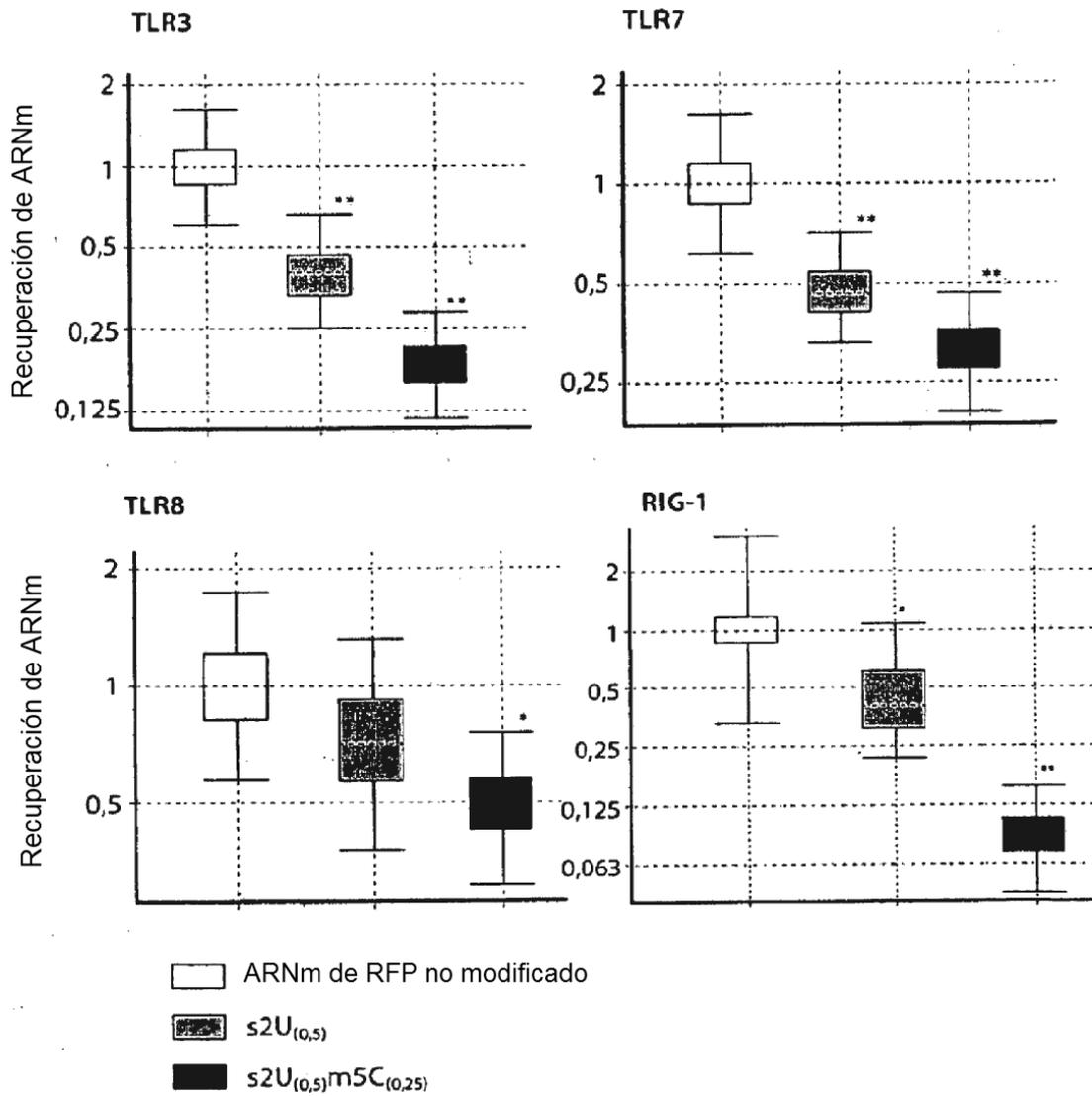


Figura 2c

d

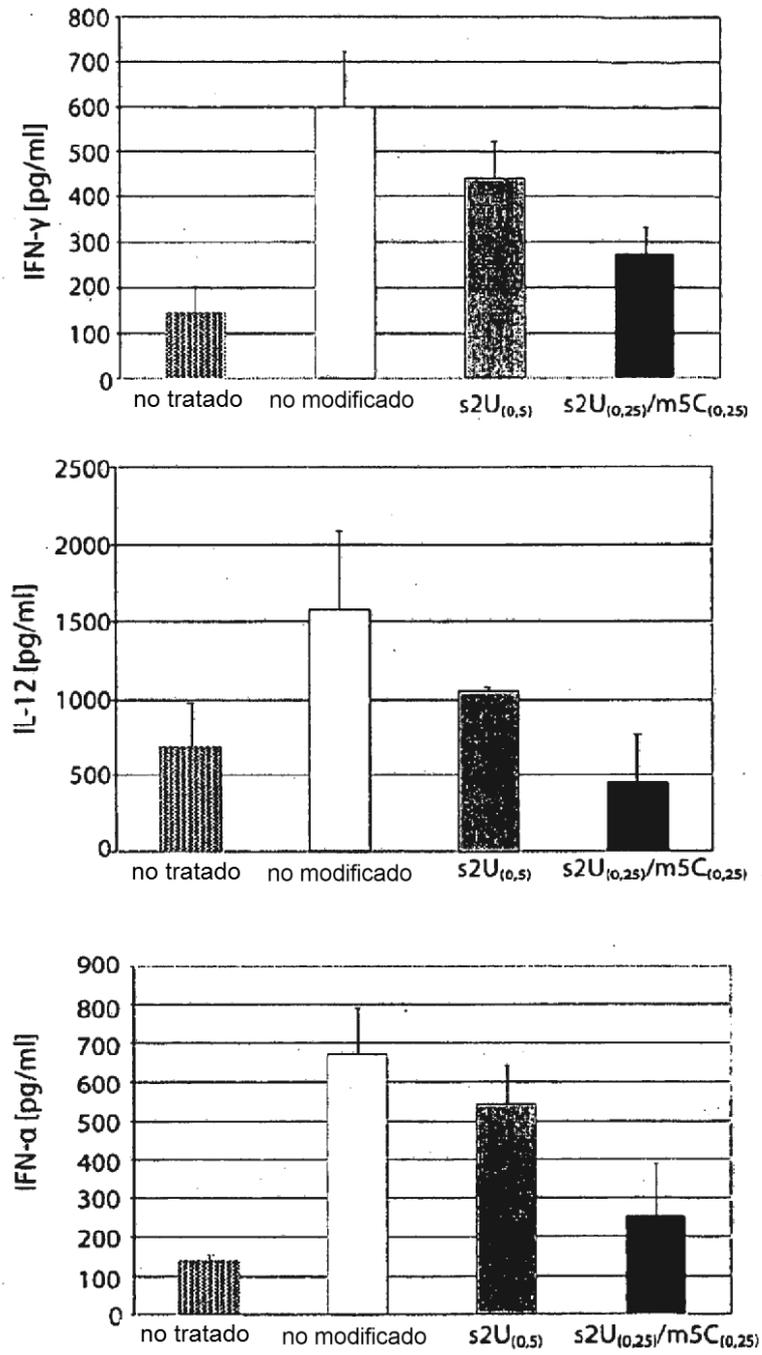
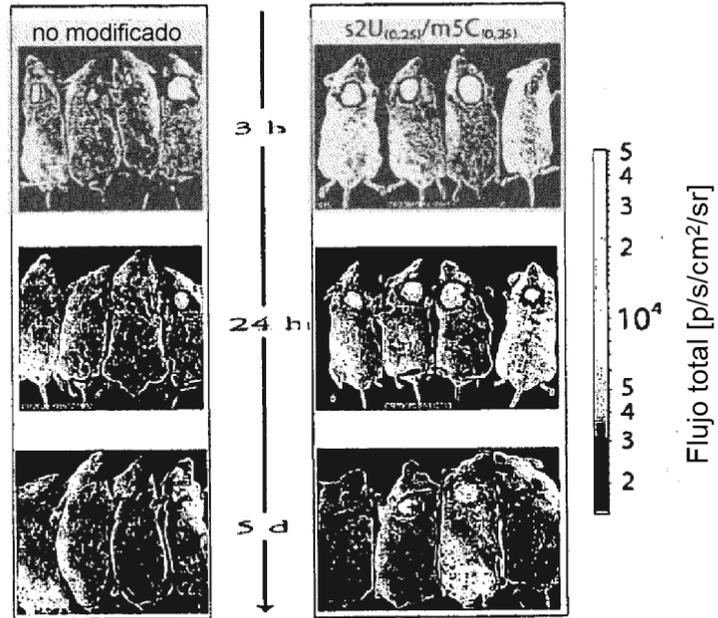
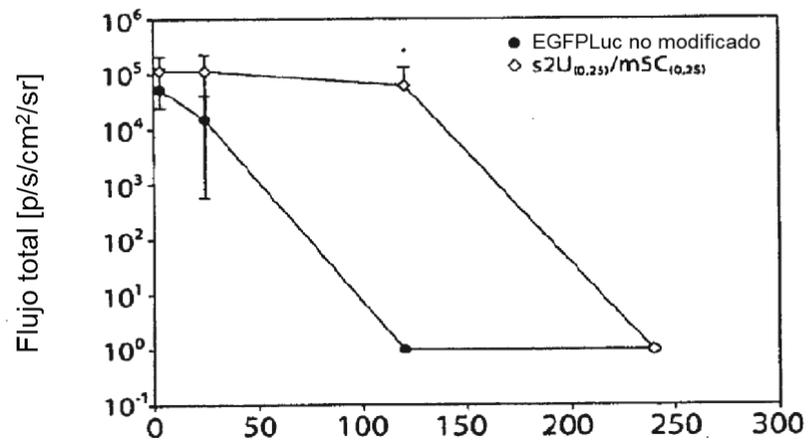


