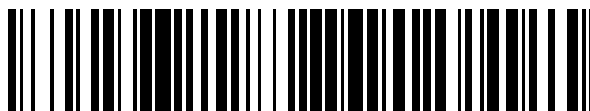


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 531**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/67** (2006.01)

**C12N 15/117** (2010.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2006 E 12008048 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2578685**

54 Título: **ARN que contiene nucleósidos modificados y métodos de uso del mismo**

30 Prioridad:

**23.08.2005 US 710164 P**

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

**19.12.2019**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF  
PENNSYLVANIA (100.0%)  
3160 Chestnut Street, Suite 200  
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**KARIKO, KATALIN y  
WEISSMAN, DREW**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 735 531 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 que contiene nucleósidos modificados y métodos de uso del mismo

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona métodos no terapéuticos para inducir a células de mamíferos a producir proteínas recombinantes, que involucran ARNm sintetizado *in vitro* modificado para contener  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina). La invención también proporciona usos médicos que implican tal ARNm modificado sintetizado *in vitro* en terapia

10 génica.

**Antecedentes de la invención**

15 Todo el ARN de origen natural se sintetiza a partir de cuatro ribonucleótidos básicos ATP, CTP, UTP y GTP, pero algunos de los nucleósidos incorporados se modifican postranscripcionalmente en casi todos los tipos de ARN. Se han identificado casi cien modificaciones con nucleósidos diferentes en el ARN (Rozenski, J, Crain, P, and McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. Nucl Acids Res 27: 196-197). El alcance y la naturaleza de las modificaciones varían y dependen del tipo de ARN, así como del nivel evolutivo del organismo de donde deriva el ARN. El ARN ribosómico, el principal constituyente del ARN celular, contiene significativamente más

20 modificaciones de nucleósidos en células de mamíferos que de bacterias. El ARNr humano, por ejemplo, tiene 10 veces más pseudouridina ( $\Psi$ ) y 25 veces más nucleósidos 2'-O-metilados que el ARNr bacteriano, mientras que el ARNr de la mitocondria tiene muy pocas modificaciones. El ARN de transferencia (ARNt) es el subgrupo de ARN más fuertemente modificado. En el ARNt de mamíferos, hasta el 25% de los nucleósidos están modificados, mientras que el ARNt procariótico contiene significativamente menos modificaciones. El ARN mensajero bacteriano

25 (ARNm) no contiene modificaciones de nucleósidos, mientras que el ARNm de mamíferos contiene nucleósidos modificados tales como 5-metilcitidina ( $m^5C$ ), N6-metiladenosina ( $m^6A$ ), inosina y nucleósidos 2'-O-metilados, además de N7-metilguanosina ( $m^7G$ ), que forma parte de la caperuza 5'-terminal. Sin embargo, no se conoce el papel de las modificaciones de los nucleósidos en el potencial inmunoestimulante y sobre la eficacia de traducción del ARN. K. Heilman et al. describe que la incorporación de 6-metiladenina en el ARN mensajero aumenta la eficacia de traducción *in vitro* (K. Heilman et al., "Internal 6-methyladenine residues increase the *in vitro* translation efficiency of dihydrofolate reductase messenger RNA", International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 1996; 28(7): 823-829).

30

**Sumario de la invención**

35 La materia objeto de la invención es como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un método no terapéutico para inducir a una célula de mamífero a producir una proteína recombinante, comprendiendo el método poner en contacto dicha célula de mamífero con un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende un marco abierto de lectura que codifica dicha proteína recombinante; donde el

40 ARNm sintetizado *in vitro* comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina); donde la cantidad de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a dicho contacto es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta al contacto de dichas células de mamífero con un ARNm homólogo no modificado que no comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina).

45

La invención proporciona además el uso de un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina) en la preparación de un medicamento para inducir a una célula de mamífero a producir una proteína recombinante en terapia génica, donde dicho ARNm sintetizado *in vitro* comprende un marco abierto de

50 lectura que codifica dicha proteína recombinante; donde dicha terapia génica comprende la administración repetida de dicho ARNm sintetizado *in vitro* a un sujeto; donde la cantidad de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de dicho ARNm sintetizado *in vitro* es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1  $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de un ARNm homólogo no modificado que no comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina).

55

La invención proporciona además un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina) para su uso en un método de terapia génica, donde dicha terapia génica comprende la administración repetida de dicho ARNm sintetizado *in vitro* a un sujeto; donde la cantidad de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de dicho ARNm sintetizado *in vitro* es menor que la cantidad

60 respectiva de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de un ARNm homólogo no modificado que no comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina).

La presente solicitud divulga un ARN mensajero que comprende un resto de pseudouridina.

65 La presente solicitud divulga una molécula de ARN que codifica una proteína de interés, comprendiendo, dicha molécula de ARN, un resto de pseudouridina.

La presente solicitud divulga una molécula de ARN transcrita *in vitro*, que comprende un pseudouridina o un nucleósido modificado.

La presente solicitud divulga un oligorribonucleótido sintetizado *in vitro*, que comprende un pseudouridina o un nucleósido modificado, donde el nucleósido modificado es m<sup>5</sup>C, m<sup>5</sup>U, m<sup>6</sup>A, s<sup>2</sup>U, Ψ o 2'-O-metil-U.

La presente solicitud divulga un vector de terapia génica, que comprende una molécula de polirribonucleótido sintetizada *in vitro*, donde la molécula de polirribonucleótido comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado.

La presente solicitud divulga una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) que contiene, como parte de su secuencia, una pseudouridina o un nucleósido modificado y que además comprende un ARNip o ARNhc. En otra divulgación, la molécula de ARNbc tiene una longitud superior a 50 nucleótidos. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

La presente solicitud divulga un método para tratar anemia en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, eritropoyetina, tratando, de este modo, la anemia en un sujeto.

La presente solicitud divulga un método para tratar un vasoespasma en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), tratando, de este modo, un vasoespasma en un sujeto.

La presente solicitud divulga un método para mejorar una tasa de supervivencia de una célula en un sujeto, que comprende poner en contacto la célula con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, una proteína de choque térmico, mejorando, de este modo, una tasa de supervivencia de una célula en un sujeto.

La presente solicitud divulga un método para disminuir una incidencia de una reestenosis de un vaso sanguíneo después de un procedimiento que ensancha el vaso sanguíneo, que comprende poner en contacto una célula del vaso sanguíneo con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, una proteína de choque térmico, disminuyendo, de este modo, una incidencia de reestenosis en un sujeto.

La presente solicitud divulga un método para aumentar el crecimiento de pelo a partir de un folículo piloso en el cuero cabelludo de un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del cuero cabelludo con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, una telomerasa o una proteína inmunosupresora, aumentando, de este modo, un crecimiento de pelo a partir de un folículo piloso.

La presente solicitud divulga un método para inducir la expresión de una enzima con actividad antioxidante en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la enzima, induciendo, de este modo, la expresión de una enzima con actividad antioxidante en una célula.

La presente solicitud divulga un método para tratar fibrosis quística en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, el Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística (CFTR), tratando, de este modo, la fibrosis quística en un sujeto.

La presente solicitud divulga un método para tratar una agammaglobulinemia ligada a X en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, una tirosina quinasa de Bruton, tratando, de este modo, una agammaglobulinemia ligada a X.

La presente solicitud divulga un método para tratar una inmunodeficiencia combinada grave por déficit de adenosina desaminasa (ADA SCID) en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, un ADA, tratando, de este modo, una ADA SCID.

La presente solicitud divulga un método para producir una proteína recombinante, que comprende poner en contacto un aparato de traducción *in vitro* con un polirribonucleótido sintetizado *in vitro*, comprendiendo, el polirribonucleótido sintetizado *in vitro*, una pseudouridina o un nucleósido modificado, produciendo, de este modo, una proteína recombinante.

La presente solicitud divulga un método para sintetizar una molécula de ARN transcrita *in vitro* que comprende un nucleótido modificado con un nucleósido modificado con pseudouridina, que comprende poner en contacto una polimerasa aislada con una mezcla de nucleótidos no modificados y el nucleótido modificado.

La presente solicitud divulga un aparato de transcripción *in vitro*, que comprende: un nucleótido no modificado, un nucleótido que contiene una pseudouridina o un nucleósido modificado y una polimerasa. En el presente documento se describe un kit de transcripción *in vitro*, que comprende: un nucleótido no modificado, un nucleótido que contiene una pseudouridina o un nucleósido modificado y una polimerasa.

5

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Producción de TNF- $\alpha$  por MDDC (por su siglas en inglés) transfectadas con ARN natural, demostrando que el ARN sintetizado *in vitro* no modificado y el ARN bacteriano y mitocondrial es altamente inmunogénico, mientras que otro ARN de mamíferos es débilmente inmunógeno. Las MDDC humanas se incubaron con Lipofectin® solo o complejo con R-848 (1  $\mu$ g/ml) o ARN (5  $\mu$ g/ml) de células 293 (ARN total, nuclear y citoplasmático), corazón de ratón (poliA + ARNm), ARN mitocondrial de plaquetas humano, ARNt bovino, ARNt bacteriano y ARN total (*E. coli*) con o sin digestión con RNasa. Después de 8 horas, se midió TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes por ELISA. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM (por sus siglas en inglés). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 2. La activación dependiente de TLR por ARN demuestra que la modificación de m<sup>6</sup>A y s<sup>2</sup>U bloquea la señalización de TLR3, mientras que todas las modificaciones bloquean la señalización de TLR7 y TLR8 y que el ARN bacteriano menos modificado y el ARN transcrito *in vitro* no modificado activan los tres TLR. (A) Se analizaron alícuotas (1  $\mu$ g) de ARN-1571 transcrito *in vitro* sin (ninguna) o con modificaciones de nucleósidos m<sup>5</sup>C, m<sup>6</sup>A,  $\Psi$ , m<sup>5</sup>U o s<sup>2</sup>U sobre un gel de agarosa desnaturalizante seguido de tinción con bromuro de etidio e iluminación UV. (B) Las células 293 que expresan TLR3, TLR7, TLR8 humanos y los vectores de control se trataron con Lipofectin® solo, Lipofectin®-R-848 (1  $\mu$ g/ml) o ARN (5  $\mu$ g/ml). Se observan los nucleósidos modificados presentes en el ARN-730 y ARN-1571. Se usaron células 293-ELAM-luc como células control. (C) Se obtuvieron CpG ODN-2006 (5  $\mu$ g/ml), LPS (1,0  $\mu$ g/ml) y ARN aislados de hígado de rata, de línea celular de ratón (TUBO) y bazo humano (total), de ARN mitocondrial de plaquetas humano o de dos fuentes diferentes de *E. coli*. Las células 293-hTLR9 sirvieron como control. Después de 8 horas, se midió IL-8 en los sobrenadantes por ELISA. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM (por sus siglas en inglés). Las líneas celulares que contienen ARNip dirigido a hTLR3 se indican con un asterisco. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

Figura 3. La producción de citocinas por CD transfectadas con ARN demuestra que todas las modificaciones bloquean la activación de citocinas generadas por CD, mientras que solo las modificaciones de la uridina bloquean la activación de las CD derivadas de la sangre. Las MDDC generadas con GM-CSF/IL-4 (A, C) o MDDC GM-CSF/IFN- $\alpha$  (B) y las CD1 y CD2 primarias (D) se trataron durante 8 a 16 h con Lipofectin® solo, Lipofectin®-R-848 (1  $\mu$ g/ml) o ARN (5  $\mu$ g/ml). Se observan los nucleósidos modificados presentes en el ARN-1571. TNF- $\alpha$ , IL-12 (p70) e IFN- $\alpha$  se midieron en el sobrenadante por ELISA. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM (por sus siglas en inglés). Los resultados son representativos de 10 (A y C), 4 (B) y 6 (D) experimentos independientes. E. Activación de CD por ARN. Las MDDC se trataron durante 20 h con Lipofectin® solo o complejo con 1  $\mu$ g/ml de poli(I):(C) o R-848 como controles positivos (panel superior) o Lipofectin® complejo con el ARN indicado (5  $\mu$ g/ml; panel inferior). Se observan los nucleósidos modificados presentes en el ARN-1886. se midió TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes por ELISA. La expresión de CD83, CD80 y HLA-DR se determinó mediante citometría de flujo.

Figura 4. La activación de CD por ARN demuestra que todas las modificaciones inhiben la activación de CD. Las MDDC se trataron durante 20 h con Lipofectin® solo, Lipofectin®-R-848 (1  $\mu$ g/ml) o ARN-1571, modificado como se indica (5  $\mu$ g/ml). (A) Tinción de CD83 y HLA-DR. (B) Niveles de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes y fluorescencia media de CD80 y CD86 en respuesta a la incubación con ARN. El volumen de medio se incrementó 30 veces para la citometría de flujo, como se indica por el asterisco. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes.

Figura 5. Se transcribió ARN-1571 protegido con caperuza que contenía diferentes cantidades (0, 1, 10, 50, 90, 99 y 100% de nucleósido modificado, en relación con el correspondiente NTP no modificado) y se encontró que la modificación de solo unos pocos nucleósidos daba lugar a una inhibición de la activación de la CD. A. Todos los transcritos se digirieron a monofosfatos y se analizaron mediante HPLC de fase inversa para determinar la cantidad relativa de incorporación de nucleósidos modificados. Se muestran los perfiles de absorbancia representativos obtenidos en las proporciones ( $\Psi$ :U) indicadas. Se observan tiempos de elución para los 3'-monofosfatos de pseudouridina ( $\Psi$ ), citidina (C), guanosina (G), uridina (U), 7-metilguanosina ("m7G") y adenosina ("A"). (B) Contenido de nucleósidos modificados de ARN-1571. El porcentaje esperado de m<sup>6</sup>A,  $\Psi$  o m<sup>5</sup>C en el ARN-1571 se calculó basándose en la cantidad relativa de NTP modificado en la reacción de transcripción y la composición de nucleósidos del ARN-1571 (A: 505, U: 451, C: 273, G: 342). Los valores para el contenido de nucleósidos modificados medido se determinaron basándose en la cuantificación de los cromatogramas de HPLC. Notas: A: valores (%) para m<sup>6</sup>ATP,  $\Psi$ TP y m<sup>5</sup>CTP en relación con ATP UTP y CTP, respectivamente. B: valores (%) para m<sup>6</sup>A,  $\Psi$  y m<sup>5</sup>C monofosfatos en relación con todos los NMP. (C) Las MDDC se transfectaron con ARN-1571 protegido con caperuza complejo con Lipofectin® (5  $\mu$ g/ml) que contenía la cantidad indicada de m<sup>6</sup>A,  $\Psi$  o m<sup>5</sup>C. Después de 8 horas, se midió TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes. Datos expresados como inhibición relativa de TNF- $\alpha$ . Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM obtenidos en 3 experimentos independientes.

Figura 6. La expresión de TNF- $\alpha$  por CD transfectadas con oligorribonucleótidos demuestra que tan solo un nucleósido modificado reduce la activación de CD. (A) Se muestran las secuencias de oligorribonucleótidos (ORN) sintetizados químicamente (ORN1-4) o transcritos *in vitro* (ORN5-6). Se resaltan las posiciones de los nucleósidos modificados Um (2'-O-metiluridina), m<sup>5</sup>C y  $\Psi$ . Las MDDC humanas se transfectaron con Lipofectin® solo (medio), R-848 (1  $\mu$ g/ml) o Lipofectin® complejo con ARN (5  $\mu$ g/ml). Donde se indicó las células se trataron con 2,5  $\mu$ g/ml de cicloheximida (CHX). (B). Después de 8 horas de incubación, se midió TNF- $\alpha$  en el sobrenadante. (C) El ARN de las células se analizó mediante transferencia Northern. Se muestran los valores medios  $\pm$  SEM representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 7. A. El ARNm $\Psi$  no estimula la producción de citocinas proinflamatorias *in vivo*. Las muestras de suero (6 h después de la inyección) se analizaron mediante ELISA y revelaron que 3  $\mu$ g de ARNm no modificado indujeron un nivel más alto de IFN- $\alpha$  que 3  $\mu$ g de ARNm modificado con  $\Psi$  ( $P < 0,001$ ). Los niveles de IFN- $\alpha$  inducidos por 3  $\mu$ g de ARNm modificado con  $\Psi$  fueron similares a los obtenidos cuando a los animales se les inyectó lipofectin sin complejar. Los valores se expresan como la media  $\pm$  s.e.m. ( $n = 3$  o 5 animales/grupo). B. Se observaron resultados similares con TNF- $\alpha$ .

Figura 8. El ARNm que contiene pseudouridina ( $\Psi$ ) no activa la PKR.  $\Psi$ : pseudouridina. Control: ARN no modificado. m<sup>5</sup>C: ARNm con modificación m<sup>5</sup>C.

Figura 9. Expresión aumentada de luciferasa a partir de ARNm que contiene pseudouridina en lisado de reticulocitos de conejo. LucY: ARNm con modificación con pseudouridina; luc-C: ARN no modificado. Los datos se expresan mediante la normalización de la actividad luciferasa al ARN de luciferasa no modificado.

Figura 10. Expresión aumentada de renilla a partir de ARNm que contiene pseudouridina en células cultivadas. A. células 293. B. Células dendríticas de ratón derivadas de la médula ósea, primarias murinas. renilla-Y: ARNm con modificación con pseudouridina; renilla-C: ARN no modificado. El ARN se modificó con m<sup>5</sup>C, m<sup>6</sup>A y m<sup>5</sup>U como se indica.

Figura 11. A. Efecto aditivo de los elementos 3' y 5' en la eficacia de traducción del ARNm $\Psi$ . Se transfectaron células 293 con luciferasa de luciérnaga convencional y ARNm $\Psi$  que tenían tanto caperuza 5' (capLuc), como cola de poliA 3' de 50 nt de longitud (TEVlucA50) o ninguno de estos elementos (capTEVlucA50 y Luc, respectivamente). Las células se lisaron 4 h más tarde y las actividades de luciferasa se midieron en alícuotas (1/20<sup>o</sup>) del total de los lisados. B. El ARNm $\Psi$  es más estable que el ARNm no modificado. Las células 293 transfectadas con capTEVlucAn que contenían nucleósidos no modificados o modificados con  $\Psi$  se lisaron en los momentos indicados después de la transfección. Se analizaron alícuotas (1/20<sup>o</sup>) de los lisados para luciferasa. Los errores estándar son demasiado pequeños para visualizarse con barras de error. C. La expresión de  $\beta$ -galactosidasa se potencia usando ARNm $\Psi$  en comparación con ARNm convencional. Se transfectaron células 293 sembradas en placas de 96 pocillos con ARNm complejados con lipofectin (0,25  $\mu$ g/pocillo) que codifican la  $\beta$ -galactosidasa bacteriana (lacZ). Los transcritos tenían una caperuza y una cola poliA 3' que tenían una longitud de 30 nt (caplacZ) o de 200 nt (caplacZ-An). Se probaron construcciones hechas usando nucleósidos U convencionales o  $\Psi$ . Las células se fijaron y se tiñeron con X-gal, 24 h después de la transfección. Las imágenes se tomaron mediante microscopía invertida (aumentos de 40 y 100X) de pocillos representativos.

Figura 12. A. Expresión de renilla después de la inyección intracerebral de ARNm codificante modificado o no modificado. La corteza cerebral de rata se inyectó en 8 sitios/animal. Un hemisferio se inyectó con ARN codificante de renilla protegido con caperuza con modificación con pseudouridina (capRenilla-Y), mientras que el hemisferio correspondiente con ARN protegido con caperuza sin modificación de nucleósidos (capRenilla-C). Se muestran datos de 2 animales (6 sitios de inyección). FONDO; menor nivel de detección del análisis. B. El ARNm $\Psi$  intravenoso se expresa en el bazo. Se administró un ARNm $\Psi$  complejo con lipofectin (0,3  $\mu$ g de capTEVlucAn/ratón) mediante inyección en la vena de la cola. Los animales se sacrificaron a las 2 y 4 h después de la inyección y se midieron las actividades de luciferasa en alícuotas (1/10<sup>o</sup>) de órganos homogeneizados en tampón de lisis. Los valores representan actividades de luciferasa en todos los órganos. Expresión de renilla después de la inyección i.v. de ARNm en la vena de la cola de ratones. Los datos de dos experimentos realizados de forma independiente se muestran en los paneles izquierdo y derecho. Se recogieron y homogeneizaron los bazos y se midió la actividad de renilla en alícuotas de los lisados. C. El ARNm $\Psi$  muestra mayor estabilidad y traducción *in vivo*. Se suministró por vía intra venosa CapTEVlucAn complejo con lipofectin (0,3  $\mu$ g/60  $\mu$ l/animal) con o sin modificaciones con  $\Psi$  a los ratones. Los animales se sacrificaron 1, 4 y 24 h después de la inyección y la 1/2 de sus bazos se procesaron para medir la enzima luciferasa (panel izquierdo) y la otra mitad para análisis de ARN (panel derecho). Las actividades de la luciferasa se midieron en alícuotas (1/5<sup>o</sup>) del homogeneizado hecho de la mitad de los bazos. Los valores representados gráficamente representan actividades de luciferasa en todo el bazo y se expresan como la media  $\pm$  s.e.m. ( $n = 3$  o 4 /punto). D. Expresión de luciferasa de luciérnaga después de la inyección intratraqueal de ARNm. capTEVluc-Y: ARN modificado con pseudouridina que codifica luciferasa de luciérnaga, protegido con caperuza. CapTEVluc-C: ARN protegido con caperuza sin modificación de nucleósidos.

Figura 13. La producción de proteínas depende de la cantidad de ARNm suministrado por vía intravenosa en ratones. Se suministraron por vía intravenosa las cantidades indicadas de ácidos nucleicos complejados con

lipofectin, ARNm capTEVlucAn con o sin constituyentes  $\Psi$  y ADN plasmídico pCMVluc en un volumen de 60  $\mu$ l/animal en ratones. Los animales inyectados con ARNm o ADN plasmídico se sacrificaron 6 h o 24 h después de la inyección, respectivamente, y las actividades de luciferasa se midieron en alícuotas (1/10<sup>o</sup>) de sus bazo

Figura 14. Expresión de luciferasa de luciérnaga después del suministro intratraqueal de ARNm codificante. El ARNm se complejó con lipofectin (o PEI, como se indica) y los animales se inyectaron con 0,3  $\mu$ g de ARNm codificante de luciferasa de luciérnaga con o sin modificación con  $\Psi$ , a continuación, se sacrificaron 3 horas más tarde. Se recogieron y homogeneizaron los pulmones y se midió la actividad de luciferasa en alícuotas de los órganos lisados.

Figura 15. El ARNm $\Psi$  no induce mediadores inflamatorios después del suministro pulmonar. Inducción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  en suero después del suministro intratraqueal de ARNm $\Psi$  o ARNm codificante de luciferasa. Los niveles séricos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  se determinaron mediante ELISA 24 horas después del suministro del ARNm.

### Descripción detallada

La presente invención proporciona un método no terapéutico para inducir a una célula de mamífero a producir una proteína recombinante, comprendiendo el método poner en contacto dicha célula de mamífero con un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende un marco abierto de lectura que codifica dicha proteína recombinante; donde el ARNm sintetizado *in vitro* comprende  $\Psi$  o m<sup>1</sup> $\Psi$  (1-metilpseudouridina); donde la cantidad de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a dicho contacto es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta al contacto de dichas células de mamífero con un ARNm homólogo no modificado que no comprende  $\Psi$  o m<sup>1</sup> $\Psi$  (1-metilpseudouridina).

La presente invención proporciona además el uso de un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende  $\Psi$  o m<sup>1</sup> $\Psi$  (1-metilpseudouridina) en la preparación de un medicamento para inducir a una célula de mamífero a producir una proteína recombinante en terapia génica, donde dicho ARNm sintetizado *in vitro* comprende un marco abierto de lectura que codifica dicha proteína recombinante; donde dicha terapia génica comprende la administración repetida de dicho ARNm sintetizado *in vitro* a un sujeto; donde la cantidad de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de dicho ARNm sintetizado *in vitro* es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de un ARNm homólogo no modificado que no comprende  $\Psi$  o m<sup>1</sup> $\Psi$  (1-metilpseudouridina).

La invención proporciona además un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende  $\Psi$  o m<sup>1</sup> $\Psi$  (1-metilpseudouridina) para su uso en un método de terapia génica, donde dicha terapia génica comprende la administración repetida de dicho ARNm sintetizado *in vitro* a un sujeto; donde la cantidad de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de dicho ARNm sintetizado *in vitro* es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de un ARNm homólogo no modificado que no comprende  $\Psi$  o m<sup>1</sup> $\Psi$  (1-metilpseudouridina).

La presente solicitud divulga una molécula de ARN transcrita *in vitro*, que comprende una pseudouridina.

La presente solicitud divulga una molécula de ARN transcrita *in vitro*, que comprende un nucleósido modificado.

La presente solicitud divulga métodos para sintetizar moléculas de ARN transcritas *in vitro*, que comprenden pseudouridina y/o nucleósidos modificados.

La presente solicitud divulga una molécula de ARN mensajero que comprende un resto de pseudouridina

En una realización, una molécula de ARNm transcrita *in vitro* de métodos y composiciones de la presente invención se sintetiza mediante la ARN polimerasa del fago T7. En otra realización, la molécula se sintetiza por la ARN polimerasa del fago SP6. En otra realización, la molécula se sintetiza por la ARN polimerasa del fago T3. En otra realización, la molécula se sintetiza por una polimerasa seleccionada de las polimerasas anteriores.

En otra realización, la molécula de ARNm transcrita *in vitro* del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención es un oligorribonucleótido. En otra realización, la molécula de ARN transcrita *in vitro* es un polirribonucleótido. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

La presente solicitud divulga un oligorribonucleótido sintetizado *in vitro*, que comprende un pseudouridina o un nucleósido modificado, donde el nucleósido modificado es m<sup>5</sup>C, m<sup>5</sup>U, m<sup>6</sup>A, s<sup>2</sup>U,  $\Psi$  o 2'-O-metil-U.

La presente solicitud divulga un polirribonucleótido sintetizado *in vitro*, que comprende un pseudouridina o un

nucleósido modificado, donde el nucleósido modificado es m<sup>5</sup>C, m<sup>5</sup>U, m<sup>6</sup>A, s<sup>2</sup>U, Ψ o 2'-O-metil-U.

En otra divulgación, el oligorribonucleótido o polirribonucleótido sintetizado *in vitro* es un ARN(hc) de horquilla corta. En otra divulgación, el oligorribonucleótido sintetizado *in vitro* es un ARN de interferencia pequeño (ARNip). En otra divulgación, el oligorribonucleótido sintetizado *in vitro* es cualquier otro tipo de oligorribonucleótido conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

El ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención de los métodos y usos de la presente invención comprende un marco abierto de lectura que codifica una proteína funcional. En otra divulgación, la molécula de ARN o la molécula de oligorribonucleótido funciona sin codificar una proteína funcional (por ejemplo, en el silenciamiento transcripcional), como una RNzima, etc. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

En una realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención comprende además una cola de poli-A. En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención no comprende una cola de poli-A. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención comprende además una caperuza m<sup>7</sup>GpppG. En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención no comprende una caperuza m<sup>7</sup>GpppG. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención comprende además un potenciador traduccional independiente de caperuza. En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención no comprende un potenciador traduccional independiente de caperuza. En otra realización, el potenciador traduccional independiente de caperuza es un potenciador traduccional independiente de caperuza del virus del grabado del tabaco (TEV). En otra realización, el potenciador traduccional independiente de caperuza es cualquier otro potenciador traduccional independiente de caperuza conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un vector de terapia génica, que comprende una molécula de polirribonucleótido sintetizada *in vitro*, donde la molécula de polirribonucleótido comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado.

La molécula de ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención es un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende m<sup>1</sup>Ψ (1-metilpseudouridina) o un resto de pseudouridina que no se modifica adicionalmente (es decir, Ψ). En una realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención comprende una pseudouridina. En otra realización, la molécula de ARN o la molécula de oligorribonucleótido comprende un nucleósido modificado. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

"Pseudouridina" se refiere, en otra realización, a m<sup>1</sup>acp<sup>3</sup>Ψ (1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil) pseudouridina. En otra realización, el término se refiere a m<sup>1</sup>Ψ (1-metilpseudouridina). En otra realización, el término se refiere a Ψm (2'-O-metilpseudouridina. En otra realización, el término se refiere a m<sup>5</sup>D (5-metildihidrouridina). En otra realización, el término se refiere a m<sup>3</sup>Ψ (3-metilpseudouridina). En otra realización, el término se refiere a un resto de pseudouridina que no está modificado adicionalmente. En otra realización, el término se refiere a un monofosfato, difosfato o trifosfato de cualquiera de las pseudouridinas anteriores. En otra realización, el término se refiere a cualquier pseudouridina diferente conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención es un oligorribonucleótido terapéutico.

La presente solicitud divulga un método para suministrar una proteína recombinante a un sujeto, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto el sujeto con una molécula de ARN, oligorribonucleótido, polirribonucleótido o un vector de terapia génica descrito en el presente documento, suministrando, de este modo, una proteína recombinante a un sujeto.

La presente solicitud divulga una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) que comprende una pseudouridina o un nucleósido modificado y que comprende además un ARNip o ARN de horquilla corta (ARNhc). En otra divulgación, la molécula de ARNbc tiene una longitud superior a 50 nucleótidos. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

En otra divulgación, la pseudouridina o un nucleósido modificado está dentro de la secuencia del ARNip. En otra

divulgación, la pseudouridina o un nucleósido modificado está fuera de la secuencia del ARNip. En otra divulgación, 1 o más restos de pseudouridina y/o de un nucleósido modificado están presentes tanto dentro como fuera de la secuencia de ARNip. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

5 En otra divulgación, el ARNip o ARNhc está contenido internamente en la molécula de ARNbc. En otra divulgación, el ARNip o ARNhc está contenido en un extremo de la molécula de ARNbc. En otra divulgación, uno o más ARNip o ARNhc está contenido en un extremo de la molécula de ARNbc, mientras que otro o más está contenido internamente. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

10 En otra realización, la longitud de un ARN mensajero (por ejemplo, un ARN monocatenario (ARNmc)) del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención tiene una longitud superior a 30 nucleótidos. En otra realización, el ARN mensajero tiene una longitud superior a 35 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 40 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 45 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 55 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 60 nucleótidos.

15 En otra realización, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 80 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 90 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 100 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 120 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 140 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 160 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 180 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 200

20 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 250 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 300 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 350 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 400 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 450 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 600 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 700 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 800 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 900 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1100 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1200 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1300 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1400 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1600 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1800 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 2000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 2500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 3000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 4000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 5000 nucleótidos. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

25 En otra divulgación, se produce una molécula de ARNbc por transcripción *in vitro*.

30 La transcripción *in vitro* puede utilizar ARN polimerasa del fago T7. La transcripción *in vitro* puede utilizar ARN polimerasa del fago SP6. La transcripción *in vitro* puede utilizar ARN polimerasa del fago T3. La transcripción *in vitro* puede utilizar una ARN polimerasa seleccionada de las polimerasas anteriores. La transcripción *in vitro* puede utilizar ARN cualquier otra polimerasa conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

35 En otra divulgación, se produce una molécula de ARNbc por transcripción *in vitro*.

40 La transcripción *in vitro* puede utilizar ARN polimerasa del fago T7. La transcripción *in vitro* puede utilizar ARN polimerasa del fago SP6. La transcripción *in vitro* puede utilizar ARN polimerasa del fago T3. La transcripción *in vitro* puede utilizar una ARN polimerasa seleccionada de las polimerasas anteriores. La transcripción *in vitro* puede utilizar ARN cualquier otra polimerasa conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

45 En otra divulgación, la molécula de ARNbc puede procesarse por una enzima celular para producir el ARNip o ARNhc. En otra divulgación, la enzima celular es una endonucleasa. En otra divulgación, la enzima celular es Dicer. Dicer es una nucleasa de la familia de la RNasa III que inicia la interferencia de ARN (ARNi) y los fenómenos relacionados por generación de los ARN pequeños que determinan la especificidad de estas vías de silenciamiento génico (Bernstein E, Caudy AA et al, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 2001;409(6818): 363-6). En otra divulgación, la enzima celular es cualquier otra enzima celular conocida en la técnica que sea capaz de escindir una molécula de ARNbc. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

50 En otra divulgación, la molécula de ARNbc contiene dos ARNip o ARNhc. En otra divulgación, la molécula de ARNbc contiene tres ARNip o ARNhc. La molécula de ARNbc contiene más de tres ARNip o ARNhc. En otra divulgación, el ARNip y/o ARNhc se liberan de la molécula de ARNbc por una enzima celular. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

55 En otra divulgación, la presente solicitud proporciona un método para administrar un ARNip o ARNhc a una célula, que comprende administrar una molécula de ARNbc de la presente solicitud, donde la célula procesa la molécula de ARNbc para producir el ARNip o ARNhc, administrando, de este modo, un ARNip o ARNhc a una célula.

60 El nucleósido que se modifica en un ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención es uridina (U). En otra realización, el nucleósido modificado es citidina (C) además de uridina. En otro ejemplo de la divulgación, el nucleósido modificado es adenina (A). En otro ejemplo de la divulgación, el nucleósido modificado es guanina (G).

65 En otra realización, el nucleósido modificado de los métodos y usos médicos de la presente invención es

pseudouridina o 1-metilpseudouridina y opcionalmente m<sup>5</sup>C (5-metilcitidina). En otro ejemplo de la divulgación, el nucleósido modificado es m<sup>5</sup>U (5-metiluridina). En otro ejemplo de la divulgación, el nucleósido modificado es m<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-metiladenosina). En otro ejemplo de la divulgación, el nucleósido modificado es s<sup>2</sup>U (2-tiouridina). En otra realización, el nucleósido modificado es Ψ (pseudouridina). En otro ejemplo de la divulgación, el nucleósido modificado es Um (2'-O-metiluridina).

En otros ejemplos de la divulgación, el nucleósido modificado es m<sup>1</sup>A (1-metiladenosina); m<sup>2</sup>A (2-metiladenosina); Am (2'-O-metiladenosina); ms<sup>2</sup>m<sup>6</sup>A (2-metiltio-N<sup>6</sup>-metiladenosina); i<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-isopenteniladenosina); ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A (2-metiltio-N<sup>6</sup>-isopenteniladenosina); io<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A (2-metiltio-N<sup>6</sup>-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); g<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-glicinilcarbamoiladenosina); t<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-treonilcarbamoiladenosina); ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A (2-metiltio-N<sup>6</sup>-treonilcarbamoiladenosina); m<sup>6</sup>t<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-treonilcarbamoiladenosina); hn<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina); ms<sup>2</sup>hn<sup>6</sup>A (2-metiltio-N<sup>6</sup>-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m<sup>1</sup>I (1-metilinosina); m<sup>1</sup>Im (1,2'-O-dimetilinosina); m<sup>3</sup>C (3-metilcitidina); Cm (2'-O-metilcitidina); s<sup>2</sup>C (2-tiocitidina); ac<sup>4</sup>C (N<sup>4</sup>-acetilcitidina); f<sup>5</sup>C (5-formilcitidina); m<sup>5</sup>Cm (5,2'-O-dimetilcitidina); ac<sup>4</sup>Cm (N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-metilcitidina); k<sup>2</sup>C (lisidina); m<sup>1</sup>G (1-metilguanosina); m<sup>2</sup>G (N<sup>2</sup>-metilguanosina); m<sup>7</sup>G (7-metilguanosina); Gm (2'-O-metilguanosina); m<sup>2</sup><sub>2</sub>G (N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>-dimetilguanosina); m<sup>2</sup>Gm (N<sup>2</sup>,2'-O-dimetilguanosina); m<sup>2</sup><sub>2</sub>Gm (N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,2'-O-trimetilguanosina); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosina (fosfato)); yW (wibutosina); o<sub>2</sub>yW (peroxiwibutosina); OHyW (hidroxiwibutosina); OHyW\* (hidroxiwibutosina no modificada); imG (wiosina); mimG (metilwiosina); Q (queuosina); oQ (epoxiqueuosina); galQ (galactosil-queuosina); manQ (manosilqueuosina); preQo (7-ciano-7-deazaguanosina); preQ<sub>1</sub> (7-aminometil-7-deazaguanosina); G+ (arcaeosina); D (dihidrouridina); m<sup>5</sup>Um (5,2'-O-dimetiluridina); s<sup>4</sup>U (4-tiouridina); m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (5-metil-2-tiouridina); s<sup>2</sup>Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp<sup>3</sup>U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho<sup>5</sup>U (5-hidroxiuridina); mo<sup>5</sup>U (5-metoxiuridina); cmo<sup>5</sup>U (ácido uridina 5-oxiacético); mcmo<sup>5</sup>U (metil éster de ácido uridina 5-oxiacético); chm<sup>5</sup>U (5-(carboxihidroximetil)uridina); mchm<sup>5</sup>U (metil éster de 5-(carboxihidroximetil)uridina); mcm<sup>5</sup>U (5-metoxicarbonilmetiluridina); mcm<sup>5</sup>Um (5-metoxicarbonilmetil-2'-O-metiluridina); mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (5-metoxicarbonilmetil-2-tiouridina); nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm<sup>5</sup>U (5-metilaminometiluridina); mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm<sup>5</sup>se<sup>2</sup>U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm<sup>5</sup>U (5-carbamoilmetiluridina); ncm<sup>5</sup>Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm<sup>5</sup>U (5-carboximetilaminometiluridina); cmnm<sup>5</sup>Um (5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridina); cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m<sup>6</sup><sub>2</sub>A (N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-dimetiladenosina); Im (2'-O-metilinosina); m<sup>4</sup>C (N<sup>4</sup>-metilcitidina); m<sup>4</sup>Cm (N<sup>4</sup>,2'-O-dimetilcitidina); hm<sup>5</sup>C (5-hidroximetilcitidina); m<sup>3</sup>U (3-metiluridina); cm<sup>5</sup>U (5-carboximetiluridina); m<sup>6</sup>Am (N<sup>6</sup>,2'-O-dimetiladenosina); m<sup>6</sup><sub>2</sub>Am (N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>,O-2'-trimetiladenosina); m<sup>2,7</sup>G (N<sup>2</sup>,7-dimetilguanosina); m<sup>2,2,7</sup>G (N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,7-trimetilguanosina); m<sup>3</sup>Um (3,2'-O-dimetiluridina); m<sup>5</sup>D (5-metildihidrouridina); f<sup>5</sup>Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m<sup>1</sup>Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m<sup>1</sup>Am (1,2'-O-dimetiladenosina); tm<sup>5</sup>U (5-taurinometiluridina); tm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U (5-taurinometil-2-tiouridina); imG-14 (4-demetilwiosina); imG2 (isowiosina); o ac<sup>6</sup>A (N<sup>6</sup>-acetiladenosina).

En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención, como se define en las reivindicaciones, comprende una combinación de 2 o más de las modificaciones anteriores. En otra realización, el ARN mensajero comprende una combinación de 3 o más de las modificaciones anteriores. En otra realización, el ARN mensajero comprende una combinación de más de 3 de las modificaciones anteriores. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, entre el 0,1% y el 100% de los restos en el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención se modifica por la presencia de pseudouridina. En otra realización, el 0,1 % de los restos están modificados. En otra realización, el 0,2 %. En otra realización, la fracción es el 0,3%. En otra realización, la fracción es el 0,4 %. En otra realización, la fracción es el 0,5 %. En otra realización, la fracción es el 0,6 %. En otra realización, la fracción es el 0,8 %. En otra realización, la fracción es el 1 %. En otra realización, la fracción es el 1,5 %. En otra realización, la fracción es el 2 %. En otra realización, la fracción es el 2,5 %. En otra realización, la fracción es el 3 %. En otra realización, la fracción es el 4 %. En otra realización, la fracción es el 5 %. En otra realización, la fracción es el 6 %. En otra realización, la fracción es el 8 %. En otra realización, la fracción es el 10 %. En otra realización, la fracción es el 12 %. En otra realización, la fracción es el 14 %. En otra realización, la fracción es el 16 %. En otra realización, la fracción es el 18 %. En otra realización, la fracción es el 20 %. En otra realización, la fracción es el 25 %. En otra realización, la fracción es el 30 %. En otra realización, la fracción es el 35 %. En otra realización, la fracción es el 40 %. En otra realización, la fracción es el 45 %. En otra realización, la fracción es el 50 %. En otra realización, la fracción es el 60 %. En otra realización, la fracción es el 70 %. En otra realización, la fracción es el 80 %. En otra realización, la fracción es el 90 %. En otra realización, la fracción es el 100 %.

En otra realización, la fracción es inferior al 5%. En otra realización, la fracción es inferior al 3 %. En otra realización, la fracción es inferior al 1 %. En otra realización, la fracción es inferior al 2 %. En otra realización, la fracción es inferior al 4 %. En otra realización, la fracción es inferior al 6 %. En otra realización, la fracción es inferior al 8 %. En otra realización, la fracción es inferior al 10 %. En otra realización, la fracción es inferior al 12 %. En otra realización, la fracción es inferior al 15 %. En otra realización, la fracción es inferior al 20 %. En otra realización, la fracción es inferior al 30 %. En otra realización, la fracción es inferior al 40 %. En otra realización, la fracción es inferior al 50 %. En otra realización, la fracción es inferior al 60 %. En otra realización, la fracción es inferior al 70 %.

En otra realización, se modifican el 0,1% de los restos de un nucleótido dado (uridina y, opcionalmente, citidina). En

otra realización, la fracción del nucleótido es el 0,2%. En otra realización, la fracción es el 0,3%. En otra realización, la fracción es el 0,4 %. En otra realización, la fracción es el 0,5 %. En otra realización, la fracción es el 0,6 %. En otra realización, la fracción es el 0,8 %. En otra realización, la fracción es el 1 %. En otra realización, la fracción es el 1,5 %. En otra realización, la fracción es el 2 %. En otra realización, la fracción es el 2,5 %. En otra realización, la fracción es el 3 %. En otra realización, la fracción es el 4 %. En otra realización, la fracción es el 5 %. En otra realización, la fracción es el 6 %. En otra realización, la fracción es el 8 %. En otra realización, la fracción es el 10 %. En otra realización, la fracción es el 12 %. En otra realización, la fracción es el 14 %. En otra realización, la fracción es el 16 %. En otra realización, la fracción es el 18 %. En otra realización, la fracción es el 20 %. En otra realización, la fracción es el 25 %. En otra realización, la fracción es el 30 %. En otra realización, la fracción es el 35 %. En otra realización, la fracción es el 40 %. En otra realización, la fracción es el 45 %. En otra realización, la fracción es el 50 %. En otra realización, la fracción es el 60 %. En otra realización, la fracción es el 70 %. En otra realización, la fracción es el 80 %. En otra realización, la fracción es el 90 %. En otra realización, la fracción es el 100 %.

En otra realización, la fracción del nucleótido dado es inferior al 8%. En otra realización, la fracción es inferior al 10 %. En otra realización, la fracción es inferior al 5%. En otra realización, la fracción es inferior al 3 %. En otra realización, la fracción es inferior al 1 %. En otra realización, la fracción es inferior al 2 %. En otra realización, la fracción es inferior al 4 %. En otra realización, la fracción es inferior al 6 %. En otra realización, la fracción es inferior al 12 %. En otra realización, la fracción es inferior al 15 %. En otra realización, la fracción es inferior al 20 %. En otra realización, la fracción es inferior al 30 %. En otra realización, la fracción es inferior al 40 %. En otra realización, la fracción es inferior al 50 %. En otra realización, la fracción es inferior al 60 %. En otra realización, la fracción es inferior al 70 %.

En otra realización, los términos "ribonucleótido", "oligorribonucleótido", y "polirribonucleótido" se refiere a una cadena de al menos 2 combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en otra realización, compuestos que comprenden nucleótidos en los que el resto azúcar es ribosa. En otra realización, el término incluye tanto ARN como derivados de ARN en los que se modifica la cadena principal. "Nucleótidos" se refiere, en otra realización, a las unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos. El ARN del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención tiene la forma de un ARNm (ARN mensajero). Se ha descrito el uso de ARNip y miARN (Caudy AA et al, Genes & Devel 16: 2491-96 y las referencias citadas en el mismo). Además, estas formas de ARN pueden ser de cadena simple, doble, triple o cuádruple. El término también incluye, en otra realización, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener otros tipos de cadenas principales pero las mismas bases. En otra realización, el ácido nucleico artificial es un APN (ácido peptidonucleico). Los APN contienen cadenas principales peptídicas y bases de nucleótidos y son capaces de unirse, en otra realización, tanto a las moléculas de ADN como a las de ARN. En otra realización, el nucleótido es oxetano modificado. En otra realización, el nucleótido se modifica mediante el reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra realización, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante de la cadena principal de fosfato de los ácidos nucleicos originales conocida en la técnica. El uso de ácidos nucleicos de fosforotioato y los APN son conocidos por los expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, Neilsen PE, Curr Opin Struct Biol 9:353-57; y Raz NK et al Biochem Biophys Res Commun. 297:1075-84. La producción y el uso de ácidos nucleicos es conocido por los expertos en la materia y se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, (2001), Sambrook y Russell, eds. and Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio and G. C. Fareed. Cada derivado de ácido nucleico representa una realización separada de la presente invención.

En otro ejemplo de la divulgación, el término "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena que comprende menos de 25 nucleótidos (nt). En otra realización, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 24 nucleótidos. En otra realización, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 23 nucleótidos. En otra realización, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 22 nucleótidos. En otra realización, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 21 nucleótidos. En otra realización, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 20 nucleótidos. En otra realización, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 19 nucleótidos. En otra realización, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 18 nucleótidos. En otra realización, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 17 nucleótidos. En otra realización, "oligorribonucleótido" se refiere a una cadena de menos de 16 nucleótidos.

En otra realización, el término "polirribonucleótido" se refiere a una cadena que comprende más de 25 nucleótidos (nt). En otra realización, "polirribonucleótido" se refiere a una cadena de más de 26 nucleótidos. En otra realización, "polirribonucleótido" se refiere a una cadena de más de 28 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 30 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 32 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 35 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 40 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 50 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 60 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 80 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 100 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 120 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 150 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 200 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 300 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 400 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 500

nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 600 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 800 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 1000 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 1200 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 1400 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 1600 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 1800 nucleótidos. En otra realización, "el término" se refiere a una cadena de más de 2000 nucleótidos. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método no terapéutico para inducir a una célula de mamífero a producir una proteína recombinante, comprendiendo el método poner en contacto dicha célula de mamífero con un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende un marco abierto de lectura que codifica dicha proteína recombinante; donde el ARNm sintetizado *in vitro* comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina); donde la cantidad de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a dicho contacto es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1  $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta al contacto de dichas células de mamífero con un ARNm homólogo no modificado que no comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina).

"Codificante" se refiere, en otra realización, a una molécula de ARN que contiene un gen que codifica la proteína de interés. La molécula de ARN del método de la invención y del uso de la invención comprenden un marco abierto de lectura que codifica la proteína de interés. En otra realización, también se codifican 1 o más proteínas diferentes. En otra realización, la proteína de interés es la única proteína codificada. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención se traduce en la célula de manera más eficaz que una molécula de ARN no modificada con la misma secuencia. En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención muestra una capacidad potenciada para ser traducido por una célula diana. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 2 veces en relación con su homólogo no modificado. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 3 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 5 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 7 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 10 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 15 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 20 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 50 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 100 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 200 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 1000 veces. En otra realización, la traducción se potencia por un factor de 2000 veces. En otra realización, el factor es de 10-1000 veces. En otra realización, el factor es de 10-100 veces. En otra realización, el factor es de 10-200 veces. En otra realización, el factor es de 10-300 veces. En otra realización, el factor es de 10-500 veces. En otra realización, el factor es de 20-1000 veces. En otra realización, el factor es de 30-1000 veces. En otra realización, el factor es de 50-1000 veces. En otra realización, el factor es de 100-1000 veces. En otra realización, el factor es de 200-1000 veces. En otra realización, la traducción se potencia con cualquier otra cantidad significativa o intervalo de cantidades. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

Los métodos para determinar la eficacia de la traducción son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, medir la actividad de una proteína indicadora codificada (por ejemplo, luciferasa o renilla [Ejemplos en el presente documento] o proteína verde fluorescente [Wall AA, Phillips AM et al, Effective translation of the second cistron in two Drosophila dicistronic transcripts is determined by the absence of in-frame AUG codons in the first cistron. J Biol Chem 2005;280(30): 27670-8]) o medir el marcador radioactivo incorporado en la proteína traducida (Ngosuwan J, Wang NM et al, Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 2003;278(9): 7034-42). Cada método representa una divulgación separada de la presente solicitud.

En los estudios de expresión proporcionados en el presente documento, la traducción se midió a partir de ARN complejo con Lipofectin® (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EE. UU.) y se inyectó en la vena de la cola de los ratones. En los lisados de bazo, el ARN modificado con pseudouridina se tradujo significativamente más eficazmente que el ARN no modificado (Figura 12B). En las condiciones utilizadas en el presente documento, la eficacia de los métodos basados en la transfección de la presente invención se correlaciona con la capacidad del reactivo de transfección para penetrar en los tejidos, proporcionando una explicación de por qué el efecto fue más pronunciado en las células del bazo. El flujo sanguíneo esplénico es un sistema abierto, con los contenidos de la sangre en contacto directo con los elementos de la pulpa roja y blanca, incluidas las células linfoides.