Figura 2d

a

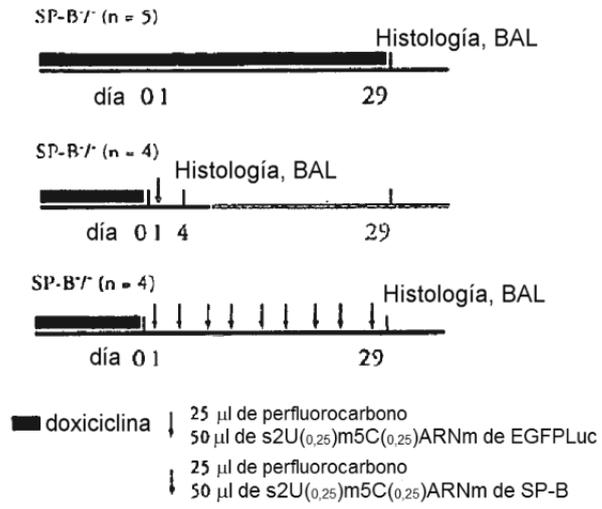


b

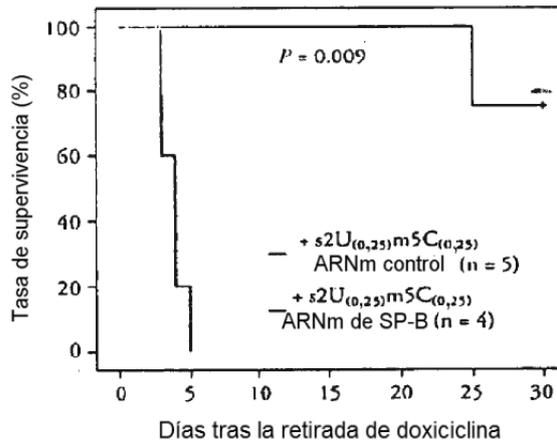


Figuras 3a y 3b

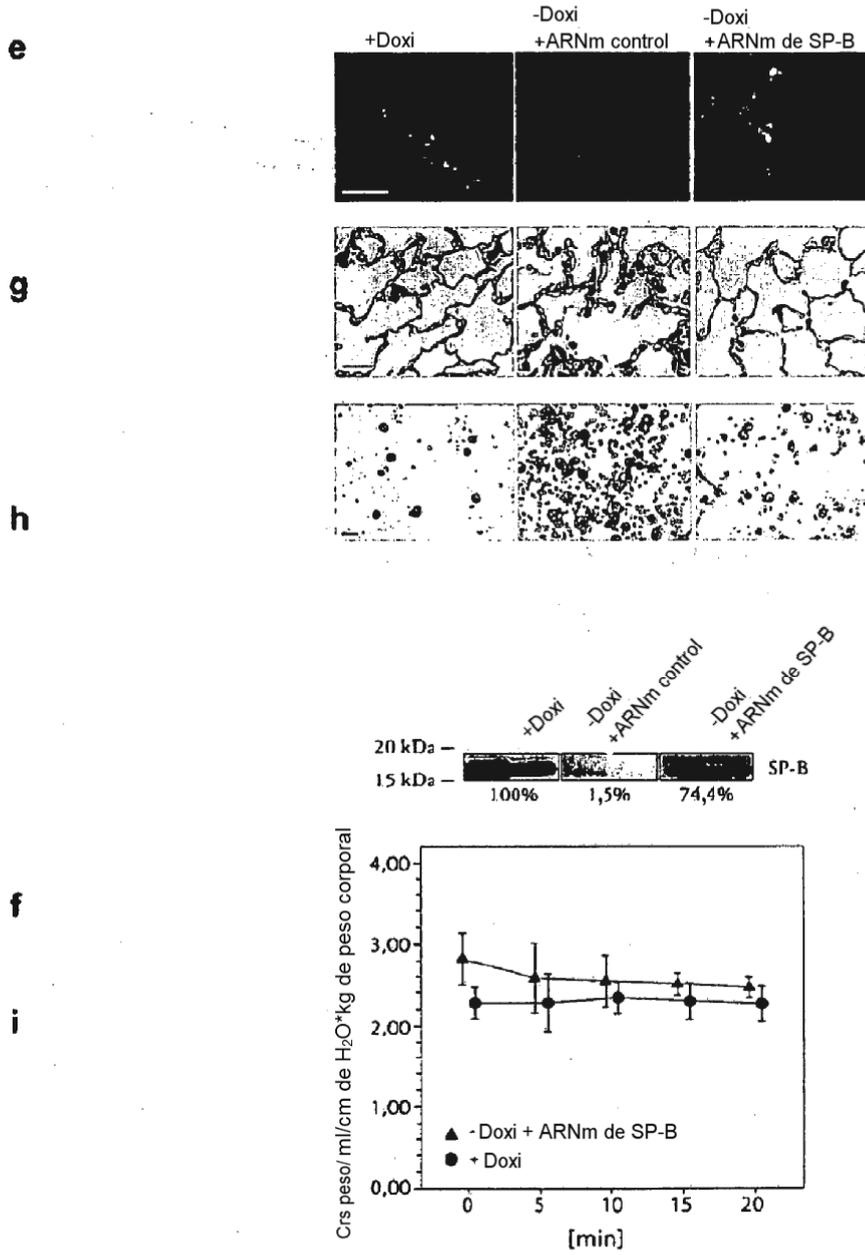
c



d



Figuras 3c y 3d