En otro experimento, los análisis de fosforilación *in vitro* se realizaron utilizando PKR recombinante humana y su sustrato, eIF2 $\alpha$  en presencia de ARNm codificante de renilla protegido con caperuza (0,5 y 0,05 ng/ $\mu$ l). El ARNm que contenía pseudouridina ( $\Psi$ ) no activó la PKR, como se detectó por la falta de autofosforilación de PKR y la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , mientras que el ARN sin modificación de nucleósidos y el ARNm con modificación con m5C activaron PKR. Se sabe que eIF2 $\alpha$  fosforilado bloquea el inicio de la traducción del ARNm, por lo tanto, la falta de

fosforilación permite, en otra realización, una traducción potenciada del ARNm que contiene pseudouridina ( $\Psi$ ).

En otra realización, la traducción potenciada se realiza en una célula (en relación con la traducción en la misma célula de una molécula de ARN no modificada con la misma secuencia; Ejemplos 10-11). En otro ejemplo de la divulgación, la traducción potenciada se realiza *in vitro* (por ejemplo, en una mezcla de traducción *in vitro* o un lisado de reticulocitos; Ejemplos 10-11. En otra realización, la traducción potenciada se realiza *in vivo* (Ejemplo 13). En cada caso, la traducción potenciada es en relación con una molécula de ARN no modificada con la misma secuencia, en las mismas condiciones. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

En otra realización, el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención es significativamente menos inmunogénico que una molécula de ARN sintetizada *in vitro* no modificada con la misma secuencia. En otra realización, la molécula de ARN modificada es 2 veces menos inmunogénica que su homóloga no modificada. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 3 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 5 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 7 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 10 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 15 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 20 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 50 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 100 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 200 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 500 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 1000 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por un factor de 2000 veces. En otra realización, la inmunogenicidad se reduce por otra diferencia de factor.

En otra realización, "significativamente menos inmunogénico" se refiere a una disminución detectable en la inmunogenicidad. En otra realización, la expresión se refiere a una disminución de la inmunogenicidad en veces (por ejemplo, 1 de las disminuciones de veces enumeradas anteriormente). En otra realización, la expresión se refiere a una disminución tal que una cantidad eficaz del ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención se puede administrar sin desencadenar una respuesta inmunitaria detectable. En otra realización, la expresión se refiere a una disminución tal que el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención puede administrarse de forma repetida sin provocar una respuesta inmunitaria suficiente para reducir de manera detectable la expresión de la proteína recombinante. En otra realización, la disminución es tal que el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención puede administrarse de forma repetida sin provocar una respuesta inmunitaria suficiente para eliminar la expresión detectable de la proteína recombinante.

"Cantidad eficaz" del ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención se refiere, en otra realización, a una cantidad suficiente para ejercer un efecto terapéutico. En otra realización, la expresión se refiere a una cantidad suficiente para provocar la expresión de una cantidad detectable de la proteína recombinante. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

La inmunogenicidad reducida de las moléculas de ARN, oligorribonucleótido y polirribonucleótido se demuestra en el presente documento (Ejemplos 1-8).

Los métodos para determinar la inmunogenicidad son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, medir la secreción de citocinas (p.ej., IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$  o  $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$ , o IL-8; Ejemplos en el presente documento), medir la expresión de los marcadores de activación de CD (por ejemplo, CD83, HLA-DR, CD80 y CD86; ejemplos en el presente documento) o medir la capacidad de actuar como un adyuvante para una respuesta inmunitaria adaptativa.

En otro ejemplo, la inmunogenicidad relativa del nucleótido modificado y su homólogo no modificado se determina determinando la cantidad del nucleótido modificado requerido para provocar una de las respuestas anteriores en el mismo grado que una cantidad dada del nucleótido no modificado. Por ejemplo, si se requiere el doble de nucleótido modificado para provocar la misma respuesta, entonces el nucleótido modificado es dos veces menos inmunogénico que el nucleótido no modificado.

La inmunogenicidad relativa del nucleótido modificado y su homólogo no modificado se determina determinando la cantidad de citocinas (por ejemplo, IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$  o  $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8) secretada en respuesta a la administración del nucleótido modificado, en relación con la misma cantidad del nucleótido no modificado. Por ejemplo, si se segrega la mitad de la citocina, entonces el nucleótido modificado es dos veces menos inmunogénico que el nucleótido no modificado. En otro ejemplo, se restan los niveles de estimulación de fondo antes de calcular la inmunogenicidad en los métodos anteriores.

En otra realización, un método de la presente invención comprende además mezclar el ARN mensajero con un reactivo de transfección antes de la etapa de contacto. En otra realización, un método de la presente invención comprende además administrar el ARN mensajero junto con el reactivo de transfección. En otra realización, el

reactivo de transfección es un reactivo lipídico catiónico (Ejemplo 3).

En otra realización, el reactivo de transfección es un reactivo de transfección basado en lípidos. En otra realización, el reactivo de transfección es un reactivo de transfección basado en proteínas. En otra realización, el reactivo de transfección es un reactivo de transfección basado en polietilenimina. En otra realización, el reactivo de transfección es fosfato de calcio. En otra realización, el reactivo de transfección es Lipofectin® o Lipofectamine®. En otra realización, el reactivo de transfección es cualquier otro reactivo de transfección conocido en la técnica.

En otra realización, el reactivo de transfección forma un liposoma. Los liposomas, en otra realización, aumentan la estabilidad intracelular, aumentan la eficacia de captación y mejoran la actividad biológica. En otra realización, los liposomas son vesículas esféricas huecas compuestas de lípidos dispuestos de manera similar a los lípidos que forman la membrana celular. Tienen, en otra realización, un espacio acuoso interno para atrapar compuestos solubles en agua y varían en tamaño desde 0,05 a varios micrones de diámetro. En otra realización, los liposomas pueden suministrar ARN a las células en una forma biológicamente activa.

En otra realización, la célula diana de los métodos de la presente invención es una célula presentadora de antígeno. En otra realización, la célula es una célula animal. En otra realización, la célula es una célula dendrítica (Ejemplo 11). En otra realización, la célula es una célula neuronal. En otra realización, la célula es una célula cerebral (Ejemplo 13). En otra realización, la célula es una célula de bazo. En otra realización, la célula es una célula linfocítica. En otra realización, la célula es una célula pulmonar (Ejemplo 13). En otra realización, la célula es una célula de la piel. En otra realización, la célula es un queratinocito. En otra realización, la célula es una célula endotelial. En otra realización, la célula es un astrocito, una célula glial o una neurona (Ejemplo 13). En otra realización, la célula es una célula alveolar (Ejemplo 13). En otra realización, la célula es una célula alveolar de superficie (Ejemplo 13). En otra realización, la célula es un macrófago alveolar. En otra realización, la célula es un neumocito alveolar. En otra realización, la célula es una célula endotelial vascular. En otra realización, la célula es una célula mesenquimática. En otra realización, la célula es una célula epitelial. En otra realización, la célula es una célula hematopoyética. En otra realización, la célula es una célula de epitelio colónico. En otra realización, la célula es una célula de epitelio pulmonar. En otra realización, la célula es una célula de médula ósea.

En otras realizaciones, la célula diana es una célula de Claudius, célula de Hensen, célula de Merkel, célula de Müller, célula de Paneth, célula de Purkinje, célula de Schwann, célula de Sertoli, célula acidófila, célula acinar, adipoblasto, adipocito, célula alfa marrón o blanca, célula amacrina, célula beta, célula capsular, cementocito, célula principal, condroblasto, condrocito, célula cromafina, célula cromófoba, corticotropo, célula delta, célula de Langerhans, célula dendrítica folicular, célula enterocromafina, ependimocito, célula epitelial, célula basal, célula escamosa, célula endotelial, célula transicional, eritroblasto, eritrocito, fibroblasto, fibrocito, célula folicular, célula germinal, gameto, óvulo, espermatozoide, ovocito, ovocito primario, ovocito secundario, espermatida, espermatocito, espermatozoide primario, espermatozoide secundario, epitelio germinal, célula gigante, célula glial, astrocito, astrocito, oligodendroblasto, oligodendrocito, glioblasto, célula caliciforme, gonadotropo, célula de la granulosa, hemocitoblasto, célula del pelo, hepatoblasto, hepatocito, hialocito, célula intersticial, célula yuxttaglomerular, queratinocito, queratocito, célula de la lemma, leucocito, granulocito, basófilo, eosinófilo, neutrófilo, linfoblasto, linfoblasto B, linfoblasto T, linfocito, linfocito B, linfocito T, linfocito T inducido por auxiliar, linfocito T Th1, linfocito T Th2, linfocito citolítico natural, timocito, macrófago, célula de Kupffer, macrófago alveolar, célula espumosa, histiocito, célula lútea, célula madre linfocítica, célula linfocítica, célula madre linfocítica, célula macroglial, mamotropo, mastocito, meduloblasto, megacarioblasto, megacariocito, melanoblasto, melanocito, célula mesangial, célula mesotelial, metamielocito, monoblasto, monocito, célula mucosa del cuello, célula muscular, célula muscular cardíaca, célula del músculo esquelético, célula del músculo liso, mielocito, célula mielocítica, célula madre mielocítica, mioblasto, célula mioepitelial, miofibroblasto, neuroblasto, célula neuroepitelial, neurona, odontoblasto, osteoblasto, osteoclasto, osteocito, célula oxíntica, célula parafolicular, célula paralútea, célula péptica, pericito, célula mononuclear de sangre periférica, feocromocito, célula falángica, pinealocito, pituitario, célula de plasma, plaqueta, podocito, proeritroblasto, promonocito, promieloblasto, promielocito, pronormoblasto, reticulocito, célula epitelial de pigmento retiniano, retinoblasto, célula pequeña, somatotropo, célula madre, célula sustentacular, célula teloglial o célula zimogénica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

Se puede tratar una variedad de trastornos empleando usos y ARNm para su uso de acuerdo con la presente invención, que incluyen, inter alia, trastornos monogénicos, enfermedades infecciosas, trastornos adquiridos, cáncer y similares. Los trastornos monogénicos ejemplares incluyen la deficiencia de ADA, fibrosis quística, hipercolesterolemia familiar, hemofilia, enfermedad granulomatosa crónica, Distrofia muscular de Duchenne, Anemia de Fanconi, anemia falciforme, Enfermedad de Gaucher, Síndrome de Hunter, SCID ligado a X y similares. En otra realización, el trastorno tratado implica una de las proteínas enumeradas a continuación. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la proteína recombinante codificada por un ARN mensajero de métodos y usos de la presente invención y para su uso de acuerdo con la presente invención, es ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa.

En otra realización, la proteína recombinante es eritropoyetina (EPO).

En otras realizaciones, la proteína recombinante codificada es ABCA4; ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; APOA2; AVSD1; BRCD2; C1QA; C1QB; C1QG; C8A; C8B; CACNA1S; CCV; CD3Z; CDC2L1; CHML; CHS1; CIAS1; CLCNKB; CMD1A; CMH2; CMM; COL11A1; COL8A2; COL9A2; CPT2; CRB1; CSE; CSF3R; CTPA; CTSK; DBT; DIOI; DISCI; DPYD; EKV; ENO1; ENO1P; EPB41; EPHX1; F13B; F5; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FCHL; FH; FMO3; FMO4; FUCA1; FY; GALE; GBA; GFND; GJA8; GJB3; GLC3B; HF1; HMGCL; HPC1; HRD; HRPT2; HSD3B2; HSPG2; KCNQ4; KCS; KIF1B; LAMB3; LAMC2; LGMD1B; LMNA; LOR; MCKD1; MCL1; MPZ; MTHFR; MTR; MUTYH; MYOC; NB; NCF2; NEM1; NPHS2; NPPA; NRAS; NTRK1; OPTA2; PBX1; PCHC; PGD; PHA2A; PHGDH; PKLR; PKP1; PLA2G2A; PLOD; PPOX; PPT1; PRCC; PRG4; PSEN2; PTOS1; REN; RFX5; RHD; RMD1; RPE65; SCCD; SERPINC1; SJS1; SLC19A2; SLC2A1; SPG23; SPTA1; TAL1; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A; VMGLOM; VWS; WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACP1; AGXT; AHRH; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS; BMPR2; CHRNA1; CMCWTD; CNGA3; COL3A1; COL4A3; COL4A4; COL6A3; CPS1; CRYGA; CRYGEP1; CYP1B1; CYP27A1; DBI; DES; DYSF; EDAR; EFEMP1; EIF2AK3; ERCC3; FSHR; GINGF; GLC1B; GPD2; GYPC; HADHA; HADHB; HOXD13; HPE2; IGKC; IHH; IRS1; ITGA6; KHK; KYN; LCT; LHCGR; LSFC; MSH2; MSH6; NEB; NMTT; NPHP1; PAFAH1P1; PAX3; PAX8; PMS1; PNKD; PPH1; PROC; REG1A; SAG; SFTPB; SLC11A1; SLC3A1; SOS1; SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFH1B; ACAA1; AGS1; AGTR1; AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTB; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP; CPO; CRV; CTNNB1; DEM; ETM1; FANCD2; FIH; FOXL2; GBE1; GLB1; GLC1C; GNAI2; GNAT1; GP9; GPX1; HGD; HRG; ITIH1; KNG; LPP; LRS1; MCCC1; MDS1; MHS4; MIF; MLH1; MYL3; MYMY; OPA1; P2RY12; PBXP1; PCCB; POU1F1; PPARG; PROS1; PTHR1; RCA1; RHO; SCA7; SCLC1; SCN5A; SI; SLC25A20; SLC2A2; TF; TGFBR2; THPO; THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS; UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A; XPC; ZNF35; ADH1B; ADH1C; AFP; AGA; AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTDP2; ELONG; ENAM; ETFDH; EVC; F11; FAPB2; FGA; FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC; GNPTA; GNRHR; GYPA; HCA; HCL2; HD; HTN3; HVBS6; IDUA; IF; JPD; KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2; MSX1; MTP; NR3C2; PBT; PDE6B; PEE1; PITX2; PKD2; QDPR; SGCB; SLC25A4; SNCA; SOD3; STATH; TAPVR1; TYS; WBS2; WFS1; WHCR; ADAMTS2; ADRB2; AMCN; AP3B1; APC; ARSB; B4GALT7; BHR1; C6; C7; CCAL2; CKN1; CMDJ; CRHBP; CSF1R; DHFR; DIAPH1; DTR; EOS; EPD; ERVR; F12; FBN2; GDNF; GHR; GLRA1; GM2A; HEXB; HSD17B4; ITGA2; KFS; LGMD1A; LOX; LTC4S; MAN2A1; MCC; MCCC2; MSH3; MSX2; NR3C1; PCSK1; PDE6A; PFI; RASA1; SCZD1; SDHA; SGCD; SLC22A5; SLC26A2; SLC6A3; SM1; SMA@; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFBI; ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB; BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1; COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1; ELOVL4; EPM2A; ESR1; EYA4; F13A1; FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR; GSE; HCR; HFE; HLA-A; HLA-DPB1; HLA-DRA; HPFH; ICS1; IDDM1; IFNGR1; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCS1; MUT; MYB; NEU1; NKS1; NYS2; OA3; ODDD; OFC1; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1; PLA2G7; PLG; POLH; PPAC; PSORS1; PUJO; RCD1; RDS; RHAG; RP14; RUNX2; RWS; SCA1; SCZD3; SIASD; SOD2; ST8; TAP1; TAP2; TFAP2B; TNDM; TNF; TPBG; TPMT; TULP1; WISP3; AASS; ABCB1; ABCB4; ACHE; AQP1; ASL; ASNS; AUTS1; BPGM; BRAF; C7orf2; CACNA2D1; CCM1; CD36; CFTR; CORDOMA; CLCN1; CMH6; CMT2D; COL1A2; CRS; CYMD; DFNA5; DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1; FKBP6; GCK; GHRHR; GHS; GLI3; GPDS1; GUSB; HLXB9; HOXA13; HPFH2; HRX; IAB; IMMP2L; KCNH2; LAMB1; LEP; MET; NCF1; NM; OGDH; OPN1SW; PEX1; PGAM2; PMS2; PON1; PPP1R3A; PRSS1; PTC; PTPN12; RP10; RP9; SERPINE1; SGCE; SHFM1; SHH; SLC26A3; SLC26A4; SLOS; SMAD1; TBXAS1; TWIST; ZWS1; ACHM3; ADRB3; ANK1; CA1; CA2; CCAL1; CLN8; CMT4A; CNGB3; COH1; CPP; CRH; CYP11B1; CYP11B2; DECR1; DPYS; DURS1; EBS1; ECA1; EGI; EXT1; EYA1; FGFR1; GNRH1; GSR; GULOP; HR; KCNQ3; KFM; KWE; LGCR; LPL; MCPH1; MOS; MYC; NAT1; NAT2; NBS1; PLAT; PLEC1; PRKDC; PXMP3; RP1; SCZD6; SFTPC; SGM1; SPG5A; STAR; TG; TRPS1 TTPA; VMD1; WRN; ABCA1; ABL1; ABO; ADAMTS13; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP; AMCD1; ASS; BDMF BSCL; C5; CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1; CRAT; DBH; DNAI1; DYS; DYT1; ENG; FANCC; FBP1; FCMD FRDA; GALT; GLDC; GNE; GSM1; GSN; HSD17B3; HSN1; IBM2; INVS; JBTS1; LALL; LCCS1; LCCS; LGMD2H LMX1B; MLLT3; MROS; MSSE; NOTCH1; ORM1; PAPP; PIP5K1B; PTCH; PTGS1; RLN1; RLN2; RMRP; ROR2 RPD1; SARDH; SPTLC1; STOM; TDFA; TEK; TMC1; TRIM32; TSC1; TYRP1; XPA; CACNB2; COL17A1; CUBN CXCL12; CYP17; CYP2C19; CYP2C9; EGR2; EMX2; ERCC6; FGFR2; HK1; HPS1; IL2RA; LGI1; LIPA; MAT1A; MBL2 MKI67; MXI1; NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCB; PEO1; PHYH; PNLIP; PSAP; PTEN; RBP4; RDPA; RET; SFTPA1 SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1; TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8; ACAT1; ALX4; AMPD3; ANC; APOA1 APOA4; APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1; CD3E; CD3G; CD59; CDKN1C; CLN2; CNTF; CPT1A CTSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT; DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2; GIF; HBB HBBP1; HBD; HBE1; HBG1; HBG2; HMBS; HND; HOMG2; HRAS; HVBS1; IDDM2; IGER; INS; JBS; KCNJ11; KCNJ1 KCNQ1; LDHA; LRP5; MEN1; MLL; MYBPC3; MYO7A; NNO1; OPPG; OPTB1; PAX6; PC; PDX1; PGL2; PGR; PORC PTH; PTS; PVRL1; PYGM; RAG1; RAG2; ROM1; RRAS2; SAA1; SCA5; SCZD2; SDHD; SERPING1; SMPD1; TCIRG1 TCL2; TECTA; TH; TREH; TSG101; TYR; USH1C; VMD2; VRNI; WT1; WT2; ZNF145; A2M; AAAS; ACADS; ACLS ACVR1L1; ALDH2; AMHR2; AOM; AQP2; ATD; ATP2A2; BDC; C1R; CD4; CDK4; CNA1; COL2A1; CYP27B1; DRPLA ENUR2; FEOM1; FGF23; FPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMGA2; HMN2; HPD; IGF1; KCNA1; KERA; KRAS2; KRT1 KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRTHB6; LDHB; LYZ; MGCT; MPE; MVK; MYL2; OAP; PAH; PPKB PRB3; PTPN11; PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1; SCA2; SCNN1A; SMAL; SPPM; SPSMA; TBX3; TBX5; TCF1; TPI1 TSC3; ULR; VDR; VWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1; CLN5; CPB2; ED2; EDNRB; ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2; GJB6 IPF1; MBS1; MCOR; NYS4; PCCA; RB1; RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2; SLC25A15; STARP1; ZNF198; ACHM1 ARVD1; BCH; CTAA1; DAD1; DFNB5; EML1; GALT; GCH1; IBGC1; IGH@; grupo IGH; IGH1; IGHM; IGH; IV LTBP2; MCOP; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1; PSEN1; PYGL; RPGRIP1 SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7; SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1; TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USH1A

VP; ACCPN; AHO2; ANCR; B2M; BBS4; BLM; CAPN3; CDAN1; CDAN3; CLN6; CMH3; CYP19; CYP1A1; CYP1A2  
 DYX1; EPB42; ETFA; EYCL3; FAH; FBN1; FES; HCVS; HEXA; IVD; LCS1; LIPC; MYO5A; OCA2; OTSC1; PWCR  
 RLB1; SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A; WMS; ABCC6; ALDOA; APRT; ATP2A1; BBS2; CARD15; CATM; CDH1  
 CETP; CHST6; CLN3; CREBBP; CTH; CTM; CYBA; CYLD; DHS; DNASA1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS; GAN  
 5 HAGH; HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1; HBZ; HBZP; HP; HSD11B2; IL4R; LIPB; MC1R; MEFV; MHC2TA; MLYCD;  
 MMVP1 PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS; PMM2; PXE; SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2;  
 VDI; WT3 ABR; ACACA; ACADVL; ACE; ALDH3A2; APOH; ASPA; AXIN2; BCL5; BHD; BLMH; BRCA1; CACD;  
 CCA1; CCZS CHRN1; CHRNE; CMT1A; COL1A1; CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR;  
 GFAP; GH1; GH2 GP1BA; GPSC; GUCY2D; ITGA2B; ITGB3; ITGB4; KRT10; KRT12; KRT13; KRT14; KRT14L1;  
 10 KRT14L2; KRT14L3 KRT16; KRT16L1; KRT16L2; KRT17; KRT9; MAPT; MDB; MDCR; MGI; MHS2; MKS1; MPO;  
 MYO15A; NAGLU; NAPB NF1; NME1; P4HB; PAFAH1B1; PECAM1; PEX12; PHB; PMP22; PRKAR1A; PRKCA;  
 PRKWNK4; PRP8; PRPF8 PTLAH; RARA; RCV1; RMSA1; RP17; RSS; SCN4A; SERPINF2; SGCA; SGSH; SHBG;  
 SLC2A4; SLC4A1; SLC6A4 SMCR; SOST; SOX9; SSTR2; SYM1; SYNS1; TCF2; THRA; TIMP2; TOC; TOP2A;  
 TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1 BCL2; CNSN; CORD1; CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO; LAMA3; LCFS2; MADH4;  
 15 MAFD1; MC2R; MCL; MYP2 NPC1; SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE; ATHS; BAX;  
 BCKDHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A CCO; CEACAM5; COMP; CRX; DBA; DDU; DFNA4; DLL3; DM1; DMWD;  
 E11S; ELA2; EPOR; ERCC2; ETFB; EXT3 EYCL1; FTL; FUT1; FUT2; FUT6; GAMT; GCDH; GPI; GUSM; HB1;  
 HCL1; HHC2; HHC3; ICAM3; INSR; JAK3; KLK3 LDLR; LHB; LIG1; LOH19CR1; LYL1; MAN2B1; MCOLN1; MDRV;  
 MLLT1; NOTCH3; NPHS1; OFC3; OPA3; PEPD PRPF31; PRTN3; PRX; PSG1; PVR; RYR1; SLC5A5; SLC7A9;  
 20 STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNI3; TYROBP; ADA AHY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3;  
 EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5; GNAS; GSS; HNF4A JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1; PI3; PPCD; PPGB;  
 PRNP; THBD; TOP1; AIRE; APP; CBS; COL6A1; COL6A2 CSTB; DCR; DSCR1; FPDMM; HLCS; HPE1; ITGB2;  
 KCNE1; KNO; PRSS7; RUNX1; SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2; CSF2RB;  
 CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR; DIA1; EWSR1; GGT1; MGCR; MN1 NAGA; NF2; OGS2; PDGFB; PPARA;  
 25 PRODH; SCO2; SCZD4; SERPIND1; SLC5A1; SOX10; TCN2; TIMP3; TST VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2;  
 AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2; AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1; ARSC2 ARSE; ARTS; ARX; ASAT; ASSP5;  
 ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS; BGN; BTK; BZX; C1HR; CACNA1F; CALB3; CBBM CCT; CDR1; CFNS; CGF1; CHM;  
 CHR39C; CIDX; CLA2; CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5 COL4A6; CPX; CVD1; CYBB;  
 DCX; DFN2; DFN4; DFN6; DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1 ELK1; EMD; EVR2; F8; F9;  
 30 FCP1; FDP5L5; FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDX1 GJB1; GK; GLA; GPC3;  
 GRPR; GTD; GUST; HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2C; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; IND1 IP1; IP2; JMS; KAL1;  
 KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECF2; MF4; MGC1 MIC5; MIDI;  
 MLLT7; MLS; MRSD; MRX14; MRX1; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTM1; MYCL2; MYP1 NDP;  
 NHS; NPHL1; NR0B1; NSX; NYS1; NYX; OA1; OASD; OCRL; ODT1; OFD1; OPA2; OPD1; OPEM; OPN1LW  
 35 OPN1MW; OTC; P3; PDHA1; PDR; PFC; PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2; PHP; PIGA;  
 PLP1; POF1; POLA; POU3F4; PPMX; PRD; PRPS1; PRPS2; PRS; RCCP2; RENBP; RENS1; RP2; RP6; RPGR;  
 RPS4X; RPS6KA3; RS1; S11; SDYS; SEDL; SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX; SRS; STS;  
 SYN1; SYP; TAF1; TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC; TIMM8A; TIMP1; TKCR; TNFSF5; UBE1; UBE2A; WAS;  
 WSN; WTS; WWS; XIC; XIST; XK; XM; XS; ZFX; ZIC3; ZNF261; ZNF41; ZNF6; AMELY; ASSP6; AZF1; AZF2; DAZ;  
 40 GCY; RPS4Y; SMCY; SRY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1; ASD1; ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3;  
 CLN4; CSF2RA; CTS1; DF; DIH1; DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EEF1A1L14; EYCL2; FANCB; GCSH; GCSL;  
 GIP; GTS; HHG; HMI; HOAC; HOKPP2; HRPT1; HSD3B3; HTC1; HV1S; ICHQ; ICR1; ICR5; IL3RA; KAL2; KMS;  
 KRT18; KSS; LCAT; LHON; LIMM; MANBB; MCPH2; MEB; MELAS; MIC2; MPFD; MS; MSS; MTATP6; MTCO1;  
 MTCO3; MTCYB; MTND1; MTND2; MTND4; MTND5; MTND6; MTRNR1; MTRNR2; MTTE; MTTG; MTTI; MTTK;  
 45 MTTL1; MTTL2; MTTN; MTTT; MTTT1; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1;  
 PRO1; PROP1; RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM; o TTD.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para tratar anemia en un sujeto, que comprende poner  
 en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN  
 50 sintetizada *in vitro*, eritropoyetina, tratando, de este modo, la anemia en un sujeto. En otra divulgación, el ARN  
 sintetizado *in vitro* comprende además una pseudouridina o un nucleósido modificado. Cada posibilidad representa  
 una divulgación separada de la presente solicitud. En otra divulgación, la célula es una célula de tejido subcutáneo.  
 En otra divulgación, la célula es una célula pulmonar. En otra divulgación, la célula es un fibroblasto. En otra  
 divulgación, la célula es un linfocito. En otra divulgación, la célula es una célula de músculo liso. En otra divulgación,  
 55 la célula es cualquier otro tipo de célula conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una divulgación  
 separada de la presente solicitud.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para tratar un vasoespasmio en un sujeto, que  
 comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la  
 60 molécula de ARN sintetizada *in vitro*, óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), tratando, de este modo, un  
 vasoespasmio en un sujeto.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para mejorar una tasa de supervivencia de una célula en  
 un sujeto, que comprende poner en contacto la célula con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la  
 65 molécula de ARN sintetizada *in vitro*, una proteína de choque térmico, mejorando, de este modo, una tasa de  
 supervivencia de una célula en un sujeto.

En otra divulgación, la célula cuya tasa de supervivencia se mejora es una célula isquémica. En otra divulgación, la célula es no isquémica. En otra divulgación, la célula se ha expuesto a un ambiente isquémico. En otra divulgación, la célula se ha expuesto a un estrés ambiental. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

5 En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para disminuir una incidencia de una reestenosis de un vaso sanguíneo después de un procedimiento que ensancha el vaso sanguíneo, que comprende poner en contacto una célula del vaso sanguíneo con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, una proteína de choque térmico, disminuyendo, de este modo, una incidencia de reestenosis en un sujeto.

10 En otra divulgación, el procedimiento es una angioplastia. En otra divulgación, el procedimiento es cualquier otro procedimiento conocido en la técnica que ensanche el vaso sanguíneo. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

15 En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para aumentar el crecimiento de pelo a partir de un folículo piloso en el cuero cabelludo de un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del cuero cabelludo con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, una telomerasa o una proteína inmunosupresora, aumentando, de este modo, un crecimiento de pelo a partir de un folículo piloso.

20 En otra divulgación, la proteína inmunosupresora es la hormona estimulante de los melanocitos  $\alpha$  (a-MSH). En otra divulgación, la proteína inmunosupresora es el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). En otra divulgación, la proteína inmunosupresora es el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I). En otra divulgación, la proteína inmunosupresora es cualquier otra proteína inmunosupresora conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

25 En otra realización, la presente invención proporciona un método para inducir la expresión de una enzima con actividad antioxidante en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, la enzima, induciendo, de este modo, la expresión de una enzima con actividad antioxidante en una célula.

30 En otra realización, la enzima es catalasa. En otra realización, la enzima es glutatión peroxidasa. En otra realización, la enzima es la fosfolípido hidropéroxido glutatión peroxidasa. En otra realización, la enzima es superóxido dismutasa-1. En otra realización, la enzima es superóxido dismutasa-2. En otra realización, la enzima es cualquier otra enzima con actividad antioxidante que es conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

35 En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para tratar fibrosis quística en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, el Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística (CFTR), tratando, de este modo, la fibrosis quística en un sujeto.

40 En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para tratar una agammaglobulinemia ligada a X en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, una tirosina quinasa de Bruton, tratando, de este modo, una agammaglobulinemia ligada a X.

45 En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para tratar una inmunodeficiencia combinada grave por déficit de adenosina desaminasa (ADA SCID) en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, un ADA, tratando, de este modo, una ADA SCID.

50 En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para reducir la capacidad de respuesta inmunitaria de la piel y mejorar la patología de la piel, que comprende poner en contacto una célula del sujeto con una molécula de ARN sintetizada *in vitro*, codificando, la molécula de ARN sintetizada *in vitro*, una ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa, reduciendo, de este modo, la capacidad de respuesta inmunitaria de la piel y mejorando la patología de la piel.

55 En otra realización, la molécula de ARNm del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención está encapsulado en una nanopartícula. Los métodos para el empaquetado de nanopartículas son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Bose S, et al (Role of Nucleolin in Human Parainfluenza Virus Type 3 Infection of Human Lung Epithelial Cells. J. Virol. 78:8146. 2004); Dong Y et al. Poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. Biomaterials 26:6068. 2005); Lobenberg R. et al (Improved body distribution of  $^{14}\text{C}$ -labelled AZT bound to nanoparticles in rats determined by radioluminography. J Drug Target 5:171. 1998); Sakuma SR et al (Mucoadhesion of polystyrene nanoparticles having surface hydrophilic polymeric chains in the gastrointestinal tract. Int J Pharm 177:161. 1999); Virovic L et al.

Novel delivery methods for treatment of viral hepatitis: an update. *Expert Opin Drug Deliv* 2:707. 2005); y Zimmermann E et al, Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur J Pharm Biopharm* 52:203. 2001).

- Se pueden usar varias realizaciones de intervalos de dosificación de compuestos del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención en el método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención. En una realización, la dosificación está en el intervalo de 1-10 µg/día. En otra realización, la dosificación es 2-10 µg/día. En otra realización, la dosificación es 3-10 µg/día. En otra realización, la dosificación es 5-10 µg/día. En otra realización, la dosificación es 2-20 µg/día. En otra realización, la dosificación es 3-20 µg/día. En otra realización, la dosificación es 5-20 µg/día. En otra realización, la dosificación es 10-20 µg/día. En otra realización, la dosificación es 3-40 µg/día. En otra realización, la dosificación es 5-40 µg/día. En otra realización, la dosificación es 10-40 µg/día. En otra realización, la dosificación es 20-40 µg/día. En otra realización, la dosificación es 5-50 µg/día. En otra realización, la dosificación es 10-50 µg/día. En otra realización, la dosificación es 20-50 µg/día. En una realización, la dosificación es 1-100 µg/día. En otra realización, la dosificación es 2-100 µg/día. En otra realización, la dosificación es 3-100 µg/día. En otra realización, la dosificación es 5-100 µg/día. En otra realización la dosificación es 10-100 µg/día. En otra realización la dosificación es 20-100 µg/día. En otra realización la dosificación es 40-100 µg/día. En otra realización la dosificación es 60-100 µg/día.
- En otra realización, la dosificación es 0,1 µg/día. En otra realización, la dosificación es 0,2 µg/día. En otra realización, la dosificación es 0,3 µg/día. En otra realización, la dosificación es 0,5 µg/día. En otra realización, la dosificación es 1 µg/día. En otra realización, la dosis es 2 mg/día. En otra realización, la dosificación es 3 µg/día. En otra realización, la dosificación es 5 µg/día. En otra realización, la dosificación es 10 µg/día. En otra realización, la dosificación es 15 µg/día. En otra realización, la dosificación es 20 µg/día. En otra realización, la dosificación es 30 µg/día. En otra realización, la dosificación es 40 µg/día. En otra realización, la dosificación es 60 µg/día. En otra realización, la dosificación es 80 µg/día. En otra realización, la dosificación es 100 µg/día.
- En otra realización, la dosificación es 10 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 20 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 30 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 40 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 60 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 80 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 100 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 150 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 200 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 300 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 400 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 600 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 800 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 1000 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 1,5 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 2 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 3 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 5 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 10 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 15 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 20 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 30 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 50 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 80 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 100 mg/dosis.
- En otra realización, la dosificación es 10-20 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 20-30 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 20-40 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 30-60 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 40-80 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 50-100 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 50-150 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 100-200 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 200-300 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 300-400 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 400-600 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 500-800 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 800-1000 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 1000-1500 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 1500-2000 µg/dosis. En otra realización, la dosificación es 2-3 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 2-5 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 2-10 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 2-20 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 2-30 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 2-50 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 2-80 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 2-100 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 3-10 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 3-20 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 3-30 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 3-50 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 3-80 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 3-100 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 5-10 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 5-20 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 5-30 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 5-50 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 5-80 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 5-100 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 10-20 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 10-30 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 10-80 mg/dosis. En otra realización, la dosificación es 10-100 mg/dosis.
- En otra realización, la dosificación es una dosis diaria. En otra realización, la dosificación es una dosis semanal. En otra realización, la dosificación es una dosis mensual. En otra realización, la dosificación es una dosis anual. En otra realización, la dosis es una en una serie de un número definido de dosis. En otra realización, la dosis es una dosis única. Como se describe a continuación, en otra realización, una ventaja de las moléculas de ARN, oligorribonucleótidos o polirribonucleótidos del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención es su mayor potencia, permitiendo el uso de dosis más pequeñas.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para producir una proteína recombinante, que comprende poner en contacto un aparato de traducción *in vitro* con un oligorribonucleótido sintetizado *in vitro*, comprendiendo, el oligorribonucleótido sintetizado *in vitro*, una pseudouridina o un nucleósido modificado, produciendo, de este modo, una proteína recombinante.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para producir una proteína recombinante, que comprende poner en contacto un aparato de traducción *in vitro* con una molécula de ARN transcrita *in vitro* descrita en el presente documento, comprendiendo, la molécula de ARN transcrita *in vitro*, una pseudouridina o un nucleósido modificado, produciendo, de este modo, una proteína recombinante.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un aparato de transcripción *in vitro*, que comprende: un nucleótido no modificado, un nucleótido que contiene una pseudouridina o un nucleósido modificado y una polimerasa. En el presente documento se describe un kit de transcripción *in vitro*, que comprende: un nucleótido no modificado, un nucleótido que contiene una pseudouridina o un nucleósido modificado y una polimerasa. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

En otra divulgación, el aparato de traducción *in vitro* comprende un lisado de reticulocitos. En otra divulgación, el lisado de reticulocitos es un lisado de reticulocitos de conejo.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para reducir una inmunogenicidad de una molécula de oligorribonucleótido o una molécula de ARN, comprendiendo el método la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de oligorribonucleótido o de la molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, reduciendo, de este modo, una inmunogenicidad de una molécula de oligorribonucleótido o molécula de ARN.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para reducir una inmunogenicidad de un vector de terapia génica que comprende una molécula de polirribonucleótido o una molécula de ARN, comprendiendo el método la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de polirribonucleótido o de la molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, reduciendo, de este modo, una inmunogenicidad del vector de terapia génica.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para potenciar la traducción *in vitro* de una molécula de oligorribonucleótido o una molécula de ARN, comprendiendo el método la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de oligorribonucleótido o de la molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, potenciando, de este modo, la traducción *in vitro* a partir de una molécula de oligorribonucleótido o molécula de ARN.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para potenciar la traducción *in vivo* de un vector de terapia génica que comprende una molécula de polirribonucleótido o una molécula de ARN, comprendiendo el método la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de polirribonucleótido o de la molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, potenciando, de este modo, la traducción *in vivo* a partir de un vector de terapia génica.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para incrementar la eficacia en el suministro de una proteína recombinante mediante un vector de terapia génica que comprende una molécula de polirribonucleótido o una molécula de ARN, comprendiendo el método la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de polirribonucleótido o de la molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, incrementando, de este modo, la eficacia en el suministro de una proteína recombinante mediante un vector de terapia génica.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para aumentar la estabilidad *in vivo* de un vector de terapia génica que comprende una molécula de polirribonucleótido o una molécula de ARN, comprendiendo el método la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de polirribonucleótido o de la molécula de ARN con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, aumentando, de este modo, la estabilidad *in vivo* de un vector de terapia génica.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para sintetizar una molécula de ARN transcrita *in vitro* que comprende un nucleósido pseudouridina, que comprende poner en contacto una polimerasa aislada con una mezcla de nucleótidos no modificados y el nucleótido modificado (Ejemplos 2 y 7).

En otra divulgación, los métodos de transcripción *in vitro* de la presente solicitud utilizan un extracto de una célula animal. En otra divulgación, el extracto proviene de un reticulocito o célula con una eficacia de transcripción *in vitro* similar. En otra divulgación, el extracto proviene de cualquier otro tipo de célula conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para potenciar una respuesta inmunitaria a un antígeno,

que comprende administrar el antígeno en combinación con ARN mitocondrial (mt) (Ejemplos 1 y 5).

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para reducir la capacidad de una molécula de RNA para estimular una célula dendrítica (CD), que comprende modificar un nucleósido de la molécula de ARN mediante un método de la presente invención (Ejemplos).

En otra divulgación, la CD es una célula CD1. En otra divulgación, la CD es una célula CD2. En otra divulgación, la CD es un subtipo de una célula CD1 o una célula CD2. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para reducir la capacidad de una molécula de RNA para estimular la señalización por TLR3, que comprende modificar un nucleósido de la molécula de ARN mediante un método de la presente solicitud. En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para reducir la capacidad de una molécula de RNA para estimular la señalización por TLR7, que comprende modificar un nucleósido de la molécula de ARN mediante un método de la presente solicitud. En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para reducir la capacidad de una molécula de RNA para estimular la señalización por TLR8, que comprende modificar un nucleósido de la molécula de ARN mediante un método de la presente solicitud. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

En otra realización, todos los enlaces entre nucleótidos en el ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención son fosfodiéster. En otra realización, los enlaces entre nucleótidos son predominantemente fosfodiéster. En otra realización, la mayoría de los enlaces entre nucleótidos son fosforotioato. En otra realización, la mayoría de los enlaces entre nucleótidos son fosfodiéster. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el porcentaje de los enlaces entre nucleótidos que son fosfodiéster es superior al 50%. En otra realización, el porcentaje es superior al 10%. En otra realización, el porcentaje es superior al 15 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 20 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 25 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 30 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 35 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 40 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 45 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 55 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 60 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 65 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 70 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 75 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 80 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 85 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 90 %. En otra realización, el porcentaje es superior al 95 %.

En otra realización, un método de la presente invención comprende aumentar el número, porcentaje o frecuencia de nucleósidos modificados en la molécula de ARN mensajero para disminuir la inmunogenicidad o aumentar la eficacia de la traducción. El ARN mensajero comprende al menos pseudouridina o 1-metilpseudouridina. Como se proporciona en el presente documento, el número de restos modificados en un ARNm determina, en otra realización, la magnitud de los efectos observados en la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un uso o un ARNm para su uso de acuerdo con la invención para introducir una proteína recombinante en una célula de un sujeto, que comprende poner en contacto al sujeto con una molécula de ARN transcrita *in vitro* que codifica la proteína recombinante, comprendiendo además, la molécula de ARN transcrita *in vitro*, un nucleósido modificado como se especifica de acuerdo con la invención, introduciendo, de este modo, una proteína recombinante en una célula de un sujeto.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para disminuir la producción de TNF- $\alpha$  en respuesta a un vector de terapia génica en un sujeto, que comprende la etapa de diseñar el vector para que contenga una pseudouridina o una base de nucleósido modificada, disminuyendo, de este modo, la producción de TNF- $\alpha$  en respuesta a un vector de terapia génica en un sujeto.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para disminuir la producción de IL-12 en respuesta a un vector de terapia génica en un sujeto, que comprende la etapa de diseñar el vector para que contenga una pseudouridina o una base de nucleósido modificada, disminuyendo, de este modo, la producción de IL-12 en respuesta a un vector de terapia génica en un sujeto.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para reducir una inmunogenicidad de un vector de terapia génica, que comprende introducir un nucleósido modificado en dicho vector de terapia génica, reduciendo, de este modo, una inmunogenicidad del vector de terapia génica.

Como se proporciona en el presente documento, los hallazgos de la presente invención muestran que las CD primarias tienen una entidad de señalización de ARN adicional que reconoce el ARN modificado con m5C y m6A y cuya señalización se inhibe por la modificación de los restos de U.

En otra realización, una ventaja de un ARN mensajero del método de la invención, del uso de la invención o para su uso de acuerdo con la invención es que el ARN no se incorpora al genoma (a diferencia de los vectores basados en ADN). En otra realización, una ventaja es que la traducción del ARN y por lo tanto la apariencia del producto codificado, es instantánea. En otra realización, una ventaja es que la cantidad de proteína generada a partir del ARNm puede regularse suministrando más o menos ARN. En otra realización, una ventaja es que el suministro repetido de ARN no modificado podría inducir reacciones autoinmunitarias.

Una ventaja es la falta de inmunogenicidad, que permite el suministro repetido sin generación de citocinas inflamatorias.

En otra realización, la estabilidad del ARNm aumenta con la circularización, disminuyendo la degradación por exonucleasas.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para tratar a un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio, que comprende administrar al sujeto un antagonista de una molécula de TLR-3, tratando, de este modo, a un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para tratar a un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio, que comprende administrar al sujeto un antagonista de una molécula de TLR-7, tratando, de este modo, a un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método para tratar a un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio, que comprende administrar al sujeto un antagonista de una molécula de TLR-8, tratando, de este modo, a un sujeto con una enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio.

En otra divulgación, la enfermedad que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio es una enfermedad autoinmunitaria. En otra divulgación, la enfermedad es lupus eritematoso sistémico (LES). En otra divulgación, la enfermedad es otra enfermedad conocida en la técnica que comprende una respuesta inmunitaria contra una molécula de ARN propio. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un kit que comprende un reactivo utilizado en la realización de un método de la presente invención. En otra divulgación, la presente solicitud divulga un kit que comprende una composición, herramienta o instrumento de la presente divulgación.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un kit para medir o estudiar la señalización por un receptor TLR3, TLR7 y TLR8, como se ejemplifica en el Ejemplo 4.

En otra realización, un protocolo de tratamiento de la presente invención es terapéutico. En otra realización, el protocolo es profiláctico. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En una realización, la oración "poner en contacto con una célula" o "poner en contacto con una población" se refiere a un método de exposición, que puede ser directo o indirecto. En un método, dicho contacto comprende la inyección directa de la célula a través de cualquier medio bien conocido en la técnica, tal como microinyección. En otra realización, el suministro a la célula es indirecto, tal como a través de la provisión en un medio de cultivo que rodea la célula o la administración a un sujeto o por cualquier vía conocida en la técnica. En otra realización, la expresión "poner en contacto" significa que la molécula de la presente invención se introduce en un sujeto que recibe tratamiento y se permite que la molécula entre en contacto con la célula *in vivo*. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

Los métodos para la cuantificación de la frecuencia de reticulocitos y para medir la actividad biológica de EPO son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ramos, AS et al (Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. Braz J Med Biol Res 36:1561).

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un sujeto, en otra realización, por cualquier método conocido por un experto en la materia, tal como por vía parenteral, paracanceral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intravaginal o intratumoral.

En otra realización de los métodos y composiciones de la presente invención, las composiciones se administran por vía oral y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración oral, es decir, como un sólido o una preparación líquida. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, microgránulos y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra realización de la presente invención, el principio

activo se formula en una cápsula. De acuerdo con esta realización, las composiciones de la presente invención comprenden, además del compuesto activo y el transportador o diluyente inerte, una cápsula de gelificación dura.

5 En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran mediante inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.

15 En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía tópica a las superficies corporales y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, pomadas, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, las composiciones o sus derivados fisiológicamente tolerados se preparan y aplican como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un transportador farmacéutico.

20 En otra realización, la composición se administra como un supositorio, por ejemplo, un supositorio rectal o un supositorio uretral. En otra realización, la composición farmacéutica se administra por implantación subcutánea de un microgránulo. En otra realización, el microgránulo proporciona una liberación controlada de agente durante un período de tiempo.

25 En otra realización, el compuesto activo se suministra en una vesícula, por ejemplo, un liposoma (véase Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pág. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pág. 317-327; véase de manera general *ibid.*).

30 Como se usa en el presente documento, los "transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables" son bien conocidos por los expertos en la materia. El transportador o diluyente puede ser, en diversas realizaciones, un transportador sólido o diluyente para formulaciones sólidas, un transportador líquido o diluyente para formulaciones líquidas o mezclas de los mismos.

35 En otra realización, transportadores sólidos/diluyentes incluyen, pero sin limitación, una goma, un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón pregelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa, dextrosa), un material celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina), un acrilato (por ejemplo, polimetilacrilato), carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco o mezclas de los mismos.

40 En otras realizaciones, los transportadores farmacéuticamente aceptables para formulaciones líquidas pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los transportadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medios salinos y tamponados. Ejemplos de aceites son aquellos de aceite, animal, vegetal o de origen sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol o aceite de hígado de pescado.

45 Los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular) incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactados y aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos tal como los que se basan en la dextrosa de Ringer y similares. Son ejemplos líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas y los glicoles tal como los propilenglicoles o polietilenglicol son los transportadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Ejemplos de aceites son aquellos de aceite, animal, vegetal o de origen sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol o aceite de hígado de pescado.

50 En otra realización, las composiciones comprenden además aglutinantes (por ejemplo, acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma guar, glicolato sódico de almidón), tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de diversos pH y fuerza iónica, aditivos tal como albúmina o gelatina para prevenir la absorción a las superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de proteasas, tensioactivos (por ejemplo, laurilsulfato de sodio), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, Timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por

ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, laurilsulfato sódico), adyuvantes de flujo (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato sódico), recubrimientos de polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son composiciones de liberación controlada, es decir, composiciones en las que el compuesto se libera durante un período de tiempo después de la administración. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). En otra realización, la composición es una composición de liberación inmediata, es decir, una composición en la que todo el compuesto se libera inmediatamente después de la administración.

En otra realización, las moléculas para su uso en los métodos y usos médicos de la presente invención se modifican mediante la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina. Se sabe que los compuestos modificados muestran semividas sustancialmente más largas en la sangre después de la inyección intravenosa que los compuestos no modificados correspondientes (Abuchowski et al., 1981; Newmark et al., 1982; y Katre et al., 1987). Dichas modificaciones también aumentan, en otra realización, la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminan la agregación, potencian la estabilidad física y química del compuesto y reducen en gran medida la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. Como resultado, la actividad biológica deseada *in vivo* se puede lograr mediante la administración de tales aductos de polímero-compuesto con menos frecuencia o en dosis más bajas que con el compuesto no modificado.

Un componente activo, en otro ejemplo, se formula en la composición como formas de sal farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido o molécula de anticuerpo), que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro y base orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina y similares.

## **SECCIÓN DE DETALLES EXPERIMENTALES**

### **EJEMPLO 1: LAS MOLECULAS DE ARN DE ORIGEN NATURAL MUESTRAN HABILIDADES DIFERENCIALES PARA ACTIVAR CÉLULAS DENDRITICAS**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

##### ***Plásmidos y Reactivos***

Los plásmidos pT7T3D-MART-1 y pUNO-hTLR3 se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA) e InvivoGen (San Diego, CA), respectivamente. pTEVluc se obtuvo del Dr. Daniel Gallie (UC Riverside), contiene pT7-TEV (la secuencia líder del ARN genómico del virus del grabado de tabaco)-luciferasa-A50, y se describe en Gallie, DR et al, 1995. The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. Gene 165:233) pSVren se generó a partir de p2luc (Grentzmann G, Ingram JA, et al, A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. RNA 1998;4(4): 479-86) mediante la eliminación de la secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga con digestiones, relleno de extremos y religación con BamHI y NotI.