Figuras 3e, 3f, 3g, 3h y 3i

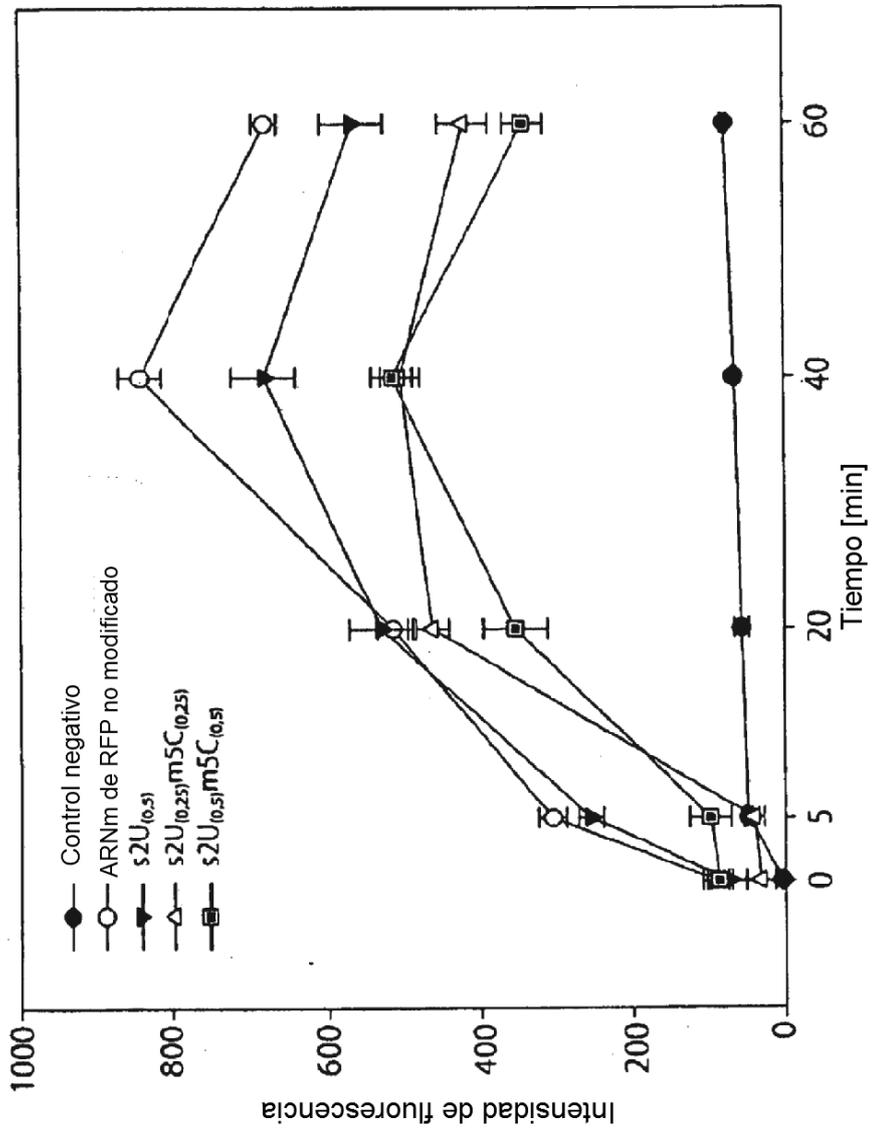


Figura 4

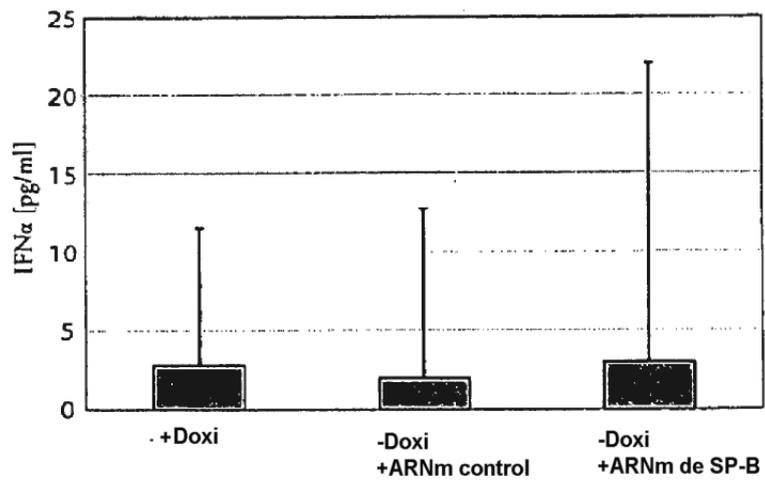
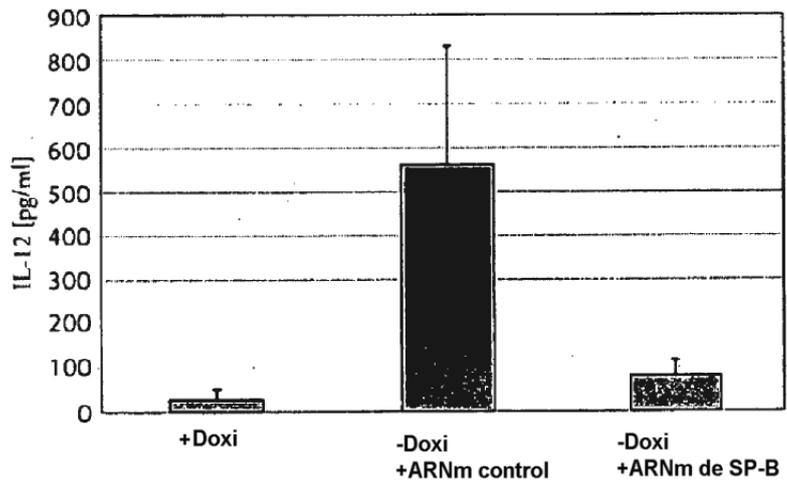
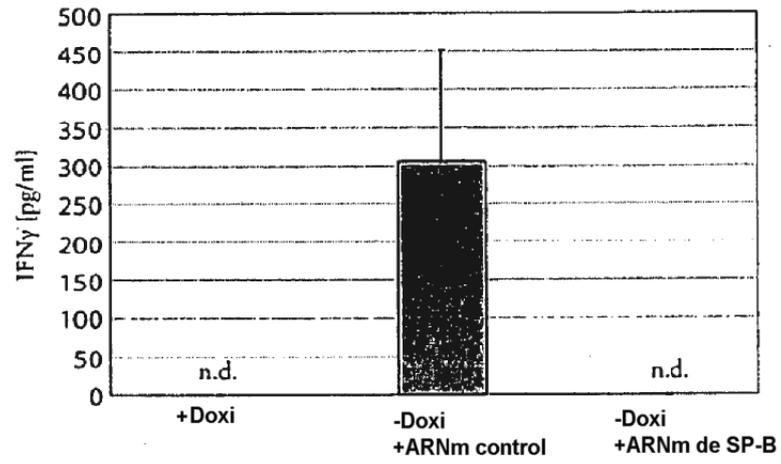