El ARNip específico de TLR3 humano, pTLR3-hc se construyó mediante la inserción de ODN sintético que codifica el ARNhc con una homología de 20 nt de longitud con el TLR3 humano (nt 703-722, acceso: NM\_003265) en el plásmido pSilencer 4.1-CMV-neo (Ambion, Austin, TX). pCMV-hTLR3 se obtuvo por primera clonación del producto de PCR específico de hTLR3 (nt 80-2887; Acceso NM\_003265) en pCRII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), a continuación, se liberó con Nhe I-Hind III cortando y subclonando en los sitios correspondientes de pcDNA3.1 (Invitrogen). LPS (E. coli 055: B5) se obtuvo de Sigma Chemical Co, St. Louis, MO. CpG ODN-2006 y R-848 se obtuvieron de InvivoGen.

##### ***Células y Cultivo celular***

Las células 293 de riñón embrionarias humanas (ATCC) se propagaron en DMEM suplementado con glutamina (Invitrogen) y FCS al 10% (Hyclone, Ogden, UT) (medio completo). En todos los casos en el presente documento, "células 293" se refiere a células 293 de riñón embrionarias humanas (HEK). La línea celular 293-hTLR3 se generó transformando células 293 con pUNO-hTLR3. Las líneas celulares 293-hTLR7, 293-hTLR8 y 293-hTLR9 (InvivoGen) se hicieron crecer en medio completo suplementado con blasticidina (10 µg/ml) (Invivogen). Las líneas celulares 293-ELAM-luc y TLR7-293 (M. Lamphier, Eisai Research Institute, Andover MA) y TLR3-293 se cultivaron como se describe (Kariko et al, 2004, mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. J Biol Chem 279: 12542-12550).

Las líneas celulares 293, 293-hTLR7 y 293-hTLR8 se transfectaron de manera estable con pTLR3-hc y se seleccionaron con G-418 (400 µg/ml) (Invitrogen). Las colonias neorresistentes se examinaron y solo aquellas que no expresaron TLR3, determinadas como carentes de secreción de IL-8 en respuesta a poli (I):( C), se utilizaron en estudios adicionales. Las muestras de leucoféresis se obtuvieron de voluntarios no infectados por el VIH a través de un protocolo aprobado por el IRB.

### **Generación de CD murinas**

Las CD murinas se generaron recolectando células de la médula ósea de la tibia y fémures de ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad y lisando los glóbulos rojos. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a  $10^6$  células/pocillo en 2 ml de DMEM + FCS al 10% y 20 ng/ml de muGM-CSF (R & D Systems). En el día 3, se añadieron 2 ml de medio nuevo con muGM-CSF. En el día 6, se recogieron 2 ml de medio/pocillo y las células se sedimentaron y se resuspendieron en medio nuevo con muGM-CSF. En el día 7 del cultivo, se recogieron las CDmu y se lavaron.

### **ARN Natural**

Las mitocondrias se aislaron de plaquetas obtenidas del Banco de Sangre de la Universidad de Pensilvania utilizando un procedimiento de fraccionamiento por lisis (kit de aislamiento de mitocondrias; Pierce, Rockford, IL). El ARN se aisló de las mitocondrias purificadas, de las fracciones citoplásmicas y nucleares de las células 293, de las células 293 no fraccionadas, de hígado de ratas, de la línea celular de ratón TUBO y de la cepa DH5 alfa de *E. coli* por Master Blaster® (BioRad, Hercules, CA). El ARNt bovino, ARNt de trigo, ARNt de levadura, ARNt de *E. coli*, poli (A) + ARNm de corazón de ratón y poli (I):( C) se adquirieron de Sigma, el ARN total de bazo humano y el ARN de *E. coli* RNA se adquirieron de Ambion. Los oligorribonucleótidos-5'-monofosfatos se sintetizaron químicamente (Dharmacon, Lafayette, CO). Se incubaron partes alícuotas de muestras de ARN en presencia de la nucleasa Benzonase (1 U por 5 µl de ARN a 1 microgramo por microlitro (µg/µl) durante 1 h) (Novagen, Madison, WI). Las alícuotas de ARN-730 se digirieron con fosfatasa alcalina (New England Biolabs).

Las muestras de ARN se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida desnaturizante para garantizar la calidad. Los análisis para LPS en preparaciones de ARN que utilizan el análisis de coágulos de gel de lisado de amebocitos de *Limulus* fueron negativos con una sensibilidad de 3 picogramos por mililitro (pg/ml) (Universidad de Pensilvania, Core Facility).

### **Análisis mediante HPLC**

Los monofosfatos de nucleósido se separaron y se visualizaron mediante HPLC. Para liberar los nucleósidos 3'-monofosfatos libres, se digirieron 5 µg de alícuotas de ARN con 0,1 U de RNasa T2 (Invitrogen) en 10 µl de NaOAc 50 mM y tampón de EDTA 2 mM (pH 4,5) durante la noche, a continuación, las muestras se inyectaron en un Agilent 1100 HPLC usando una columna Waters Symmetry C18 (Waters, Milford, MA). A un caudal de 1 ml/min, se aplicó un gradiente de 100% de tampón A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM y fosfato de tetraetilamonio 10 mM [reactivo PicA, Waters], pH 6,0) a 30% de tampón B (acetonitrilo) durante 60 minutos. Los nucleótidos se detectaron utilizando una matriz de fotodiodos a 254 nm. Las identidades fueron verificadas por tiempos de retención y espectros.

### **Análisis con células dendríticas**

Las células dendríticas en placas de 96 pocillos (aproximadamente  $1,1 \times 10^5$  células/pocillo) se trataron con R-848, Lipofectin® o Lipofectin®-ARN durante 1 h, a continuación, se cambió el medio. Al final de las 8 h (a menos que se indique lo contrario), las células se recogieron para el aislamiento de ARN o la citometría de flujo, mientras que el medio de cultivo recolectado se sometió a ELISA de citocinas. Los niveles de IL-12 (p70) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), IFN-α, TNF-α e IL-8 (Biosource International, Camarillo, CA) se midieron en sobrenadantes mediante ELISA sándwich. Los cultivos se realizaron por triplicado o cuadruplicado y se midieron por duplicado.

### **Análisis de transferencia Northern**

El ARN se aisló de las MDDC después de una incubación de 8 h posteriores al tratamiento como se describe anteriormente. Donde se indicó, las células se trataron con 2,5 µg/ml de cicloheximida (Sigma) 30 minutos antes de la estimulación y durante toda la duración de la incubación. Las muestras de ARN se procesaron y analizaron en transferencias Northern como se describe (Kariko et al, 2004, *ibid*) utilizando sondas de TNF-α y GAPDH humanas derivadas de plásmidos (pE4 y pHcGAP, respectivamente) obtenidas a partir de ATCC.

## **RESULTADOS**

Para determinar el potencial inmunoestimulante de diferentes subtipos de ARN celular, se aisló ARN de diferentes compartimentos subcelulares, es decir, citoplasma, núcleo y mitocondria. Estas fracciones de ARN, así como el ARN total, el ARNt y el ARNm seleccionado con cola poliA, todos provenientes de fuentes de mamíferos, se complejaron

con Lipofectin® y se agregaron a MDDC. Mientras que todo el ARN total, nuclear y citoplásmico de los mamíferos estimulaba las MDDC, como lo demuestra la secreción detectable de TNF- $\alpha$ , los niveles de TNF- $\alpha$  eran mucho más bajos que los inducidos por el ARNm sintetizado *in vitro* (Figura 1). Además, el ARNt de mamíferos no indujo ningún nivel detectable de TNF- $\alpha$ , mientras que el ARN mitocondrial (mt) indujo mucho más TNF- $\alpha$  que los otros subtipos de ARN de mamíferos. El ARN bacteriano total también fue un potente activador de MDDC; por el contrario, el ARNt bacteriano solamente indujo un bajo nivel de TNF- $\alpha$ . El ARNt de otras fuentes (levadura, germen de trigo, bovino) fue no estimulante. Se observaron resultados similares cuando se probó el ARN de otras fuentes de mamíferos. Cuando las muestras de ARN se digirieron con Benzonase, que escinde el ARNmc y el ARNbc, la señalización del ARN se eliminó en las MDDC, verificando que la secreción de TNF- $\alpha$  se debía al ARN en las preparaciones. Los potenciales de activación de los tipos de ARN probados mostraron una correlación inversa con el grado de modificación de nucleósidos. Se obtuvieron resultados similares en los experimentos descritos en este Ejemplo para ambos tipos de citocinas generadas por CD.

Estos hallazgos demuestran que la inmunogenicidad del ARN se ve afectada por el grado de modificación de los nucleósidos, con un mayor grado de modificación que tiende a disminuir la inmunogenicidad.

## **EJEMPLO 2: SÍNTESIS *IN VITRO* DE MOLÉCULAS DE ARN CON NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS**

### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

#### ***AR transcrito *in vitro****

Usando análisis de transcripción *in vitro* (kits MessageMachine y MegaScript; Ambion), se generaron los siguientes ARN largos mediante ARN polimerasa T7 (RNAP) como se describe (Kariko et al, 1998, Phosphate-enhanced transfection of cationic lipid-complexed mRNA and plasmid DNA. Biochim Biophys Acta 1369, 320-334) (Nota: los nombres de los moldes se indican entre paréntesis; el número en el nombre del ARN especifica la longitud): ARN-1866 (pTEVluc linealizado con Nde I) codifica luciferasa de luciérnaga y una cola de poliA de 50 nt de longitud.

ARN-1571 (pSVren linealizado con Ssp I) codifica luciferasa de Renilla. ARN-730 (pT7T3D-MART-1 linealizado con Hind III) codifica el antígeno de melanoma humano MART-1. ARN-713 (pT7T3D-MART-1 linealizado con EcoR I) corresponde a una secuencia antisentido de MART-1, ARN-497 (pCMV-hTLR3 linealizado con Bgl I I) codifica un fragmento 5' parcial de hTLR3. Las secuencias de las moléculas de ARN son las siguientes:

ARN-1866:

[illegible]

5 ARN-1571:

ggcuagccaccaugacuucgaaaguuuauugauccagacaaaaggaaacggau gauaacugguccgcaguggugggccagau  
uuaaacaauu gaau guucuugauu cauuaauuaauuuauuau gauuucagaaaaacau gcagaaaaugcu guuaauuuuu  
uacau gguaacgcggccucuucuuuuuau ggcgacau guuguccacauuu gagccaguagcgcgguguauuuauacc  
agaccuuauu gguauggggcaaaucaggcaaaucugguaau ggguucuuau agguuacuugaucauuacaauuau cuuacu

[illegible]

ARN-730:

gggaaauugggcccucgagggccaagaauucggcacgaggcacgcggccagccagcagacagaggacucucuaauaagggaagg  
uguccugugcccugacccuacaagaugccaagagaagaugcucacuucuaugguuaccccaagaagggggcacggccac  
ucuuacaccacggcugaagaggccgcuggggaucggcauccugacagugauccuggggagucuuacugcucaucggcgugu  
gguaauuguagaagacgaaauggauacagagccuugauggauaaaaagucuucauguuggcacucaaugugccuuaacaaga  
agaugcccacaagaagggguuugaucaucgggacagcaaagugucucuuaagagaaaaacugugaaccugugguucccaa  
ugcuccaccugcuuaugagaaacucucugcagaacagucaccaccaccuuauucaccuuuagagccagcgagacaccugag  
acaugcugaaaauuuuucucucacacuuuugcuugaauuuuauacagacaucaauuguuuccuuuuggaaugguguagg  
aaaaaugcaagccaucucuaauaauaagucaguguuaaaaauuuaguagguccgcuagcaguacuaaucaugugagggaaa  
ugaugagaaaauuuuuuuugggaaaacuccaucaauaaauguugcaaugcaugauaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaacugcgg  
ccgca (SEQ ID No: 3).

ARN-713.

[illegible]

uggaguuuuucccaauuaauuuucucaucauuuccucacaugauuaguacugcuagcggaccuacuaaaaauuuaacac  
 ugacuuauuuuuagagauggcuuugcauuuuuccuacaccauuccaaagggaacauuagaugucuguaaaaauucaagca  
 aaagugugagagaaaauaaauucagcaugucucagguugucucgcugggcucuuaaggugaaauaaggugggugggugacuuguu  
 ugcagagaguuucucauaagcaggugggagcauugggaaccacagguucacaguuuuuucucuugaagagacacuungcug  
 ucccgaugaucaaaacccuucuugugggcaucuucuuguuaaggcacauugagugccaacaugaagacuuuuauccaaua  
 ggcucuguauccauuucgucuucuacaauaccaacagccgaugagcaguaagacuccagggaucacugucaggaugccga  
 ucccagcggccucuucagccgugguguaagaguggccgugcccuucuugggguaaccauagaugaagugagcaucuuc  
 ucuuggcaucuuguaggguacagggcacaggacaccuuccuuaagagaguccucugucugcugggcugggccgcgugccuc  
 gugccgaauu (SEQ ID No: 4).

ARN-497:

ggggagaccaagcuggcuagcagucaaccaacagaaucaugagacagacuunugccuuguaucuacuunuggggggggccuu  
uugccuuuugggaugcugugugcauccuccaccaccaagugcacuguuagccaugaaguugcugacugcagccaccugaa  
guugacucagguacccgaugaucuaccacaaacauaacaguguugaaccuuacccauaaucacucagaagauuaccagc  
cgccaacuucacaagguauagccagcuaacuagcuuggauguaggauuuuacaccaucucaaaacuggagccagaauugu  
gccgaaacuuccauguuaaaaguuuugaaccuccagcacaaugagcuaucucaacuucugauaaaaaccuuugccuucu  
gcacgaauuugacugaacucaucauguccaacucaauccagaaaauuaaaaauaaucccuuugucaagcagaagaauu  
uaaucacauua (SEO ID No: 5).

Para obtener ARN modificado, la reacción de transcripción se ensambló con el reemplazo de uno (o dos) de los NTP básicos con el (los) trifosfato derivado(s) correspondiente(s) del nucleótido modificado 5-metilcitidina, 5-metiluridina, 2-tiouridina, N<sup>6</sup>-metiladenosina o pseudouridina (TriLink), San Diego, CA). En cada reacción de transcripción, los 4 nucleótidos o sus derivados estaban presentes a una concentración de 7,5 milimolar (mM). En los experimentos seleccionados, como se indica, también se incluyó el análogo de la caperuza m7GpppG 6 mM (New England BioLabs, Beverly, MA) para obtener el ARN protegido con caperuza. ORN5 y ORN6 se generaron utilizando moldes de oligodesoxinucleótidos de ADN y ARNP T7 (kit de construcción de ARNip Silencer®, Ambion).

## **RESULTADOS**

Para probar adicionalmente el efecto de las modificaciones de los nucleósidos sobre la inmunogenicidad, se desarrolló un sistema *in vitro* para producir moléculas de ARN con pseudouridina o nucleósidos modificados. Se realizaron reacciones de transcripción *in vitro* en las que 1 o 2 de los 4 nucleótidos trifosfato (NTP) se sustituyeron con un NTP modificado con nucleósido correspondiente. Se transcribieron varios conjuntos de ARN con diferentes secuencias primarias que varían en longitud entre 0,7-1,9 kb, y que contienen ninguno, 1 o 2 tipos de nucleósidos modificados. Los ARN modificados fueron indistinguibles de sus homólogos no modificados en su movilidad en electroforesis con gel desnaturalizante, demostrando que estaban intactos y por lo tanto no modificados (Figura 2A). Este procedimiento funcionó de manera eficiente con cualquiera de las polimerasas de fago T7, SP6 y T3, y por lo tanto es generalizable a una amplia variedad de ARN polimerasas.

Estos hallazgos proporcionan un nuevo sistema *in vitro* para la producción de moléculas de ARN con nucleósidos modificados.

### EJEMPLO 3: EL ARN TRANSCRITO IN VITRO ESTIMULA EL TLR3 HUMANO, Y LAS MODIFICACIONES DE LOS NUCLEÓSIDOS REDUCEN LA INMUNOGENICIDAD DEL ARN

## MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Se sembraron células 293, 293-hTLR7 y 293-hTLR8 precursoras, que expresan todas ARNip específico de TLR3, y 293-hTLR9, TLR3-293 en placas de 96 pocillos ( $5 \times 10^4$  células/pocillo) y se cultivaron sin antibióticos. Al día siguiente, las células se expusieron a R-848 o ARN complejoado con Lipofectin® (Invitrogen) como se describe

(Kariko et al, 1998, *ibid*). El ARN se eliminó después de una hora (h) y las células se incubaron adicionalmente en medio completo durante 7 h. Los sobrenadantes se recogieron para la medición de IL-8.

## **RESULTADOS**

Para determinar si la modificación de los nucleósidos influye en la activación mediada por ARN de los TLR, se transformaron células 293 de riñón embrionario humano de manera estable para expresar TLR3 humano. Las líneas celulares se trataron con ARN complejo con Lipofectin®, y la activación de TLR se controló según lo indicado por la liberación de interleucina (IL)-8. Se probaron varias moléculas de ARN diferentes. El ARN transcrito *in vitro* no modificado provocó un alto nivel de secreción de IL-8. El ARN que contenía modificaciones de nucleósidos m6A o s2U, a diferencia, no indujo una secreción detectable de IL-8 (Figura 2B). Las otras modificaciones de nucleósidos probadas (es decir, m5C, m5U, Ψ y m5C/Ψ) tuvieron un efecto supresor menor en la estimulación de TLR3 (Figura 2B). "Ψ" se refiere a pseudouridina.

Por lo tanto, las modificaciones de nucleósidos tales como m6A s2U, m5C, m5U, Ψ, reducen la inmunogenicidad del ARN mediada por la señalización de TLR3.

### **EJEMPLO 4: EL ARN TRANSCRITO *IN VITRO* ESTIMULA TLR7 Y TLR8 HUMANOS, Y LAS MODIFICACIONES DE LOS NUCLEÓSIDOS REDUCEN LA INMUNOGENICIDAD DEL ARN**

Para probar la posibilidad de que 293 expresen TLR3 endógeno que interfiera con la evaluación de los efectos del ARN en receptores TLR específicos, se eliminó la expresión de TLR3 endógeno de la línea celular 293-TLR8 transfectando de manera estable las células con un plásmido que expresa el ARN (hc) de horquilla corta específico de TLR3 (también conocido como ARNip). Esta línea celular se usó para un estudio adicional, ya que no respondió a poli(I):( C), LPS y oligodesoxinucleótidos que contienen CpG (ODN), lo que indica la ausencia de TLR3, TLR4 y TLR9, pero respondió a R-848, el ligando afín de TLR8 humano (Figura 2B). Cuando las células 293-hTLR8 que expresaban ARNhc dirigido a TLR3 (células 293-hTLR8 ARNhc-TLR3) se transfecaron con ARN transcrito *in vitro*, secretaron grandes cantidades de IL-8. Por el contrario, el ARN que contenía la mayoría de las modificaciones de nucleósidos (m5C, m5U, Ψ y m5C/Ψ, s2U) eliminó la estimulación (no más producción de IL-8 que el control negativo, es decir, el vector vacío). La modificación con m6A tuvo un efecto variable, en algunos casos eliminando y en otros reduciendo la liberación de IL-8 (Figura 2B).

Los resultados de este Ejemplo y del Ejemplo anterior muestran que (a) el ARN con enlaces internucleotídicos fosfodiéster naturales (por ejemplo, ARN transcrito *in vitro*) estimula TLR3, TLR7 y TLR8 humanos; y (b) modificaciones con nucleósidos tales como m6A, m5C, m5U, s2U y Ψ, solas y en combinación, reducen la inmunogenicidad del ARN mediada por la señalización de TLR3, TLR7 y TLR8. Además, estos resultados proporcionan un nuevo sistema para estudiar la señalización por receptores TLR específicos.

### **EJEMPLO 5: LAS MODIFICACIONES DE NUCLEÓSIDOS REDUCEN LA INMUNOGENICIDAD DEL ARN MEDIADA POR LA SEÑALIZACIÓN DE TLR7 Y TLR8**

El siguiente conjunto de experimentos probó la capacidad del ARN aislado de fuentes naturales para estimular TLR3, TLR7 y TLR8. El ARN de diferentes especies de mamíferos se transfecó en las líneas celulares 293 que expresan TLR3, TLR7 y TLR8 descritas en el Ejemplo anterior. Ninguna de las muestras de ARN de mamíferos indujo la secreción de IL-8 por encima del nivel del control negativo. Por el contrario, el ARN bacteriano total obtenido de dos fuentes diferentes de *E. coli* indujo una fuerte secreción de IL-8 en células transfectadas con TLR3, TLR7 y TLR8, pero no con TLR9 (Figura 2C). Ni el LPS ni el ADN no metilado (CpG ODN) (los contaminantes potenciales en los aislados de ARN bacteriano) activaron el TLR3, el TLR7 o el TLR8 probados. El ARN mitocondrial aislado de plaquetas humanas estimuló a TLR8 humano, pero no a TLR3 ni a TLR7.

Estos resultados demuestran que el ARN transcrito *in vitro* no modificado y el bacteriano transcrito son activadores de TLR3, TLR7 y TLR8, y el ARN mitocondrial estimula a TLR8. Además, estos resultados confirman el hallazgo de que la modificación del nucleósidos del ARN disminuye su capacidad para estimular TLR3, TLR7 y TLR8.

### **EJEMPLO 6: LAS MODIFICACIONES DE LOS NUCLEÓSIDOS REDUCEN LA CAPACIDAD DEL ARN PARA INDUCIR LA SECRECIÓN DE CITOCINAS Y LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE ACTIVACIÓN POR DC**

## **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

### **Análisis de estimulación de CD**

Después de 20 h de incubación con ARN, las CD se tiñeron con mAb de CD83-ficoeritrina (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ), HLA-DR-Cy5PE y mAb de CD80 o CD86-isotiocianato de fluoresceína y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur® utilizando el software CellQuest® (BD Biosciences). Los sobrenadantes de cultivo celular se recogieron al final de una incubación de 20 h y se sometieron a un ELISA de citocinas. Los niveles de IL-12 (p70) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), IFN-α y TNF-α (Biosource International, Camarillo, CA) se

midieron en sobrenadantes mediante ELISA. Los cultivos se realizaron por triplicado o cuadruplicado y cada muestra se midió por duplicado.

## **RESULTADOS**

Los siguientes experimentos probaron la capacidad del ARN que contiene nucleósidos modificados o no modificados para estimular citocinas generadas por MDDC. Las modificaciones de los nucleósidos disminuyeron de forma reproducible la capacidad del ARN para inducir la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-12 tanto por MDDC generadas por GM-CSF/IL-4 como por MDDC generadas por (GM-CSF)/IFN- $\alpha$ , en la mayoría de los casos a niveles no mayor es que los del control negativo (Figuras 3A y B). Los resultados fueron similares cuando se probaron otros conjuntos de ARN con las mismas modificaciones de base pero diferentes secuencias primarias y longitudes, o cuando el ARN se modificó adicionalmente agregando una estructura de caperuza 5' y/o una cola poliA en el extremo 3' o eliminando el resto 5' trifosfato. Los ARN de diferente longitud y secuencia indujeron cantidades variables de TNF- $\alpha$  a partir de DC, generalmente menos de una diferencia de dos veces (Figura 3C).

A continuación, se realizó el análisis sobre CD1 y CD2 primarias. Las monocitoides (CD1, BDCA1 +) y plasmocitoides (CD2, BDCA4 +) primarios se purificaron a partir de sangre periférica. Ambos tipos de células produjeron TNF- $\alpha$  cuando se expusieron a R-848, pero solo las CD1 respondieron a poli(I):(C), a un nivel muy bajo, lo que indica una ausencia de actividad de TLR3 en CD2. La transfección de transcritos *in vitro* indujo la secreción de TNF- $\alpha$  tanto en CD1 como CD2, mientras que los transcritos modificados con m5U,  $\Psi$  o s2U no fueron estimulantes (Figura 3D). A diferencia de las citocinas generadas por CD, la modificación con m5C y m6A del ARN no disminuyó su capacidad estimulante en las CD1 y CD2 primarias. Los transcritos con doble modificación con m6A/ $\Psi$  no fueron estimulantes, mientras que una mezcla de moléculas de ARN con un solo tipo de modificación (m6A +  $\Psi$ ) fue un potente inductor de citocinas. Por lo tanto, la modificación con uridina ejerció un efecto supresor dominante sobre una molécula de ARN *en cis* en CD primarias. Estos resultados fueron consistentes entre todos los donantes evaluados.