Figura 5

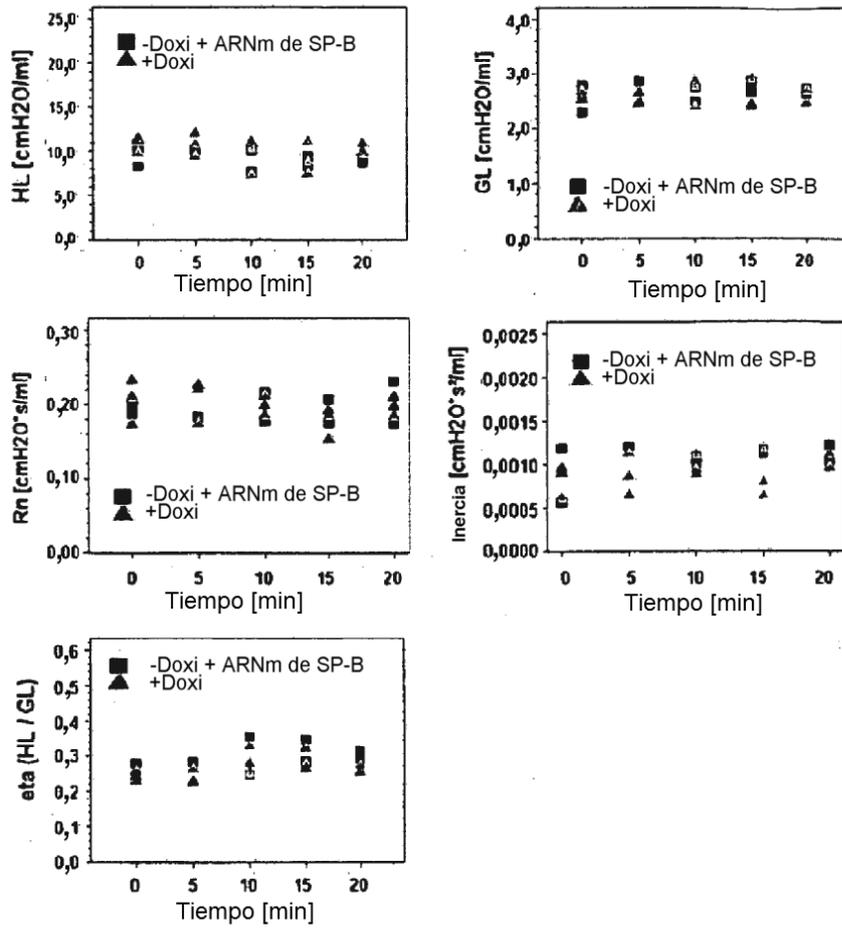


Figura 6

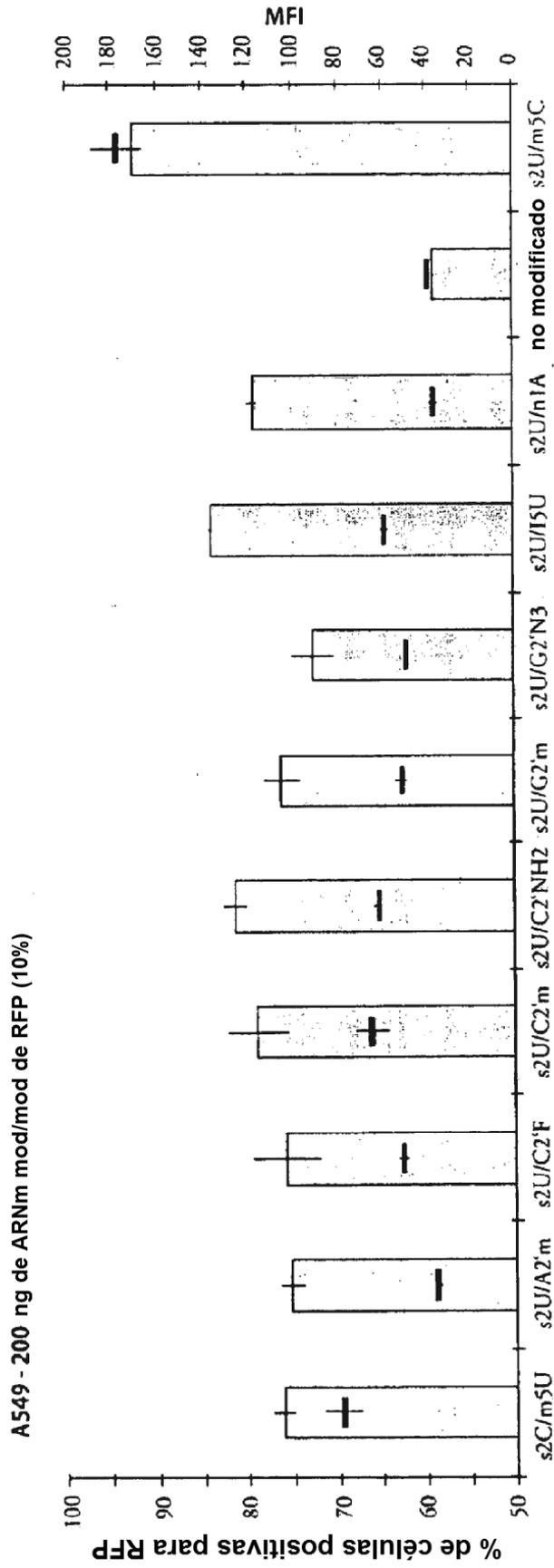


Figura 7

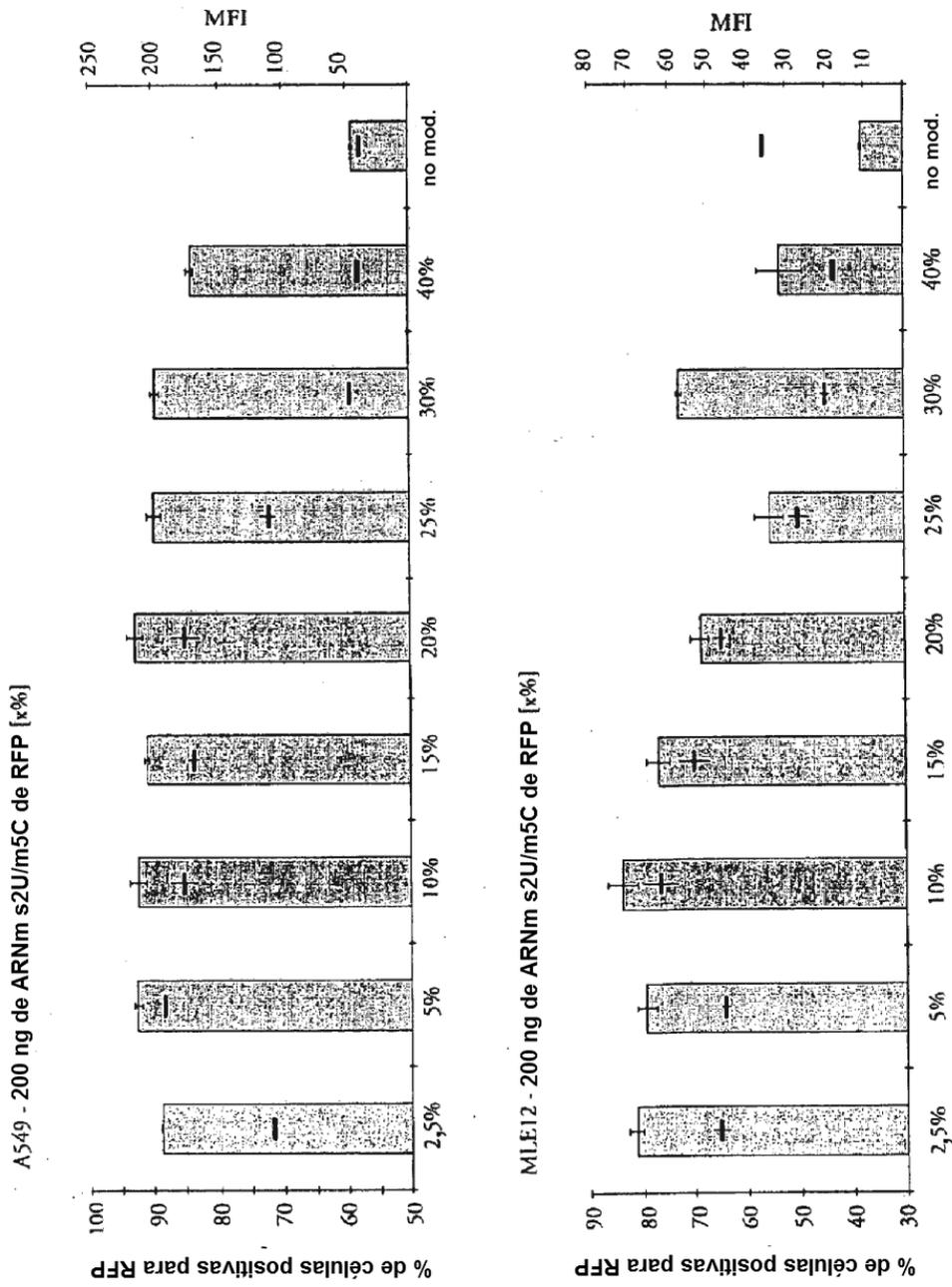


Figura 8

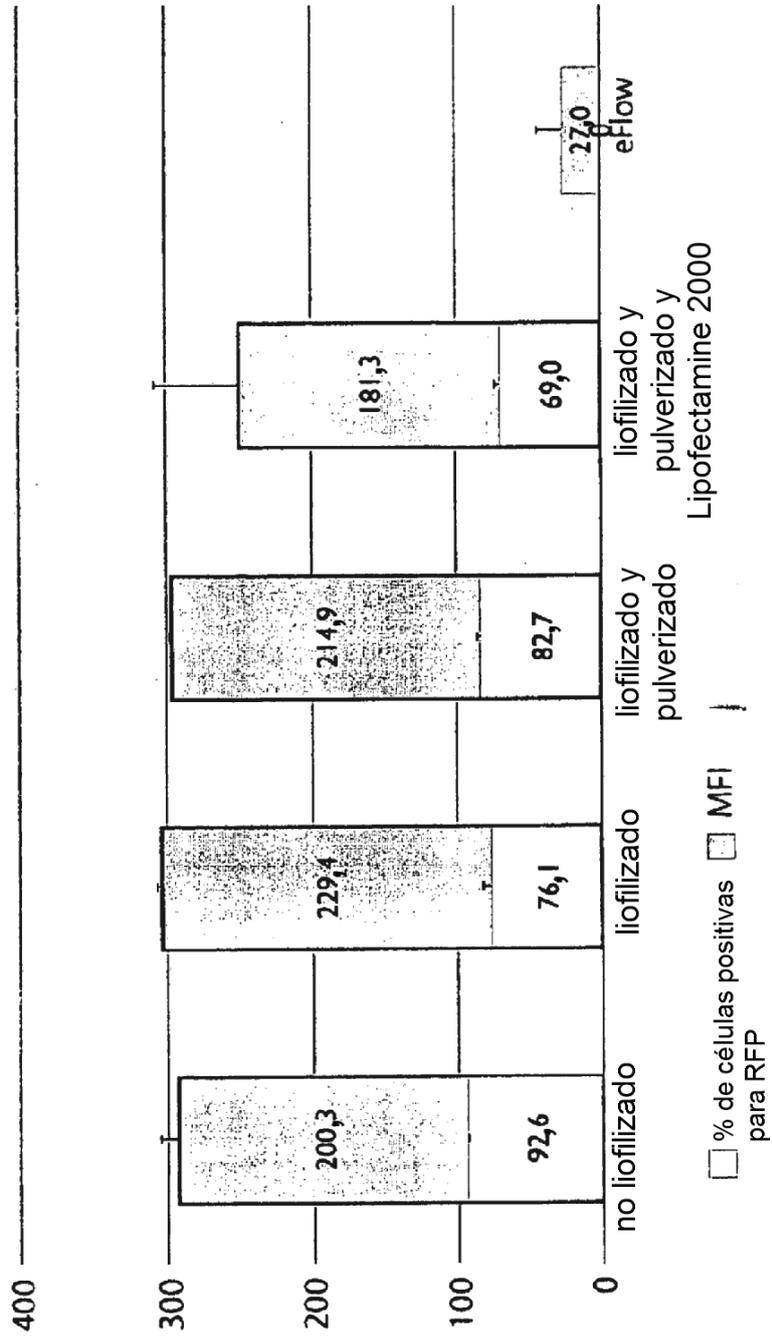


Figura 9

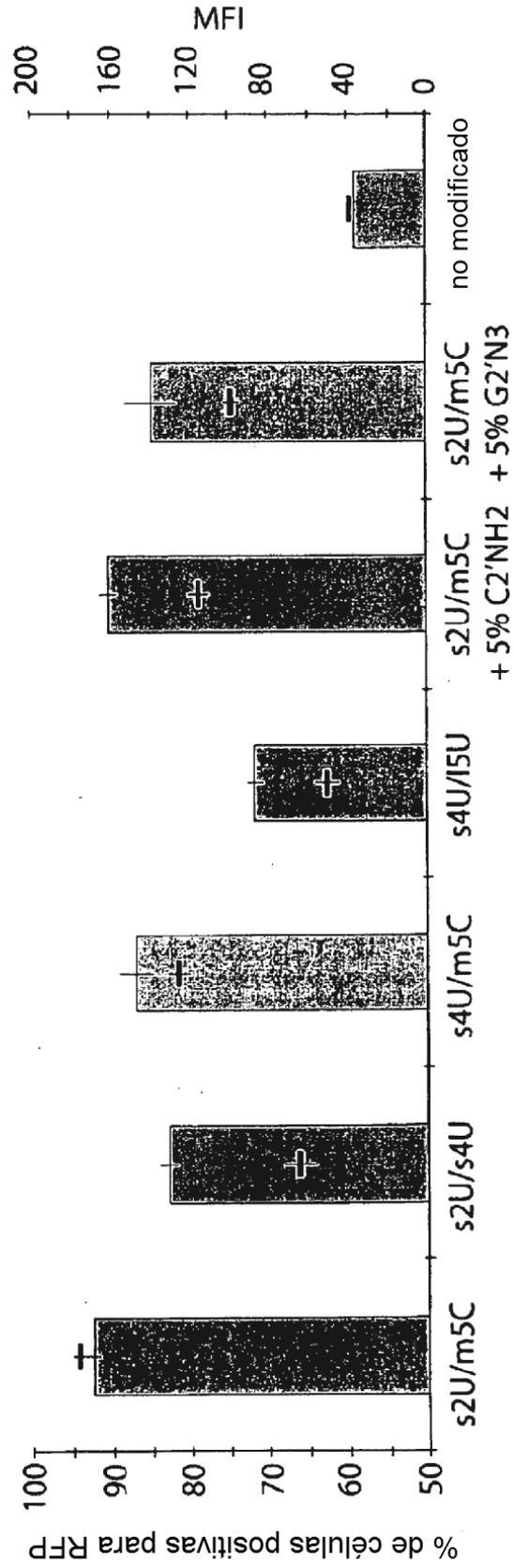