Estos hallazgos muestran que el ARN transcrito *in vitro* estimula la producción de citocinas por CD. Además, debido a que CD2 no expresan TLR3 o TLR8, y la modificación con m5C y m6A del ARN disminuyó su capacidad estimulante de TLR7, estos hallazgos muestran que las CD primarias tienen una entidad de señalización de ARN adicional que reconoce el ARN modificado con m5C y m6A y cuya señalización se inhibe por modificación de restos de u.

Como indicadores adicionales de inmunogenicidad, se midieron la expresión en la superficie celular de moléculas CD80, CD83, CD86 y MHC de clase II y la secreción de TNF- $\alpha$  mediante análisis FACS de MDDC tratadas con ARN-1571 y sus versiones modificadas. La modificación del ARN con pseudouridina y nucleósidos modificados (m5C, m6A, s2U y m6A/ $\Psi$ ) disminuyó estos marcadores (Figura 4), lo que confirma los hallazgos anteriores.

En resumen, la capacidad del ARN para inducir a las CD a madurar y segregar citocinas depende del subtipo de CD así como de las características de la modificación de nucleósidos presente en el ARN. Una cantidad creciente de modificación disminuye la inmunogenicidad del ARN.

## **EJEMPLO 7: LA SUPRESIÓN DE LA ESTIMULACIÓN INMUNITARIA MEDIADA POR ARN ES PROPORCIONAL AL NÚMERO DE NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS PRESENTES EN ARN**

### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

#### ***CD humanas***

Para las citocinas generadas por CD, los monocitos se purificaron a partir de PBMC mediante centrifugación en gradiente de Percoll discontinua. La fracción de baja densidad (enriquecida en monocitos) se agotó de los linfocitos B, T y citolíticos naturales utilizando perlas magnéticas (Dynal, Lake Success, NY) específicas para CD2, CD16, CD19 y CD56, produciendo monocitos altamente purificados según lo determinado por citometría de flujo utilizando mAb anti-CD14 (> 95%) o anti-CD11c (> 98%).

Para generar CD inmaduras, los monocitos purificados se cultivaron en medio sin suero AIM V (Life Technologies), suplementado con GM-CSF (50 ng/ml) + IL-4 (100 ng/ml) (R & D Systems, Minneapolis, MN) en medio AIM V (Invitrogen) para la generación de CD derivadas de monocitos (MDDC) como se describe (Weissman, D et al, 2000. J Immunol 165: 4710-4717). Las CD también se generaron por tratamiento con GM-CSF (50 ng/ml) + IFN- $\alpha$  (1.000 U/ml) (R & D Systems) para obtener IFN- $\alpha$  MDDC (Santini et al., 2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity *in vitro* and in Hu-PBL-SCID mice. J Exp Med 191: 1777-178).

Las CD mieloides y plasmocitoides primarias (CD1 y CD2) se obtuvieron de la sangre periférica utilizando los kits de aislamiento de células BDCA-1 y BDCA-4 (Miltenyi Biotec Auburn, CA), respectivamente.

## RESULTADOS

La mayor parte del ARN modificado con nucleósidos utilizado hasta ahora contenía un tipo de modificación que se produce en aproximadamente el 25% del total de nucleótidos en el ARN (por ejemplo, todas las bases de uridina).

5 Para definir la frecuencia mínima de nucleósidos modificados particulares que es suficiente para reducir la inmunogenicidad en las condiciones utilizadas en el presente documento, se generaron moléculas de ARN con un número limitado de nucleósidos modificados. En el primer conjunto de experimentos, el ARN se transcribió *in vitro* en presencia de relaciones variables de m6A,  $\Psi$  o m5C con sus correspondientes NTP no modificados. Se esperaba que la cantidad de incorporación de nucleósido fosforilados modificados en el ARN fuera proporcional a la relación  
10 contenida en la reacción de transcripción, ya que los rendimientos de ARN obtenidos con ARNP T7 mostraron que la enzima utiliza los NTP de m6A,  $\Psi$  o m5C casi tan eficazmente como los NTP básicos. Para confirmar esta expectativa, el ARN transcrito en presencia de UTP:  $\Psi$  en una proporción de 50:50 se digirió y se encontró que contenía UMP y  $\Psi$  en una relación de casi 50:50 (Figura 5A).

15 Se transfectaron moléculas de ARN con un contenido de nucleósidos modificados en aumento en MDDC y se evaluó la secreción de TNF- $\alpha$ . Cada modificación (m6A,  $\Psi$  y m5C) inhibió la secreción de TNF- $\alpha$  proporcionalmente a la fracción de bases modificadas. Incluso las cantidades más pequeñas de bases modificadas analizadas (0,2-0,4%, correspondientes a 3-6 nucleósidos modificados por molécula de 1571 nt), fueron suficientes para inhibir de manera medible la secreción de citocinas (Figura 5B). El ARN con niveles de nucleósidos modificados de 1,7-3,2% (14-29 modificaciones por molécula) mostró una reducción del 50% en la inducción de la expresión de TNF- $\alpha$ . En las  
20 células 293 que expresan TLR, se requirió un mayor porcentaje (2,5%) de contenido de nucleósidos modificados para inhibir los eventos de señalización mediados por ARN.

25 Por lo tanto, la pseudouridina y los nucleósidos modificados reducen la inmunogenicidad de las moléculas de ARN, incluso cuando están presentes como una pequeña fracción de los restos.

En experimentos adicionales, se sintetizaron oligorribonucleótidos de 21 meros (ORN) con enlaces fosfodiéster entre nucleótidos donde los nucleósidos modificados (m5C, C o 2'-O-metil-U [Um]) se sustituyeron en una posición particular (Figura 6A). Si bien los ORN no modificados indujeron la secreción de TNF- $\alpha$ , este efecto se eliminó por la  
30 presencia de una modificación de un solo nucleósido (Figura 6B). Se obtuvieron resultados similares con células 293 transformadas con TLR-7 y TLR-8 que expresan ARNip dirigido a TLR3.

Los resultados anteriores se confirmaron midiendo los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$  en MDDC mediante análisis de transferencia Northern, utilizando tanto los ORN de 21 meros (ORN1) anteriores como los transcritos sintetizados *in vitro* de 31 meros (ORN5 y ORN6). Para amplificar la señal, se agregó cicloheximida, que bloquea la degradación de los ARNm seleccionados, a algunas muestras, como se indica en la figura. El ODN no modificado aumentó los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$ , mientras que los ORN que contenían un solo nucleósido modificado fueron  
35 significativamente menos estimulantes; ORN2-Um exhibió la mayor disminución de la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 6C).

40 Se observaron resultados similares en células RAW similares a macrófagos de ratón y en CD humanas.

En resumen, cada una de las modificaciones probadas (m6A, m5C, m5U, s2U,  $\Psi$  y 2'-O-metil) suprimieron la estimulación inmunitaria mediada por ARN, incluso cuando estaban presentes como una pequeña fracción de los  
45 restos. Se observó una supresión adicional cuando se incrementó la proporción de nucleósidos modificados.

### **EJEMPLO 8: LA MODIFICACIÓN CON PSEUDOURIDINA DEL ARN REDUCE SU INMUNOGENICIDAD *IN VIVO***

50 Para determinar el efecto de la modificación con pseudouridina sobre la inmunogenicidad del ARN *in vivo*, 0,25  $\mu$ g de ARN) se complejó con Lipofectin® y se inyectó por vía intratraqueal en ratones, los ratones se sangraron 24 h más tarde y se analizaron los niveles circulantes de TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  a partir de muestras de suero. El ARNm protegido con caperuza, modificado con pseudouridina, indujo significativamente menos ARNm de TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  que el que se obtuvo por el ARNm no modificado (Figura 7A-B).

55 Estos resultados proporcionan evidencia adicional de que el ARNm modificado con pseudouridina es significativamente menos inmunogénico *in vivo* que el ARN no modificado.

### **EJEMPLO 9: EL RNA QUE CONTIENE PSEUDOURIDINA MUESTRA UNA CAPACIDAD REDUCIDA PARA ACTIVAR PRK**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

##### ***Análisis de fosforilación de PKR***

65 Se incubaron partes alícuotas de agarosa con PKR activa (Upstate) en presencia de cóctel de magnesio/ATP (Upstate), mezcla de tampón de quinasa y ATP [ $\gamma$ - $^{32}$ P] y moléculas de ARN durante 30 min a 30 °C. Se

analizaron los ARN no modificados y los ARN con modificación de nucleósidos (m<sup>5</sup>C, pseudouridina, m<sup>6</sup>A, m<sup>5</sup>U) y ARNbc. Se añadió eIF2 $\alpha$  recombinante humano (BioSource), y las muestras se incubaron adicionalmente durante 5 min, 30 °C. Las reacciones se detuvieron agregando tampón de muestra NuPage LDS con reactivo reductor (Invitrogen), se desnaturalizaron durante 10 min, 70 °C y se analizaron en PAGE al 10%. Los geles se secaron y se expusieron a la película. Se utilizó heparina (1 U/ $\mu$ l), un activador de PKR, como control positivo.

## **RESULTADOS**

Para determinar si el ARNm que contiene pseudouridina activa la proteína quinasa dependiente de ARNbc (PKR), los análisis de fosforilación *in vitro* se realizaron utilizando PKR recombinante humana y su sustrato, eIF2 $\alpha$  (factor de iniciación eucariótico 2 alfa) en presencia de ARNm codificante de renilla protegido con caperuza (0,5 y 0,05 ng/ $\mu$ l). El ARNm que contenía pseudouridina ( $\Psi$ ) no activó PKR, como se detectó por la falta de autofosforilación de PKR y la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , mientras que el ARN sin modificación de nucleósidos y el ARNm con modificación con m<sup>5</sup>C activaron PKR (Figura 8). Por lo tanto, la modificación con pseudouridina disminuye la inmunogenicidad del ARN.

### **EJEMPLO 10: TRADUCCIÓN POTENCIADA DE PROTEÍNAS A PARTIR DE ARN QUE CONTIENE PSEUDOURIDINA Y m<sup>5</sup>C**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

##### ***Traducción in vitro de ARNm en lisado de reticulocitos de conejo***

Se realizó la traducción *in vitro* en lisado de reticulocitos de conejo (Promega, Madison WI). Una porción alícuota de 9  $\mu$ l del lisado se suplementó con 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g) de ARNm y se incubó durante 60 minutos a 30 °C. Se retiró un  $\mu$ l de alícuota para el análisis utilizando sistemas de análisis de luciérnaga y renilla (Promega, Madison WI) y un luminómetro LUMAT LB 950 (Berthold/EG & G Wallac, Gaithersburg, MD) con un tiempo de medición de 10 segundos.

## **RESULTADOS**

Para determinar el efecto de la modificación con pseudouridina sobre la eficacia de traducción del ARN *in vitro*, se incubó (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de ARNm no protegido con caperuza modificado con pseudouridina que codifica luciferasa de luciérnaga en lisado de reticulocitos de conejo durante 1 hora a 30 °C, y se determinó la actividad de luciferasa. El ARNm que contiene pseudouridina se tradujo más de 2 veces más eficazmente que el ARN sin pseudouridina en lisados de reticulocitos de conejo, pero no en extracto de trigo o lisado de *E. coli* (Figura 9), lo que demuestra que la modificación con pseudouridina aumenta la eficacia de traducción del ARN. Se obtuvieron resultados similares con ARN modificado con m<sup>5</sup>C. Cuando se añadió una cola de poliA al ARNm que contenía pseudouridina, se observó un aumento adicional de 10 veces en la eficacia de la traducción. (Ejemplo 10).

Por lo tanto, la modificación con pseudouridina y m<sup>5</sup>C aumenta la eficacia de traducción del ARN y la adición de una cola poliA al ARNm que contiene pseudouridina aumenta adicionalmente la eficacia de la traducción.

### **EJEMPLO 11: TRADUCCIÓN POTENCIADA DE PROTEÍNAS A PARTIR DE ARN QUE CONTIENE PSEUDOURIDINA EN CÉLULAS CULTIVADAS**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

##### ***Análisis de la traducción en células***

Se sembraron placas con 96 pocillos con 5 x 10<sup>4</sup> células por pocillo 1 día antes de la transfección. Los complejos de lipofectin®-ARNm se ensamblaron y se agregaron directamente a las monocapas celulares después de eliminar el medio de cultivo (0,2  $\mu$ g de ARNm-0,8  $\mu$ g de lipofectin en 50  $\mu$ l por pocillo). Las células se incubaron con la mezcla de transfección durante 1 hora a 37 °C, en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%, a continuación, la mezcla se reemplazó con medio nuevo precalentado que contenía FCS al 10% de FCS, a continuación, se analizaron las células como se describe en el Ejemplo anterior.

## **RESULTADOS**

Para determinar el efecto de la modificación con pseudouridina sobre la traducción del ARN en células cultivadas, Se transfectaron células 293 con ARNm protegido con caperuza, modificado con nucleósidos, transcrito *in vitro*, que codifica la proteína indicadora renilla. Las células se lisaron 3 h después del inicio de la transfección y se midieron los niveles de renilla se midieron mediante análisis enzimáticos. En células 293, el ADN modificado con pseudouridina y m<sup>5</sup>C se tradujo casi 10 veces y 4 veces más eficazmente, respectivamente, que el ARNm no modificado (Figura 10A).

A continuación, el experimento se realizó con CD primarias de ratón derivadas de la médula ósea, en este caso

lisando las células 3 h y 8 h después de la transfección. El ARN que contiene la modificación con pseudouridina se tradujo 15-30 veces más eficazmente que el ARN no modificado (Figura 10B).

Se obtuvieron resultados de expresión similares utilizando CD humanas y otras células primarias y líneas celulares establecidas, incluidas CHO y células RAW similares a macrófagos de ratón. En todos los tipos celulares, la modificación con pseudouridina produjo la mayor potenciación de las modificaciones probadas.

Por lo tanto, la modificación con pseudouridina incrementó la eficacia de la traducción del ARN en todos los tipos celulares analizados, incluidos los diferentes tipos de tanto células presentadoras de antígenos profesionales como células presentadoras de antígenos no profesionales, proporcionando evidencia adicional de que la modificación con pseudouridina aumenta la eficacia de la traducción del ARN.

#### **EJEMPLO 12: LOS ELEMENTOS 5' Y 3' POTENCIAN ADICIONALMENTE LA TRADUCCIÓN DEL ARNmΨ EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

Para probar el efecto de los elementos estructurales de ARN adicionales en la potenciación de la traducción por modificación con pseudouridina, se sintetizó un conjunto de ARNmΨ que codificaban luciferasa de luciérnaga que contenían combinaciones de las siguientes modificaciones: 1) una secuencia única no traducida 5' (TEV, un potenciador traduccional independiente de caperuza), 2) caperuza y 3) cola de poliA. Se evaluó la capacidad de estas modificaciones para potenciar la traducción del ARNmΨ o ARNm convencional (Figura 11A). Estos elementos estructurales potenciaron de forma aditiva la eficacia de la traducción tanto del ARNm convencional como del ARNmΨ, con el ARNmΨ que mostraba una mayor producción de proteínas de todas las construcciones.

La capacidad de expresión de proteínas a partir de la construcción de ARNmΨ de luciferasa de luciérnaga más eficaz, capTEVlucA50 (que contiene TEV, caperuza y una cola poli (A) extendida) se examinó a continuación durante 24 horas en células 293 (Figura 11B). El ARNmΨ produjo más proteína en cada punto de tiempo analizado y confirió una expresión de luciferasa más persistente que las construcciones de ARNm convencionales equivalentes, demostrando que las modificaciones con Ψ estabilizan el ARNm.

Para probar si la modificación con Ψ del ARNm mejoró la eficacia de la traducción en células de mamíferos *in situ*, se generaron construcciones de ARNΨ-caplacZ con o sin colas de poliA extendidas (A<sub>n</sub>) y que codificaban β-galactosidasa (lacZ) y se usaron para transfectar células 293. 24 h después del suministro del ARNm, se detectaron aumentos significativos en los niveles de β-galactosidasa por visualización de X-gal, tanto en caplacZ como en caplacZ-A<sub>n</sub>, en comparación con los correspondientes transcritos control (convencionales) (Figura 11C). Esta tendencia se observó cuando se analizó el número de células que expresaban niveles detectables de β-galactosidasa o la magnitud de la señal en células individuales.

#### **EJEMPLO 13: TRADUCCIÓN POTENCIADA DE PROTEÍNAS A PARTIR DE ARN QUE CONTIENE PSEUDOURIDINA IN VIVO**

##### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

##### ***Inyecciones de ARN intracerebrales***

Todos los procedimientos con animales se ajustaron a la Guía de NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y fueron aprobados por el institucional Animal Care and Use Committee. Se anestesiaron ratas Wistar macho (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso corporal). Las cabezas se colocaron en un marco estereotáxico y se hicieron bilateralmente ocho orificios de trépano de 1,5 mm de diámetro espaciados de manera uniforme [coordenadas relativas al bregma: anterior/posterior +3, 0, -3, -6 mm; lateral ± 2,5 mm] dejando intacta la duramadre. Las inyecciones intracerebrales se realizaron utilizando una jeringa de 25 μl (Hamilton, Reno, NV) con una aguja estéril de 1 pulgada de calibre 30, (Beckton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) que se fijó a un soporte de sonda grande y un brazo estereotáctico. Para evitar el espacio de aire en la jeringa, el centro de la aguja se llenó con 55 μl de complejo antes de colocar la aguja y el resto de la muestra se extrajo a través de la aguja. La profundidad de la inyección (2 mm) se determinó en relación con la superficie de la duramadre y se administraron 4 μl de complejo (32 ng de ARNm) en una única infusión rápida en bolo. 3 horas (h) más tarde, las ratas se sometieron a eutanasia con halotano y los cerebros se eliminaron en solución salina tamponada con fosfato enfriada.

##### ***Inyección de ARN en la vena de la cola de ratones***

Las venas de la cola de ratones BALB/c hembra (Charles River Laboratories) se inyectaron (bolos) con 60 μl de RNA complejado con Lipofectin® (0,26 μg). Los órganos se extrajeron y homogeneizaron en tampón de lisis de luciferasa o Renilla en tubos de microcentrífuga utilizando una mano de mortero. Los homogeneizados se centrifugaron y se analizaron los sobrenadantes para determinar su actividad.

### Suministro de ARN al pulmón

Se anestesiaron ratones BALB/c hembra usando ketamina (100 mg/kg) y xilasina (20 mg/kg). Se hicieron pequeñas incisiones en la piel adyacente a la tráquea. Cuando se expuso la tráquea, se instilaron 50 µl de ARN complejo con Lipofectin® (0,2 µg) en la tráquea hacia el pulmón. Se cerraron las incisiones y se permitió que los animales se recuperaran. 3 horas después del suministro de ARN, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los pulmones, se homogeneizaron en tampón de lisis de luciferasa o de Renilla (250 µl) y se analizaron para determinar su actividad. En un grupo diferente de animales, se recogieron muestras de sangre (100 µl/animal) de las venas de la cola, se coagularon y se centrifugaron. Las fracciones de suero se utilizaron para determinar los niveles de TNF e IFNα mediante ELISA como se describe en los Ejemplos anteriores, utilizando anticuerpos específicos de ratón.

### RESULTADOS

Para determinar el efecto de la modificación con pseudouridina sobre la traducción del ARN *in vivo*, a cada hemisferio de la corteza cerebral de las ratas se le inyectó un ARN modificado con pseudouridina que codifica renilla o un ARN no modificado protegidos con caperuza y se midió la traducción del ARN. El ARN modificado con pseudouridina se tradujo significativamente más eficazmente que el ARN no modificado (Figura 12A).

A continuación, se realizaron estudios de expresión en ratones. Los ARNm que codifican luciferasa de luciérnaga porque ninguna enzima endógena de mamífero interfiere con su detección. Los transcritos (no modificados y ARNmΨ) se construyeron con caperuza, TEV (capTEV<sub>50</sub>) y colas de poli(A) extendidas (-200 nt). Se inyectaron 0,25 µg de ARN complejo con Lipofectin® en ratones (intravenosa (i.v.) en la vena de la cola). Se examinó una variedad de órganos para determinar la actividad de la luciferasa para determinar el sitio de medición óptimo. La administración de 0,3 µg de ARNmΨ capTEVlucAn indujo una alta expresión de luciferasa en el bazo y una expresión moderada en la médula ósea, pero poca expresión en pulmón, hígado, corazón, riñón o cerebro (Figura 12B). En estudios posteriores, se estudiaron los bazos.

Se compararon, a continuación, las eficacias de traducción de ARNm convencional y ARNmΨ (0,015 mg/kg; 0,3 µg/animal administrado por vía intravenosa) en experimentos de curso temporal. La actividad de la luciferasa fue fácilmente detectable a 1 hora, alcanzó su punto máximo a las 4 horas y disminuyó a las 24 horas después de la administración de ARNm convencional o ARNmΨ, pero en todo momento fue sustancialmente mayor en animales que recibieron ARNmΨ (Figura 12C, panel izquierdo). A las 24 horas, solo los animales inyectados con ARNmΨ demostraron actividad de luciferasa esplénica detectable (4 veces por encima del fondo). Se obtuvo un patrón de expresión relativo similar (entre ARNm modificado y no modificado) cuando se inyectaron ARNm que codifican luciferasa de *Renilla* (capRen con o sin modificaciones con Ψ) en los animales en lugar de luciferasa de luciérnaga, o cuando se expusieron esplenocitos de ratón aislados a ARNm en cultivo.

En el siguiente experimento, se suministraron 0,25 µg de ARNm-Lipofectin® a los pulmones de ratones mediante inyección intratraqueal. El ARNm protegido con caperuza, modificado con pseudouridina se tradujo de manera más eficaz que el ARNm con caperuza sin modificación con pseudouridina (Figura 12D).

Por lo tanto, la modificación con pseudouridina aumenta la eficacia de la traducción del ARN *in vitro*, en células cultivadas e *in vivo* en múltiples modelos animales y por múltiples vías de administración, mostrando su aplicación generalizada como un medio para aumentar la eficacia de la traducción del ARN.

### EJEMPLO 14: LA MODIFICACIÓN CON PSEUDOURIDINA POTENCIA LA ESTABILIDAD DEL ARN *IN VIVO*

Los análisis Northern del ARN esplénico a la 1 y 4 h después de la inyección en los animales del Ejemplo anterior revelaron que los ARNm administrados, en sus formas intactas y parcialmente degradadas, eran fácilmente detectables (Figura 12C, panel derecho). Por el contrario, a las 24 horas, el ARNm capTEVlucAn no modificado estaba por debajo del nivel de detección, mientras que el ARNmΨ capTEVlucAn, aunque parcialmente degradado, todavía era claramente detectable. Por lo tanto, el ARNmΨ se conserva *in vivo* de forma más estable que el ARNm control.

Para probar si la producción de proteínas *in vivo* es cuantitativamente dependiente de la concentración de ARNm suministrado por vía intravenosa, los ARNm se administraron a ratones a 0,015-0,150 mg/kg (0,3-3,0 µg de capTEVlucAn por animal) y se analizaron los bazos 6 horas después, como se describe anteriormente. La expresión de la luciferasa se correlacionó cuantitativamente con la cantidad de ARN inyectado (Figura 13) y en cada concentración.

Estos hallazgos confirman los resultados del Ejemplo 12, que demuestran que el ARNmΨ es más estable que el ARN no modificado.

La inmunogenicidad adicional del ARNmΨ fue menor que la del ARN no modificado, como se describe en el presente documento anteriormente (Figura 7 y Figura 12C, panel derecho).

Para resumir los Ejemplos 13-14, las 3 ventajas del ARNm $\Psi$  en comparación con el ARNm convencional (traducción potenciada, estabilidad aumentada e inmunogenicidad reducida) observadas *in vitro* también se observan *in vivo*.

#### **EJEMPLO 15: EL ARNm $\Psi$ SUMINISTRADO A TRAVÉS DEL TRACTO RESPIRATORIO SE COMPORTA DE MANERA SIMILAR AL ARNm ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA**

Para probar la capacidad de ARNm $\Psi$  para suministrarse por inhalación, se suministraron ARNm complejados con Lipofectin® o PEI que codifican luciferasa de luciérnaga a ratones por vía intratraqueal, donde se colocó una aguja en la tráquea y se pulverizó la solución de ARNm en los pulmones. De manera similar a la administración intravenosa, se observó una expresión de luciferasa significativamente mayor con el ARNm $\Psi$  en comparación con el ARNm no modificado (Figura 14), aunque se produjo significativamente menos proteína con la vía intratraqueal en comparación con las vías intravenosas. El ARNm no modificado administrado por vía intratraqueal se asoció con concentraciones significativamente más altas de citocinas inflamatorias (IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ ) en comparación con los vehículos control, mientras que el ARNm $\Psi$  no (Figura 15).

Por lo tanto, El ARNm $\Psi$  puede suministrarse por inhalación sin activar la respuesta inmunitaria innata.

#### **EJEMPLO 16: SUMINISTRO DE ARNm $\Psi$ de EPO A CÉLULAS 293**

El ARNm $\Psi$  se generó a partir de un plásmido que contiene el ADNc de EPO humano. Cuando se transfectaron 0,25  $\mu$ g de ARNm $\Psi$  de EPO en  $10^6$  células 293 cultivadas, se produjeron más de 600 mU/ml de proteína EPO. Por lo tanto, las moléculas de ARN modificadas de la presente invención son eficaces para suministrar proteínas recombinantes a las células.

#### **EJEMPLO 17: PREPARACIÓN DE CONSTRUCCIONES MEJORADAS DE ARNm $\Psi$ QUE CODIFICAN EPO**

##### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

La secuencia codificante de EPO se clona utilizando técnicas de enzimas de restricción para generar 2 nuevos plásmidos, pTEV-EPO y pT7TS-EPO, que se utilizan como plantillas para la producción de ARNm $\Psi$  de EPO. Los ARNm $\Psi$  de EPO se producirán a partir de estas plantillas mediante transcripción *in vitro* (kits MessageMachine® y MegaScript®; Ambion), utilizando ARN polimerasa T7 (ARNP), incorporando nucleósidos en concentraciones equimolares (7,5 mM). Para incorporar las modificaciones de nucleósidos,  $\Psi$  trifosfato (TriLink, San Diego, CA) reemplaza a UTP en la reacción de transcripción. Para garantizar la protección con caperuza del ARNm $\Psi$ , también se incluye un análogo de caperuza no reversible, 3'-O-Me-m7GpppG 6 mM (New England BioLabs, Beverly, MA). Se añade a los ARNm $\Psi$  cola de poli(A) en una reacción de 1,5  $\mu$ g/ $\mu$ l de ARN, ATP 5 mM y 60 U/ $\mu$ l de poli(A) polimerasa de levadura (USB, Cleveland, OH) mezclados a 30 °C durante 3 a 24 h. Se evalúa calidad de los ARNm $\Psi$  mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante. También se realizan análisis para LPS en preparaciones de ARNm que utilizan el análisis de coágulos de gel de lisado de amebocitos de Limulus con una sensibilidad de 3 pg/ml.

##### **RESULTADOS**

La región no traducida 3' proximal (3'UTR) del ARNm $\Psi$  de EPO conserva un elemento estabilizador rico en pirimidina de -90 nt de largo del ARNm de EPO incipiente, que estabiliza el ARNm de EPO por asociación específica con una proteína ubicua, proteína de unión al ARNm de eritropoyetina (ERBP). Para maximizar la estabilidad del ARNm $\Psi$  de EPO, se incorporan 2 alteraciones en el plásmido EPO para mejorar la estabilidad y la eficacia de traducción del ARNm transcrito: 1) Una secuencia 5'UTR del virus del grabado del tabaco (TEV) se incorpora cadena arriba de la secuencia codificante de EPO para generar pTEV-EPO. 2) Se genera un plásmido, pT7TS-EPO, en el que el ADNc de EPO está flanqueado por secuencias correspondientes a la 5' y 3'UTR de  $\beta$ -globina.

Además, la longitud de la cola de poli (A) durante la producción de ARNm $\Psi$  a partir de estas plantillas de plásmidos se extiende, aumentando el período de incubación de la reacción de la poli(A) polimerasa. La cola poli (A) más larga disminuye la velocidad a la que el ARNm $\Psi$  se degrada durante la traducción.

Estas mejoras dan como resultado una eficacia de traducción *in vivo* potenciada, minimizando, así, la dosis terapéutica del producto final.

#### **EJEMPLO 18: ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE CONSTRUCCIONES DE ARNm DE EPO**

##### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

##### ***Preparación de células de mamíferos.***

Las células 293 de riñón embrionarias humanas (ATCC) se propagan en DMEM suplementado con glutamina

(Invitrogen) y FCS al 10% (Hyclone, Ogden, UT) (medio completo). Las muestras de leucoféresis se obtienen de voluntarios no infectados por el VIH a través de un protocolo aprobado por el IRB. Las CD se producen como se describe anteriormente y se cultivan con GM-CSF (50 ng/ml) + IL-4 (100 ng/ml) (R & D Systems) en medio AIM V® (Invitrogen).

Las células de bazo y CD murinas se obtienen por procedimientos publicados. En resumen, los bazos de ratones BALB/c se extraen asépticamente y se desmenuzan con pinzas en medio completo. Los fragmentos de tejido se sedimentan por gravedad y la suspensión de células sueltas se lava y se lisa con tampón de lisis AKC (Sigma). Las CD murinas derivan de células de la médula ósea recolectadas de fémures y tibia de ratones BALB/c de 6-9 semanas de edad. Las células se cultivan en DMEM que contiene un FCS al 10% (Invitrogen) y 50 ng/ml de muGM-CSF (R&D) y se usan el día 7.

#### ***Transfección de células y detección de EPO y citocinas proinflamatorias***

Las transfecciones se realizan con Lipofectin en presencia de tampón fosfato, un método de suministro eficaz para la expresión celular esplénica e *in vitro*. Se agrega ARNmΨ de EPO (0.25 µg/pocillo; 100.000 células) a cada tipo de célula por triplicado durante 1 hora, y el sobrenadante se reemplaza con medio nuevo. 24 horas más tarde, se recoge el sobrenadante para la medición mediante ELISA de EPO, IFN-α o β, y TNF-α.

## **RESULTADOS**

Para evaluar el impacto de las UTR únicas en la potenciación de la eficacia traduccional del ARNmΨ, se prueba el ARNmΨ de EPO que contiene o no contiene, cada mejora (elemento 5' TEV, 5' y 3'UTR de β-globina) con colas largas de poli(A) para determinar la producción de proteínas *in vitro* y la activación inmunitaria *in vitro*, con ellas. ARNm de nucleósidos convencionales de EPO se utiliza como control. La eficacia de la producción de proteínas de cada ARNm se evalúa en líneas celulares de mamíferos, (HEK293, CHO), CD primarias humanas y murinas y células de bazo para cada ARNm. Se evaluó la medición de la EPO total producida en todos los tipos celulares y la inmunogenicidad (citocinas proinflamatorias asociadas al sobrenadante) en células primarias. La construcción de ARNm que demuestra la combinación óptima de alta producción de EPO (en 1 o más tipos celulares) y baja obtención de citocinas se usa en estudios posteriores. Las mejoras en 5' y 3' UTR del ARNmΨ de EPO y las colas de poli(A) más largas dan como resultado una potenciación estimada de 2-10 veces en la eficacia de la traducción, sin un aumento en la inmunogenicidad.

### **EJEMPLO 19: CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EPO Y RESPUESTA BIOLÓGICA A ARNmΨ DE EPO IN VIVO**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

##### ***Administración de ARNmΨ de EPO a ratones.***

Todos los estudios rescritos en el presente documento se realizan de acuerdo con la Guía de NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y se aprueban por el Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Pennsylvania. Se anestesian ratones BALB/c hembra (n = 5 por condición experimental; de 6 semanas, 18-23 g; Charles River Laboratories) utilizando halotano al 3,5% en una mezcla de N<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> (70:30), a continuación se reduce el halotano a 1% y se mantiene la anestesia utilizando una máscara nasal. Las temperaturas corporales de los animales se mantienen durante todo el procedimiento utilizando una almohadilla térmica calentada a 37 °C. Los complejos ARNmΨ de EPO-lipofectin (construidos mezclando cantidades variables de ácido nucleico con 1 µl de lipofectin en 60 µl de volumen final se inyectan en la vena lateral de la cola). Las muestras de sangre se recogen 3 veces al día durante 3 días después de la inyección del ARNm durante el estudio de curso temporal, en un momento óptimo en los estudios de dosis-respuesta y diariamente desde los días 2-6 en los estudios para la reticulocitosis.

##### ***Determinación de reticulocitos mediante citometría de flujo.***

Las muestras de sangre completa se tiñen con el reactivo Retic-COUNT (BD Diagnostics) y los eventos de datos se adquieren en un citómetro de flujo FACScan. Los glóbulos rojos (RBC) se seleccionan por sus propiedades de dispersión frontal y lateral y se analizan para detectar la absorción de Naranja de Tiazol. Las células teñidas con el reactivo Retic-COUNT se detectan mediante fluorescencia y los reticulocitos se expresan como el porcentaje del total de RBC. Se cuentan al menos 50.000 eventos por muestra.

## **RESULTADOS**

Para optimizar la producción de proteína EPO humana biológicamente funcional (EPOh) en respuesta a un ARNm que codifica EPO, se realizan los siguientes estudios:

Curso temporal de la producción de EPO después de una inyección única de ARNmΨ de EPO. Tras la administración intravenosa de 1 µg de ARNmΨ de EPO, se mide la EPOh en serie desde 1-96 h después de la

administración de ARNm $\Psi$  de EPO por ELISA, para determinar la semivida de la proteína EPO en el suero. Esta semivida es un producto tanto de la semivida de la proteína EPO como de la semivida funcional del ARNm $\Psi$  de EPO. El momento óptimo resultante para medir la proteína EPO después de la administración de ARNm $\Psi$  de EPO se utiliza en estudios posteriores.

Dosis-respuesta de la producción de EPO después de una inyección única de ARNm $\Psi$  de EPO. Para determinar la correlación entre la cantidad de proteína EPO producida y la cantidad de ARNm $\Psi$  de EPO administrada, se administran concentraciones crecientes de ARNm $\Psi$  de EPO (0,01 a 1  $\mu$ g/animal) y se medirá EPO en el momento óptimo.

Relación entre la producción de EPOh y la reticulocitosis. Para medir el efecto del ARNm $\Psi$  de EPO en un correlato biológico de la actividad de EPO, se utiliza la citometría de flujo para determinar la frecuencia de reticulocitos en sangre. La citometría de flujo tiene un coeficiente de variación <3%. Los ratones reciben una dosis única de ARNm $\Psi$  de EPO y la sangre se extrae diariamente de los ratones desde los días 2-6. La relación entre la dosis de ARNm $\Psi$  de EPO y la frecuencia de reticulocitos se evalúa, a continuación, en el momento de la reticulocitosis máxima. La dosis de ARNm $\Psi$  de EPO que conduce a al menos un aumento del 5% en el recuento de reticulocitos se utiliza en estudios posteriores. Se obtienen concentraciones séricas de EPOh en ratones de aproximadamente 50 mU/ml y/o un aumento en la frecuencia de reticulocitos de aproximadamente el 5%.

## **EJEMPLO 20: MEDICIÓN DE LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS A ARNm $\Psi$ DE EPO IN VIVO**

### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

#### ***Detección de citocinas en el plasma.***

Las muestras de suero obtenidas de la sangre extraída en diferentes momentos durante y después de 7 administraciones diarias de ARNm complejo con lipofectin se analizan para IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 de ratón utilizando kits ELISA.

#### ***Análisis de transferencia Northern.***

Las partes alícuotas (2,0  $\mu$ g) de las muestras de ARN aisladas de bazo se separan mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturante al 1,4%, se transfieren a membranas cargadas (Schleicher y Schuell) y se hibridan en MiracleHyb® (Stratagene). Las membranas se sondaron para TNF- $\alpha$ , para moléculas de señalización de IFN cadena abajo (por ejemplo, IRF7, IL-12 p35 y p40, y GAPDH) y otros marcadores de activación inmunitaria. La especificidad de todas las sondas se confirma por secuenciación. Para sondar las membranas, se marcan 50 ng de ADN utilizando Redivue [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP® (Amersham) con un kit de etiquetado de cebado aleatorio (Roche). Las membranas hibridadas se exponen a la película Kodak BioMax MS utilizando una pantalla intensificadora MS a -70 °C.

#### ***Histopatología.***

Los bazos de ratones tratados con ARNm $\Psi$  de EPO y tratados con control positivo y negativo se recogen, se fijan, se seccionan, se tiñen con hematoxilina y eosina y se examinan por un patólogo veterinario para detectar signos de activación inmunitaria.

### **RESULTADOS**

Para confirmar la inmunogenicidad reducida de las moléculas de ARN de la presente invención, los ratones (n = 5) reciben dosis diarias de ARNm $\Psi$  de EPO durante 7 días, a continuación, se evalúan para detectar eventos adversos mediados por inmunidad, como lo indican las concentraciones séricas de citocinas, la expresión esplénica de los ARNm que codifican las proteínas inflamatorias y el examen patológico. Las dosis máximas administradas son 3  $\mu$ g o 5 veces la dosis única efectiva como se determina anteriormente. El ARNm no modificado y Lipofectin® solo se utilizan como controles positivos y negativos, respectivamente.

Los estudios confirman la inmunogenicidad reducida de las moléculas de ARN de la presente invención.

## **EJEMPLO 21: MEJORA ADICIONAL DE LOS MÉTODOS DE SUMINISTRO DEL ARNm $\Psi$ DE EPO**

#### ***Formación de complejos de nanopartículas.***

Las soluciones de polímeros y ARNm $\Psi$  se mezclan para formar complejos. Se prueban y optimizan varias condiciones de formulación: (1) los complejos de polietilenimina (PEI)/ARNm sub-22 nm se producen mediante la adición de 25 volúmenes de ARNm a 1 volumen de PEI en agua sin mezclar durante 15 minutos. (2) El poli-L-lisina-polietilenglicol similar a una barra (PLL-PEG) con dimensiones promedio de 12x150 nm se sintetiza mediante la adición lenta de 9 volúmenes de ARNm a 1 volumen de CK<sub>30</sub>-PEG<sub>10K</sub> en un tampón de contraión de acetato mientras

se agita con formación de vórtice. (3) Para la síntesis de un polímero portador de genes biodegradable, el anhídrido poliaspártico-co-etilenglicol (PAE) se sintetiza mediante policondensación de apertura de anillo de N-(Benciloxicarbonil)-L-anhídrido aspártico y etilenglicol. A continuación, la amina pendiente de ácido aspártico se desprotege y protona mediante acidificación con cloruro de hidrógeno y se condensa con ARNm. (4) Para la última generación de nanopartículas, se agrega una porción de alícuota CK<sub>30</sub>PEG<sub>10k</sub> en forma de acetato de amonio (1,25 ml; 6,4 mg/ml) a tubos Eppendorf siliconizados. A continuación, el ARNm se agrega lentamente a CK<sub>30</sub>PEG<sub>10k</sub> (2,5 mg en 11,25 ml de H<sub>2</sub>O sin RNasa) durante 1-2 minutos. Después de 15 minutos, se diluye 1: 2 en H<sub>2</sub>O sin RNasa.

#### ***Suministro intratraqueal.***

Los ratones se anestesian con halotano al 3% (70% de N<sub>2</sub>O + 30% de O<sub>2</sub>) en una cámara de anestesia y se mantienen con halotano al 1% (70% de N<sub>2</sub>O + 30% de O<sub>2</sub>) durante la operación utilizando un cono nasal. Se expone la tráquea y se infunden 50 µl de complejo de ARNm con 150 µl de aire en el pulmón a través de la tráquea utilizando una jeringa Hamilton de 250 µl (Hamilton, Reno, NV) con una aguja de 27 G 1/2".

### **RESULTADOS**

Para mejorar la eficacia del suministro y la expresión del ARNmΨ administrado por vía intratraqueal (i.t.), el ARNmΨ se encapsula en nanopartículas. El empaquetado en nanopartículas implica la condensación y la encapsulación del ADN (por ejemplo) en partículas que son más pequeñas que el poro de la membrana nuclear, utilizando productos químicos que incluyen poli-L-lisina y polietilenglicol. El ARN se empaqueta en 4 formulaciones diferentes de nanopartículas (PEI, PLL, PAE y CK<sub>30</sub>PEG<sub>10k</sub>) y la eficacia del suministro de ARNmΨ se compara con el ARNmΨ que codifica luciferasa (Luc-ARNm). Las cinéticas de suministro y la dosis-respuesta se caracterizan, a continuación, utilizando ARNmΨ de EPO.

#### **EJEMPLO 22: PREVENCIÓN DE LA REESTENOSIS MEDIANTE EL SUMINISTRO A LA ARTERIA CARÓTIDA DEL ARNm MODIFICADO QUE CODIFICA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO RECOMBINANTE**

### **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

#### ***Diseño experimental***

El ARN se administra a la arteria carótida de ratas mediante inyección intraarterial cerca del momento de la angioplastia con balón, después de lo cual se restablece el flujo sanguíneo. Las ratas se sacrifican 3 h después de la inyección, las secciones de la arteria carótida se extirpan, las células endoteliales vasculares se recogen y se homogeneizan y se determina la actividad de luciferasa como se describe en los Ejemplos anteriores.

### **RESULTADOS**

Se administra ARN modificado con pseudouridina que codifica la luciferasa en las arterias carótidas de las ratas. 3 horas más tarde, el ARN de luciferasa se puede detectar en el sitio de suministro pero no en los sitios adyacentes.

A continuación, este protocolo se usa para prevenir la reestenosis de un vaso sanguíneo después de la angioplastia con balón en un modelo de reestenosis animal, mediante el suministro de ARN modificado que codifica una proteína de choque térmico, p. ej. HSP70; un factor de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (V-EGF) o factor de crecimiento similar a la insulina (IGF); o una proteína que regula negativamente o antagoniza la señalización del factor de crecimiento. La administración de ARN modificado reduce la incidencia de reestenosis.

#### **EJEMPLO 23: TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE EL SUMINISTRO EN EL EPITELIO RESPIRATORIO DE MOLÉCULAS DE ARNm MODIFICADAS QUE CODIFICAN CFTR**

Se suministra el ARN modificado con pseudouridina o nucleósidos que codifica CFTR, tal como se describe en el Ejemplo 13, a los pulmones de un modelo animal de fibrosis quística y se evalúa su efecto sobre la enfermedad como se describe en Scholte BJ, et al. (Animal models of cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2004; 3 Suppl 2: 183-90) o Copreni E, et al, Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis. Gene Ther 2004; 11 Suppl 1: S67-75). La administración del ARN mejora la fibrosis quística.

En experimentos adicionales, las moléculas de ARNm modificadas de la presente invención se usan para suministrar a los pulmones otras proteínas recombinantes de valor terapéutico, p. ej., a través de un inhalador que suministra ARN.

**EJEMPLO 24: TRATAMIENTO DE XLA MEDIANTE EL SUMINISTRO A CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE MOLÉCULAS DE ARNm MODIFICADAS QUE CODIFICAN ADA**

Se suministra ARN modificado con pseudouridina o nucleósidos que codifica ADA a células hematopoyéticas de un modelo animal de agammaglobulinemia ligada a X y se evalúa su efecto sobre la enfermedad como se describe en Tanaka M, Gunawan F, et al, Inhibition of heart transplant injury and graft coronary artery disease after prolonged organ ischemia by selective protein kinase C regulators. J Thorac Cardiovasc Surg 2005;129(5): 1160-7) o Zonta S, Lovisetto F, et al, Ureteroneocystostomy in a swine model of kidney transplantation: a new technique. J Surg Res. 2005 Apr;124(2):250-5). Se descubre que la administración del ARN mejora la XLA.

**EJEMPLO 25: PREVENCIÓN DEL RECHAZO DE ÓRGANOS MEDIANTE EL SUMINISTRO EN UN SITIO DE TRASPLANTE DE MOLÉCULAS DE ARNm MODIFICADAS QUE CODIFICAN PROTEÍNAS INMUNOMODULADORAS**

El ARN modificado con pseudouridina o nucleósidos que codifica una citocina, una quimiocina o un interferón (por ejemplo, IL-4, IL-13, IL-10 o TGF- $\beta$ ) se suministra en el sitio de trasplante de un modelo animal de rechazo de trasplante de órganos y se evalúa su efecto sobre la incidencia de rechazo como se describe en Yu PW, Tabuchi R S et al, Sustained correction of B-cell development and function in a murine model of X-linked agammaglobulinemia (XLA) using retroviral-mediated gene transfer. Blood. 2004 104(5): 1281-90) o Satoh M, Mizutani A et al, X-linked immunodeficient mice spontaneously produce lupus-related anti-RNA helicase A autoantibodies, but are resistant to pristane-induced lupus. Int Immunol 2003, 15(9): 1117-24). La administración de ARN reduce la incidencia de rechazo de órganos.

**EJEMPLO 26: TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE NIEMANN-PICK, MUCOPOLISACARIDOSIS Y OTROS ERRORES METABÓLICOS CONGÉNITOS MEDIANTE EL SUMINISTRO DE ARNm MODIFICADO A LOS TEJIDOS CORPORALES**

El ARN modificado con pseudouridina o nucleósidos que codifica esfingomielinasa se suministra al pulmón, cerebro u otro tejido de los modelos animales tipo A y B de la enfermedad de Niemann-Pick y se evalúa su efecto sobre la enfermedad como se describe en Passini MA, Macauley SL, et al, AAV vector-mediated correction of brain pathology in a mouse model of Niemann-Pick A disease. Mol Ther 2005; 11(5): 754-62) o Buccoliero R, Ginzburg L, et al, Elevation of lung surfactant phosphatidylcholine in mouse models of Sandhoff and of Niemann-Pick A disease. J Inherit Metab Dis 2004;27(5): 641-8). Se descubre que la administración del ARN mejora la enfermedad.

El ARN modificado con pseudouridina o nucleósidos que codifica alfa-L-idurodinasa, iduronato-2-sulfatasa o enzimas relacionadas se suministra a los tejidos corporales de un modelo animal de mucopolisacaridosis y se evalúa su efecto sobre la enfermedad como se describe en Simonaro CM, D'Angelo M, et al, Joint and bone disease in mucopolysaccharidoses VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models. Pediatr Res 2005;57(5 Pt 1): 701-7) o McGlynn R, Dobrenis K, et al, Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. J Comp Neurol 2004 20;480(4): 415-26). La administración del ARN mejora la enfermedad.

En experimentos adicionales, las moléculas de ARNm modificadas de la presente invención se usan para proporcionar factores de coagulación (por ejemplo, para hemofílicos).

En experimentos adicionales, las moléculas de ARNm modificadas de la presente invención se usan para proporcionar ácido-b-glucosidasa para tratar la enfermedad de Gaucher.

En experimentos adicionales, las moléculas de ARNm modificadas de la presente invención se usan para proporcionar alfa-galactosidasa A para tratar la enfermedad de Fabry.