Figura 10a

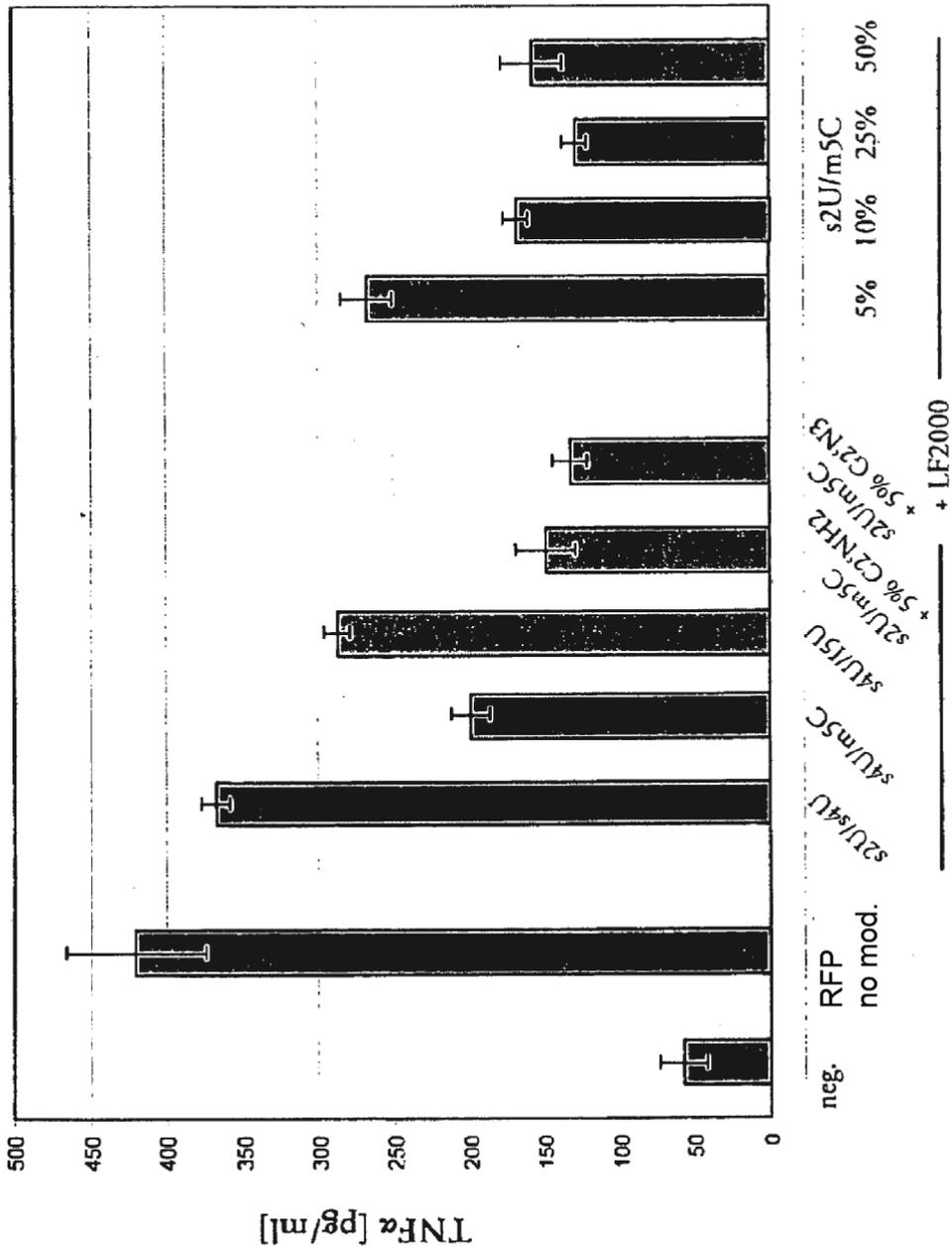
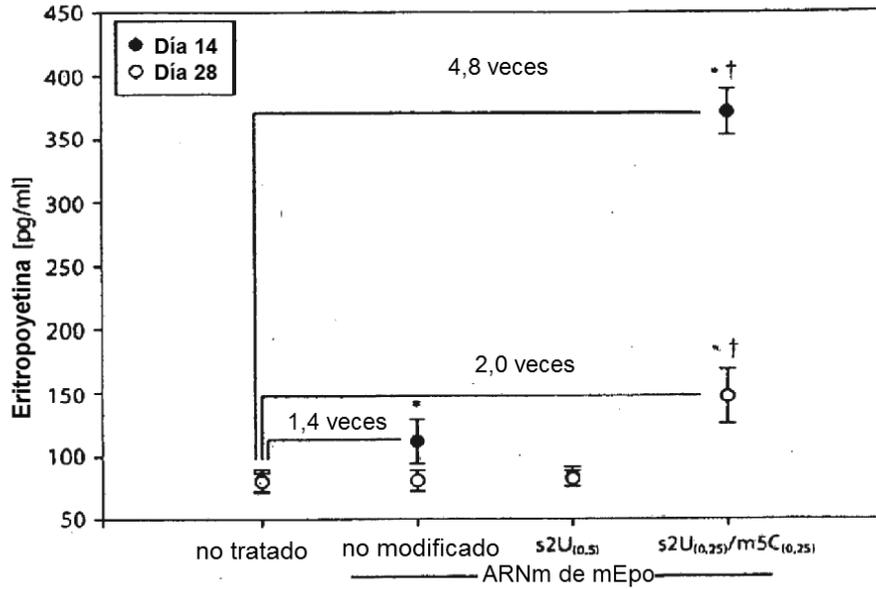
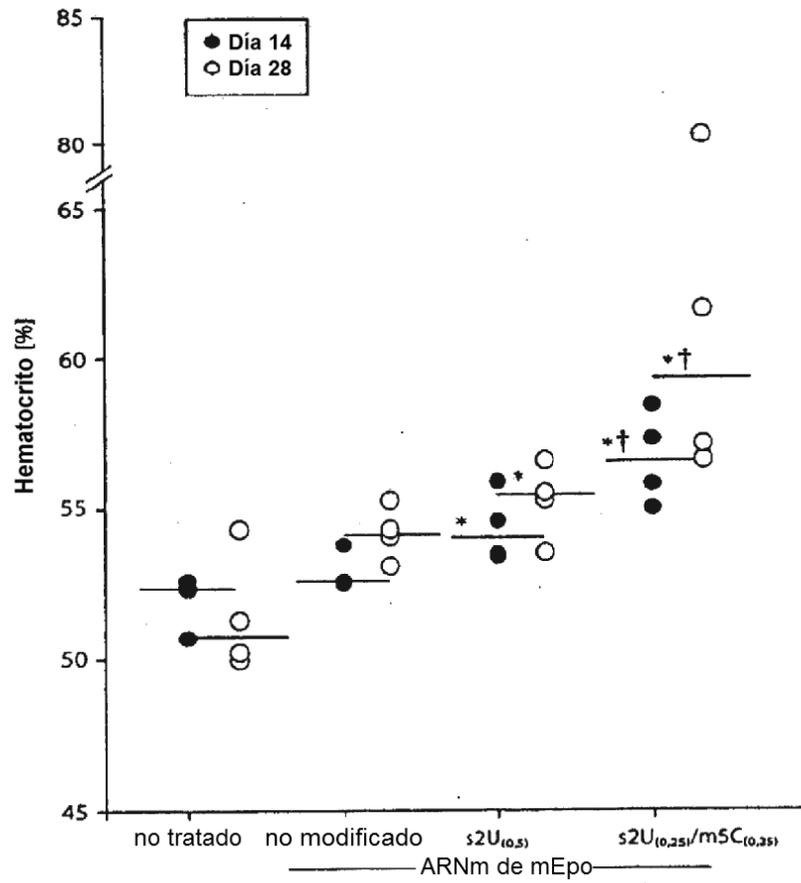


Figure 10b

a



b



Figuras 11a y 11b

c

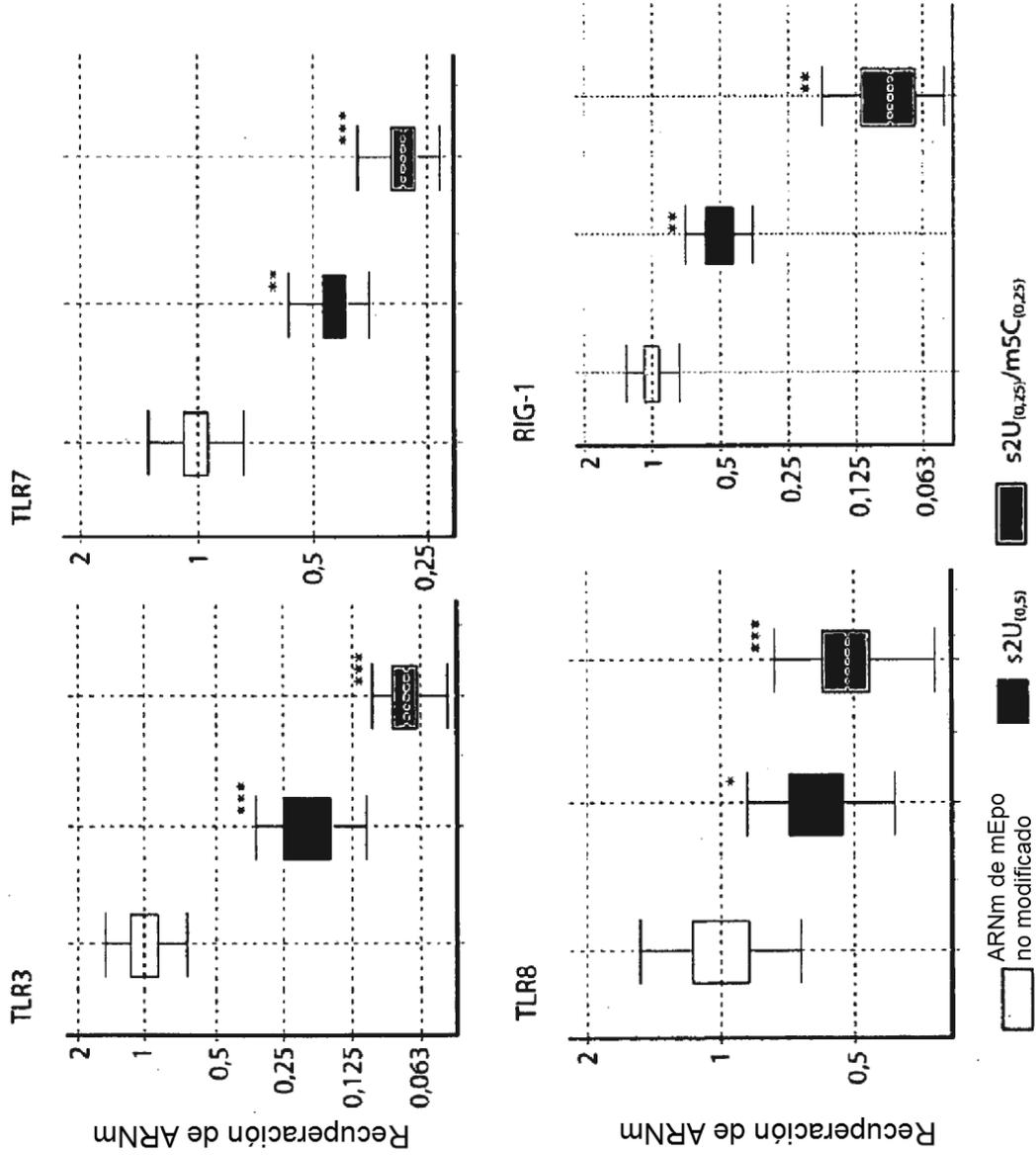


Figura 11c

d

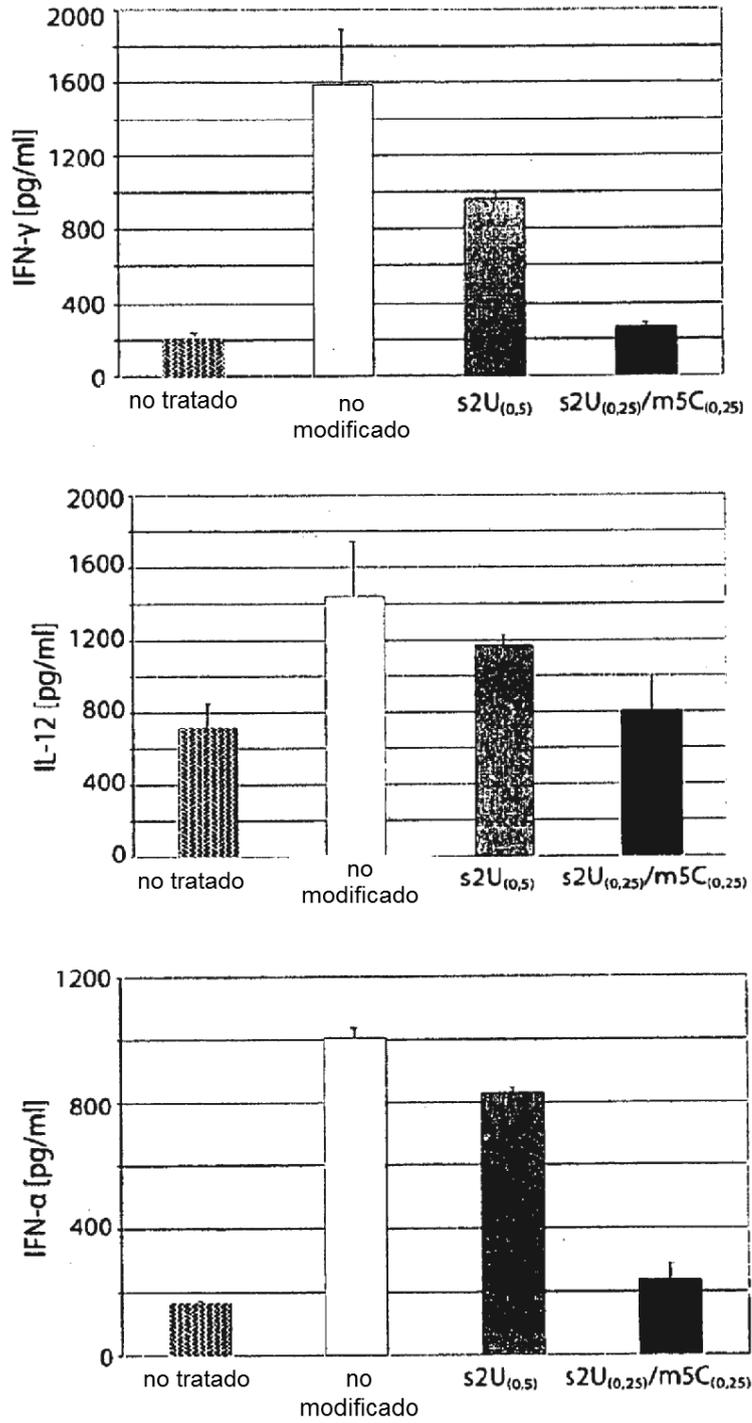


Figura 11d

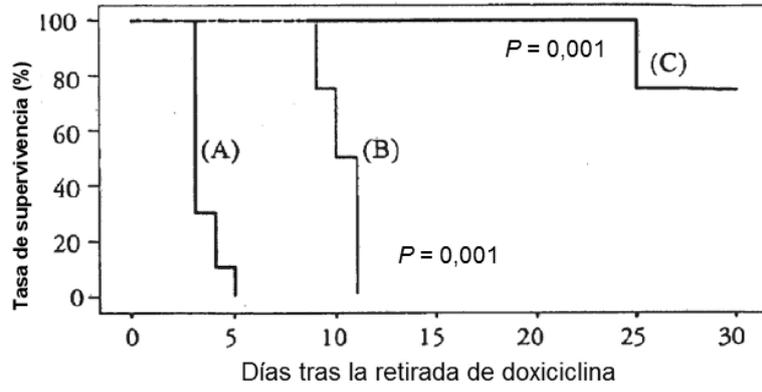


Figura 12

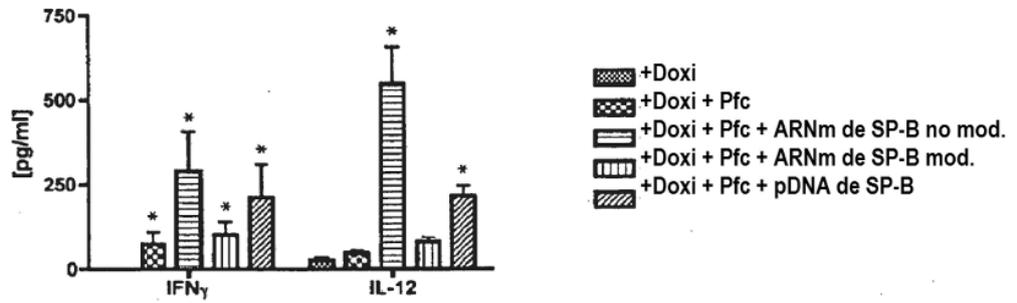


Figura 13

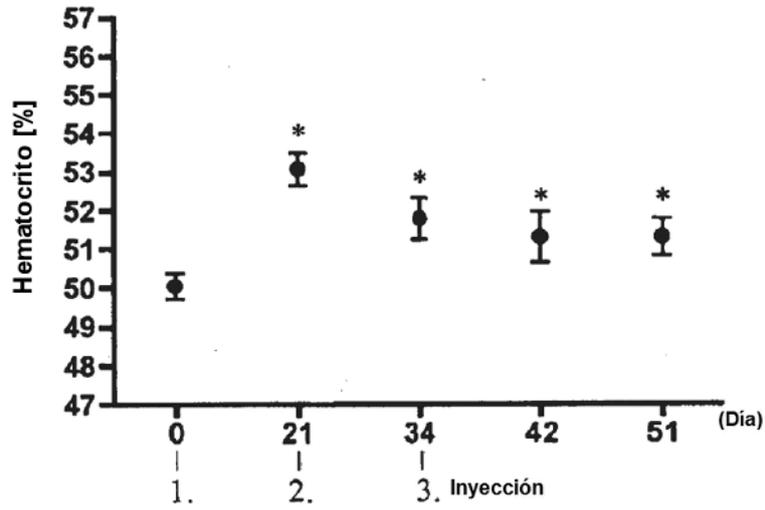


Figura 14

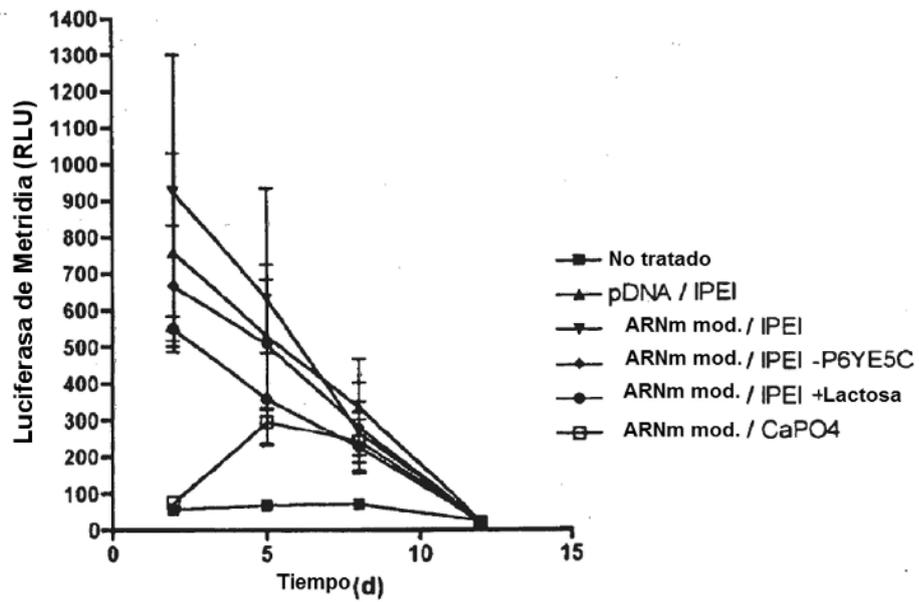


Figura 15

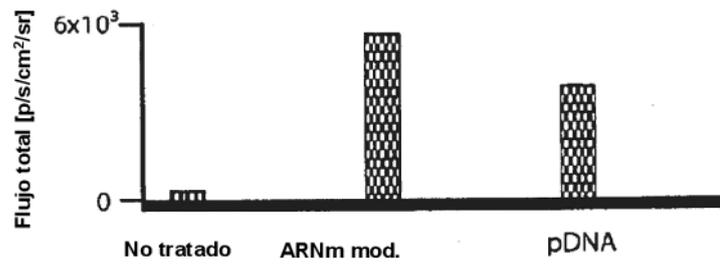


Figura 16.

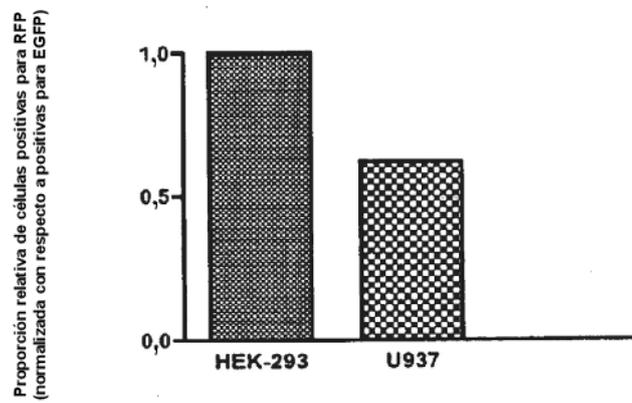


Figura 17a

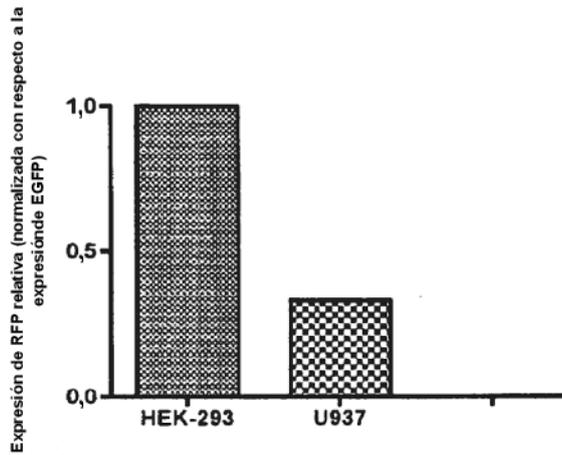


Figura 17b

GGATCCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTG
CGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGA
GGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCG
GCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCAGTACGGCTCCAA
GGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCJTCCC
CGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACITCGAGGACGGCGGGCGTGGTGAC
CGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCTGCTTCATCTACAAGGTGAAGTTC
ATCGGCGTGAACITCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTATGGGC
TGGGAGCCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAG
ATCCACAAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTC AAG
TCCATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACT
CCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAGCAGTACG
AGCGCGCCGAGGGCCGCCACCACCTGTCTCTGTAGCTAGAGTCGACTCCATAAA
GTAGGAAACACTACACGATTCATAAAGTAGGAAACACTACAACCGGTTCCATA
AAGTAGGAAACACTACATCACTCCATAAAGTAGGAAACACTACACAAAAAAA
AA
 AGATATC

Figura 18