En experimentos adicionales, las moléculas de ARNm modificadas de la presente invención se usan para proporcionar citocinas para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

En experimentos adicionales, las moléculas de ARNm modificadas de la presente invención se usan para corregir otros errores congénitos del metabolismo, mediante la administración de moléculas de ARNm que codifican, p. ej. ABCA4; ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; APOA2; AVSD1; BRCD2; C1QA; C1QB; C1QG; C8A; C8B; CACNA1S; CCV; CD3Z; CDC2L1; CHML; CHS1; CIAS1; CLCNKB; CMD1A; CMH2; CMM; COL11A1; COL8A2; COL9A2; CPT2; CRB1; CSE; CSF3R; CTPA; CTSK; DBT; DIO1; DISC1; DPYD; EKV; ENO1; ENO1P; EPB41; EPHX1; F13B; F5; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FCHL; FH; FMO3; FMO4; FUCA1; FY; GALE; GBA; GFND; GJA8; GJB3; GLC3B; HF1; HMGCL; HPC1; HRD; HRPT2; HSD3B2; HSPG2; KCNQ4; KCS; KIF1B; LAMB3; LAMC2; LGMD1B; LMNA; LOR; MCKD1; MCL1; MPZ; MTHFR; MTR; MUTYH; MYOC; NB; NCF2; NEM1; NPHS2; NPPA; NRAS; NTRK1; OPTA2; PBX1; PCHC; PGD; PHA2A; PHGDH; PKLR; PKP1; PLA2G2A; PLOD; PPOX; PPT1; PRCC; PRG4; PSEN2; PTOS1; REN; RFX5; RHD; RMD1; RPE65; SCCD; SERPINC1; SJS1; SLC19A2; SLC2A1; SPG23; SPTA1; TALI; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A; VMGLOM; VWS; WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACP1; AGXT; AHRH; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS;

BMPR2; CHRNA1; CMCWTD; CNGA3; COL3A1; COL4A3; COL4A4; COL6A3; CPS1; CRYGA; CRYGEP1;  
 CYP1B1; CYP27A1; DBI; DES; DYSF; EDAR; EFEMP1; EIF2AK3; ERCC3; FSHR; GINGF; GLC1B; GPD2; GYPC;  
 HADHA; HADHB; HOXD13; HPE2; IGKC; IHH; IRS1; ITGA6; KHK; KYNU; LCT; LHCGR; LSFC; MSH2; MSH6; NEB;  
 NMTC; NPHP1; PAFAH1P1; PAX3; PAX8; PMS1; PNKD; PPH1; PROC; REG1A; SAG; SFTPB; SLC11A1; SLC3A1;  
 5 SOS1; SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFXH1B; ACAA1; AGS1;  
 AGTR1; AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTD; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP;  
 CPO; CRV; CTNNB1; DEM; ETM1; FANCD2; FIH; FOXL2; GBE1; GLB1; GLC1C; GNAI2; GNAT1; GP9; GPX1;  
 HGD; HRG; ITIH1; KNG; LPP; LRS1; MCCC1; MDS1; MHS4; MITF; MLH1; MYL3; MYMY; OPA1; P2RY12; PBXP1;  
 PCCB; POU1F1; PPARG; PROS1; PTHR1; RCA1; RHO; SCA7; SCLC1; SCN5A; SI; SLC25A20; SLC2A2; TF;  
 10 TGFB2; THPO; THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS; UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A; XPC; ZNF35; ADH1B;  
 ADH1C; AFP; AGA; AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTDP2; ELONG; ENAM; ETFDH;  
 EVC; F11; FABP2; FGA; FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC; GNPTA; GNRHR; GYPA; HCA; HCL2; HD; HTN3;  
 HVBS6; IDUA; IF; JPD; KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2; MSX1; MTP; NR3C2; PBT; PDE6B; PEE1; PITX2;  
 15 PKD2; QDPR; SGC; SLC25A4; SNCA; SOD3; STATH; TAPVR1; TYS; WBS2; WFS1; WHCR; ADAMTS2; ADRB2;  
 AMCN; AP3B1; APC; ARSB; B4GALT7; BHR1; C6; C7; CCAL2; CKN1; CMDJ; CRHBP; CSF1R; DHFR; DIAPH1;  
 DTR; EOS; EPD; ERVR; F12; FBN2; GDNF; GHR; GLRA1; GM2A; HEXB; HSD17B4; ITGA2; KFS; LGMD1A; LOX;  
 LTC4S; MAN2A1; MCC; MCCC2; MSH3; MSX2; NR3C1; PCSK1; PDE6A; PFB; RASA1; SCZD1; SDHA; SGCD;  
 SLC22A5; SLC26A2; SLC6A3; SM1; SMA@; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFB; ALDH5A1; ARG1;  
 AS; ASSP2; BCKDHB; BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1; COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1; ELOVL4; EPM2A;  
 20 ESR1; EYA4; F13A1; FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR; GSE; HCR; HFE; HLA-A; HLA-DPB1; HLA-DRA;  
 HPFH; ICS1; IDDM1; IFNGR1; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCS1; MUT; MYB;  
 NEU1; NKS1; NYS2; OA3; ODD; OFC1; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1; PLA2G7;  
 PLG; POLH; PPAC; PSORS1; PUJO; RCD1; RDS; RHAG; RP14; RUNX2; RWS; SCA1; SCZD3; SIASD; SOD2;  
 ST8; TAP1; TAP2; TFAP2B; TNDM; TNF; TPBG; TPMT; TULP1; WISP3; AASS; ABCB1; ABCB4; ACHE; AQP1;  
 25 ASL; ASNS; AUTS1; BPGM; BRAF; C7orf2; CACNA2D1; CCM1 CD36; CFTR; CORDOMA; CLCN1; CMH6; CMT2D;  
 COL1A2; CRS; CYMD; DFNA5; DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1 FKBP6; GCK; GHRHR; GHS; GLI3; GPDS1;  
 GUSB; HLXB9; HOXA13; HPFH2; HRX; IAB; IMMP2L; KCNH2; LAMB1 LEP; MET; NCF1; NM; OGDH; OPN1SW;  
 PEX1; PGAM2; PMS2; PON1; PPP1R3A; PRSS1; PTC; PTPN12; RP10 RP9; SERPINE1; SGCE; SHFM1; SHH;  
 SLC26A3; SLC26A4; SLOS; SMAD1; TBXAS1; TWIST; ZWS1; ACHM3 ADRB3; ANK1; CA1; CA2; CCAL1; CLN8;  
 30 CMT4A; CNGB3; COH1; CPP; CRH; CYP11B1; CYP11B2; DECR1; DPYS DURS1; EBS1; ECA1; EGI; EXT1; EYA1;  
 FGFR1; GNRH1; GSR; GULOP; HR; KCNQ3; KFM; KWE; LGCR; LPL MCPH1; MOS; MYC; NAT1; NAT2; NBS1;  
 PLAT; PLEC1; PRKDC; PXMP3; RP1; SCZD6; SFTPC; SGM1; SPG5A STAR; TG; TRPS1; TTPA; VMD1; WRN;  
 ABCA1; ABL1; ABO; ADAMTS13; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP AMCD1; ASS; BDMF; BSCL; C5;  
 CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1; CRAT; DBH; DNAI1; DYS; DYT1; ENG FANCC; FBP1; FCMD; FRDA;  
 35 GALT; GLDC; GNE; GSM1; GSN; HSD17B3; HSN1; IBM2; INVS; JBTS1; LALL; LCCS1 LCCS; LGMD2H; LMX1B;  
 MLLT3; MROS; MSSE; NOTCH1; ORM1; PAPP; PIP5K1B; PTCH; PTGS1; RLN1; RLN2 RMRP; ROR2; RPD1;  
 SARDH; SPTLC1; STOM; TDFA; TEK; TMC1; TRIM32; TSC1; TYRP1; XPA; CACNB2; COL17A1 CUBN; CXCL12;  
 CYP17; CYP2C19; CYP2C9; EGR2; EMX2; ERCC6; FGFR2; HK1; HPS1; IL2RA; LGI1; LIPA; MAT1A MBL2; MKI67;  
 MXI1; NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCBD; PEO1; PHYH; PNLIP; PSAP; PTEN; RBP4; RDPA; RET SFTPA1;  
 40 SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1; TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8; ACAT1; ALX4; AMPD3; ANC APOA1;  
 APOA4; APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1; CD3E; CD3G; CD59; CDKN1C; CLN2; CNTF CPT1A;  
 CTSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT; DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2 GIF; HBB;  
 HBBP1; HBD; HBE1; HBG1; HBG2; HMB5; HND; HOMG2; HRAS; HVBS1; IDDM2; IGER; INS; JBS; KCNJ11  
 KCNJ1; KCNQ1; LDHA; LRP5; MEN1; MLL; MYBPC3; MYO7A; NNO1; OPPG; OPTB1; PAX6; PC; PDX1; PGL2;  
 45 PGR PORC; PTH; PTS; PVRL1; PYGM; RAG1; RAG2; ROM1; RRAS2; SAA1; SCA5; SCZD2; SDHD; SERPING1;  
 SMPD1 TCIRG1; TCL2; TECTA; TH; TREH; TSG101; TYR; USH1C; VMD2; VRNI; WT1; WT2; ZNF145; A2M;  
 AAAS; ACADS ACLS; ACVRL1; ALDH2; AMHR2; AOM; AQP2; ATD; ATP2A2; BDC; C1R; CD4; CDK4; CNA1;  
 COL2A1; CYP27B1 DRPLA; ENUR2; FEOM1; FGF23; FPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMGA2; HMN2; HPD; IGF1;  
 KCNA1; KERA; KRAS2 KRT1; KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRTHB6; LDHB; LYZ; MGCT; MPE;  
 50 MVK; MYL2; OAP; PAH PPKB; PRB3; PTPN11; PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1; SCA2; SCNN1A; SMAL; SPPM;  
 SPSMA; TBX3; TBX5; TCF1 TPI1; TSC3; ULR; VDR; VWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1; CLN5; CPB2; ED2; EDNRB;  
 ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2 GJB6; IPF1; MBS1; MCOR; NYS4; PCCA; RBI; RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2;  
 SLC25A15; STARP1; ZNF198 ACHM1; ARVD1; BCH; CTA1; DAD1; DFNB5; EML1; GALT; GCH1; IBGC1; IGH@;  
 grupo IGH; IGHG1; IGHM IGH; IV; LTBP2; MCOP; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP; NPC2;  
 55 PABPN1; PSEN1; PYGL; RPGRIP1 SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7; SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1;  
 TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USH1A VP; ACCPN; AHO2; ANCR; B2M; BBS4; BLM; CAPN3; CDAN1; CDAN3;  
 CLN6; CMH3; CYP19; CYP1A1; CYP1A2 DYX1; EPB42; ETFA; EYCL3; FAH; FBN1; FES; HCVS; HEXA; IVD;  
 LCS1; LIPC; MYO5A; OCA2; OTSC1; PWCR RLBP1; SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A; WMS; ABCC6; ALDOA;  
 APRT; ATP2A1; BBS2; CARD15; CATM; CDH1 CETP; CHST6; CLN3; CREBBP; CTH; CTM; CYBA; CYLD; DHS;  
 60 DNASA1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS; GAN HAGH; HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1; HBZ; HBZP; HP; HSD11B2;  
 IL4R; LIPB; MC1R; MEFV; MHC2TA; MLYCD; MMVP1 PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS; PMM2; PXE; SALL1; SCA4;  
 SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2; VDI; WT3 ABR; ACACA; ACADVL; ACE; ALDH3A2; APOH; ASPA;  
 AXIN2; BCL5; BHD; BLMH; BRCA1; CACD; CCA1; CCZS CHRN1B; CHRNE; CMT1A; COL1A1; CORD5; CTNS;  
 EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR; GFAP; GH1; GH2 GP1BA; GPSC; GUCY2D; ITGA2B; ITGB3; ITGB4;  
 65 KRT10; KRT12; KRT13; KRT14; KRT14L1; KRT14L2; KRT14L3 KRT16; KRT16L1; KRT16L2; KRT17; KRT9; MAPT;  
 MDB; MDCR; MGI; MHS2; MKS1; MPO; MYO15A; NAGLU; NAPB NF1; NME1; P4HB; PAFAH1B1; PECAM1;

PEX12; PHB; PMP22; PRKAR1A; PRKCA; PRKWNK4; PRP8; PRPF8 PTLAH; RARA; RCV1; RMSA1; RP17; RSS; SCN4A; SERPINF2; SGCA; SGSH; SHBG; SLC2A4; SLC4A1; SLC6A4 SMCR; SOST; SOX9; SSTR2; SYM1; SYNS1; TCF2; THRA; TIMP2; TOC; TOP2A; TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1 BCL2; CNSN; CORD1; CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO; LAMA3; LCFS2; MADH4; MAFD1; MC2R; MCL; MYP2 NPC1; SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE; ATHS; BAX; BCKDHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A CCO; CEACAM5; COMP; CRX; DBA; DDU; DFNA4; DLL3; DM1; DMWD; E11S; ELA2; EPOR; ERCC2; ETFB; EXT3 EYCL1; FTL; FUT1; FUT2; FUT6; GAMT; GCDH; GPI; GUSM; HB1; HCL1; HHC2; HHC3; ICAM3; INSR; JAK3; KLK3 LDLR; LHB; LIG1; LOH19CR1; LYL1; MAN2B1; MCOLN1; MDRV; MLLT1; NOTCH3; NPHS1; OFC3; OPA3; PEPD PRPF31; PRTN3; PRX; PSG1; PVR; RYR1; SLC5A5; SLC7A9; STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNI3; TYROBP; ADA AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5; GNAS; GSS; HNF4A JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1; PI3; PPCD; PPGB; PRNP; THBD; TOP1; AIRE; APP; CBS; COL6A1; COL6A2 CSTB; DCR; DSCR1; FPDMM; HLCS; HPE1; ITGB2; KCNE1; KNO; PRSS7; RUNX1; SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2; CSF2RB; CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR; DIA1; EWSR1; GGT1; MGCR; MN1 NAGA; NF2; OGS2; PDGFB; PPARA; PRODH; SCO2; SCZD4; SERPIND1; SLC5A1; SOX10; TCN2; TIMP3; TST VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2; AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2; AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1; ARSC2 ARSE; ARTS; ARX; ASAT; ASSP5; ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS; BGN; BTK; BZX; C1HR; CACNA1F; CALB3; CBBM CCT; CDR1; CFNS; CGF1; CHM; CHR39C; CIDX; CLA2; CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5; COL4A6; CPX; CVD1; CYBB; DCX; DFN2; DFN4; DFN6; DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1; ELK1; EMD; EVR2; F8; F9; FCP1; FDP5L5; FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDXY; GJB1; GK; GLA; GPC3; GRPR; GTD; GUST; HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2C; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2; JMS; KALI; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGC1; MIC5; MIDI; MLLT7; MLS; MRSD; MRX14; MRX1; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTM1; MYCL2; MYP1; NDP; NHS; NPHL1; NR0B1; NSX; NYS1; NYX; OA1; OASD; OCRL; ODT1; OFD1; OPA2; OPD1; OPEM; OPN1LW; OPN1MW; OTC; P3; PDHA1; PDR; PFC; PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2; PHP; PIGA; PLP1; POF1; POLA; POU3F4; PPMX; PRD; PRPS1; PRPS2; PRS; RCCP2; RENBP; RENS1; RP2; RP6; RPGR; RPS4X; RPS6KA3; RS1; S11; SDYS; SEDL; SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX; SRS; STS; SYN1; SYP; TAF1; TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC; TIMM8A; TIMP1; TKCR; TNFSF5; UBE1; UBE2A; WAS; WSN; WTS; WWS; XIC; XIST; XK; XM; XS; ZFX; ZIC3; ZNF261; ZNF41; ZNF6; AMELY; ASSP6; AZF1; AZF2; DAZ; GCY; RPS4Y; SMCY; SRY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1; ASD1; ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3; CLN4; CSF2RA; CTS1; DF; DIH1; DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EEF1A1L14; EYCL2; FANCB; GCSH; GCSL; GIP; GTS; HHG; HMI; HOAC; HOKPP2; HRPT1; HSD3B3; HTC1; HV1S; ICHQ; ICR1; ICR5; IL3RA; KAL2; KMS; KRT18; KSS; LCAT; LHON; LIMM; MANBB; MCPH2; MEB; MELAS; MIC2; MPFD; MS; MSS; MTATP6; MTCO1; MTCO3; MTCYB; MTND1; MTND2; MTND4; MTND5; MTND6; MTRNR1; MTRNR2; MTTE; MTTG; MTTI; MTTK; MTTL1; MTTL2; MTTN; MTPP; MTTT1; MTTT2; MTTT3; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PRO1; PROP1; RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM; o TTD.

#### **EJEMPLO 27: TRATAMIENTO DEL VASOESPASMO MEDIANTE EL SUMINISTRO A LOS TEJIDOS CORPORALES DE MOLÉCULAS DE ARNm MODIFICADAS QUE CODIFICAN iNOS**

El ARN modificado con pseudouridina o nucleósidos que codifica óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) se suministra al endotelio vascular de los modelos de animales de vasoespasmo (por ejemplo, hemorragia subaracnoidea) y se evalúa su efecto sobre la enfermedad como se describe en Pradilla G, Wang PP, et al, Prevention of vasospasm by anti-CD11/CD18 monoclonal antibody therapy following subarachnoid hemorrhage in rabbits. J Neurosurg 2004; 101(1): 88-92) o Park S, Yamaguchi M, et al, Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage. Stroke 2004;35(10): 2412-7). La administración del ARN mejora la enfermedad.

#### **EJEMPLO 28: RESTAURACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL CABELLO MEDIANTE EL SUMINISTRO DE ARNm MODIFICADO QUE CODIFICA UNA PROTEÍNA INMUNOSUPRESORA**

ARN modificado con pseudouridina o nucleósidos que codifica una telomerasa o una proteína inmunosupresora (por ejemplo,  $\alpha$ -MSH, TGF- $\beta$  1 o IGF-I se suministra a los folículos pilosos de animales utilizados como modelos de pérdida de pelo o calvicie y se evalúa su efecto en el crecimiento del cabellos como se describe en Jiang J, Tsuboi R, et al, Topical application of ketoconazole stimulates hair growth in C3H/HeN mice. J Dermatol 2005;32(4): 243-7) o McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, et al, Transfer of CD8(+) cells induces localized hair loss whereas CD4(+)/CD25(-) cells promote systemic alopecia areata and CD4(+)/CD25(+) cells blockade disease onset in the C3H/HeJ mouse model. J Invest Dermatol 2005;124(5): 947-57). La administración de ARN restaura el crecimiento del cabello.

#### **EJEMPLO 29: SÍNTESIS DE UNA MOLÉCULA DE ARN TRANSCRITA IN VITRO CON NUCLEÓSIDOS ALTERADOS QUE CONTIENE UN ARNip**

Se sintetiza una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) que comprende pseudouridina o un nucleósido modificado y que además comprende un ARN de interferencia pequeño (ARNip) o ARN de horquilla corta (ARNhc) mediante el siguiente procedimiento: Las cadenas de ARN complementarias con la secuencia deseada que contiene uridina o 1

o más nucleósidos modificados se sintetizan mediante transcripción *in vitro* (por ejemplo, mediante ARN polimerasa de fago T7, SP6 o T3) como se describe en el Ejemplo 2. Las moléculas de ARNbc muestran una inmunogenicidad reducida. En otros experimentos, las moléculas de ARNbc se diseñan para ser procesadas por una enzima celular para producir el ARNip o el ARNhc deseado. Debido a que las moléculas de ARNbc de varios cientos de nucleótidos se sintetizan fácilmente, cada ARNbc también puede diseñarse para que contenga varias moléculas de ARNip o ARNhc, para facilitar el suministro de múltiples ARNip o ARNhc a una única célula diana.

#### **EJEMPLO 30: USO DE UNA MOLÉCULA DE ARN TRANSCRITA *IN VITRO* CON NUCLEÓSIDOS ALTERADOS PARA SUMINISTRAR ARNip**

La molécula de ARNbc del ejemplo anterior se compleja con un reactivo de transfección (por ejemplo, un reactivo de transfección catiónico, un reactivo de transfección basado en lípidos, un reactivo de transfección basado en proteínas, un reactivo de transfección basado en polietilenimina o fosfato de calcio) y se suministra a una célula diana de interés. Las enzimas en o sobre la superficie de la célula diana degradan el ARNbc a la(s) molécula(s) de ARNip o ARNhc deseada(s). Este método silencia de manera eficaz la transcripción de 1 o más genes celulares correspondientes a la(s) secuencia(s) de ARNip o ARNhc.

#### **EJEMPLO 31: PROBANDO EL EFECTO DE MODIFICACIONES ADICIONALES DE NUCLEÓSIDOS EN LA INMUNOGENICIDAD Y LA EFICACIA DE LA TRADUCCIÓN DEL ARN**

Se introducen modificaciones de nucleósidos adicionales en el ARN transcrito *in vitro*, utilizando los métodos descritos anteriormente en los Ejemplos 2 y 7 y se prueban sus efectos en la inmunogenicidad y la eficacia de la traducción como se describe en los Ejemplos 1-8 y 9-15, respectivamente. Se encuentran determinadas modificaciones adicionales para disminuir la inmunogenicidad y potenciar la traducción.

Las modificaciones probadas incluyen, p.ej.: m<sup>1</sup>A; m<sup>2</sup>A; Am; ms<sup>2</sup>m<sup>6</sup>A; i<sup>6</sup>A; ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A; io<sup>6</sup>A; ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A; g<sup>6</sup>A; t<sup>6</sup>A; ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A; m<sup>6</sup>t<sup>6</sup>A; hn<sup>6</sup>A; ms<sup>2</sup>hn<sup>6</sup>A; Ar(p); l; m<sup>1</sup>l; m<sup>1</sup>lm; m<sup>3</sup>C; Cm; s<sup>2</sup>C; ac<sup>4</sup>C; f<sup>5</sup>C; m<sup>5</sup>Cm; ac<sup>4</sup>Cm; k<sup>2</sup>C; m<sup>1</sup>G; m<sup>2</sup>G; m<sup>7</sup>G; Gm; m<sup>2</sup>G; m<sup>2</sup>Gm; m<sup>2</sup>Gm; Gr(p); yW; o<sub>2</sub>yW; OHyW; OHyW\*; imG; mimG; Q; oQ; galQ; manQ; preQ<sub>0</sub>; preQ<sub>0</sub>.; G+; D; m<sup>5</sup>Um; m<sup>1</sup>Ψ; Ψm; s<sup>4</sup>U; m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U; s<sup>2</sup>Um; acp<sup>3</sup>U; ho<sup>5</sup>U; mo<sup>5</sup>U; cmo<sup>5</sup>U; mcmo<sup>5</sup>U; chm<sup>5</sup>U; mchm<sup>5</sup>U; mcm<sup>5</sup>U; mcm<sup>5</sup>Um; mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U; nm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U; mnm<sup>5</sup>U; mnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U; mnm<sup>5</sup>se<sup>2</sup>U; ncm<sup>5</sup>U; ncm<sup>5</sup>Um; cmnm<sup>5</sup>U; cmnm<sup>5</sup>Um; cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U; m<sup>6</sup><sub>2</sub>A; lm; m<sup>4</sup>C; m<sup>4</sup>Cm; hm<sup>5</sup>C; m<sup>3</sup>U; m<sup>1</sup>acp<sup>3</sup>Ψ; cm<sup>5</sup>U; m<sup>6</sup>Am; m<sup>6</sup><sub>2</sub>Am; m<sup>2</sup><sup>7</sup>G; m<sup>2</sup><sup>2</sup><sup>7</sup>G; m<sup>3</sup>Um; m<sup>5</sup>D; m<sup>3</sup>Ψ; f<sup>5</sup>Cm; m<sup>1</sup>Gm; m<sup>1</sup>Am; tm<sup>5</sup>U; tm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U; imG-14; imG2; y ac<sup>6</sup>A.

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> ARN que Contiene Nucleósidos Modificados y Métodos de uso del Mismo

<130> EP81461IHVSZpau

<140> aún no asignado

<141> adjunto

<150> EP06813536.7

<151> 21/08/2006

<150> PCT/US2006/032372

<151> 21/08/2006

<150> 60/710.164

<151> 23/08/2005

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1864

<212> ARN

<213> Photinus pyralis

<400> 1

# ES 2 735 531 T3

ggaauucuca acacaacaua uacaaaacaa acgaauucua agcaaucaag cauucuaucu 60  
 cuauugcagc aauuuaaauc auuucuuaa aagcaaaagc aauuuucuga aauuuuacac 120  
 cauuaacgaa cgauagccau ggaagacgcc aaaaacauaa agaaaggccc ggcgccauuc 180  
 uauccucuag aggauggaac cgcuggagag caacugcaua aggcuaugaa gagauacgcc 240  
 cugguuccug gaacaauugc uuuuacagau gcacauaucg aggugaacau cacguacgcg 300  
 gaauacuucg aaauuguccu ucggguuggca gaagcuaua aacgauaugg gcugaauaca 360  
 aaucacagaa ucgucguaug cagugaaaac ucucuuaau ucuuuaugcc gguguugggc 420  
 gcguuauuuu ucggaguugc aguugcgcgc gcgaacgaca uuuauaaua acgugaauug 480  
 cucaacagua ugaacauuuc gcagccuacc guaguguuug uuuccaaaaa gggguugcaa 540  
 aaaaauuuuga acgugcaaaa aaaaauacca auauuccaga aaauuauuuu cauggauucu 600  
 aaaacggauu accagggauu ucagucgaug uacacguucg ucacauuca ucuaccuccc 660  
 gguuuuaaug aaucgauuu uguaccagag uccuuugauc gugacaaaac aaugcacug 720  
 auauagaauu ccucuggauc uacuggguaa ccuaagggug uggcccuucc gcauagaacu 780  
 gccugcgua gauucucgca ugccagagau ccuaauuuug gcaucaaau cauuccggau 840  
 acugcgauuu uaaguguugu uccauuccau cacgguuuug gaauuuuac uacacucgga 900  
 uauuugauau guggauuucg agucgucua auguauagau uugaagaaga gcuguuuuuu 960  
 cgaucuuuc aggaauacaa aaaucaagu gcguugcuag uaccaaccu auuuuacauu 1020  
 uucgcaaaa gcacucugau ugacaaauac gauuuauca auuuacacga aaugcuucu 1080  
 gggggcgac cucuuucgaa agaagucggg gaagcggug caaacgcuu ccaucuucca 1140  
  
 gggauacgac aaggauaug gcucacugag acuaucag cuauucugau uacaccgag 1200  
 ggggaugaua aaccgggcgc ggucgguaa guuguuccau uuuuugaagc gaagguugug 1260  
 gaucuggaua cgggaaaac gcugggcguu aaucagagag gcgaauuug ugucagagga 1320  
 ccuaugauua uguccgguu uguaaacaau ccggaagcga ccaacgccu gauugacaag 1380  
 gauggauggc uacauucugg agacauagcu uacugggacg aagacgaaca cuucucaua 1440  
 guugaccgcu ugaagucuu aaauaaauac aaaggauauc agguaggccc cgcugaauug 1500  
 gaucgauau uguuacaaca cccaacauc uucgacgcg gcguggcagg ucuucccgac 1560  
 gaugacgccg gugaacuucc cgccgccguu guuguuuug agcacggaaa gacgaugacg 1620  
 gaaaaagaga ucguggauua cguggccagu caaguaacaa ccgcgaaaaa guugcgcgga 1680  
 ggaguugugu uuguggacga aguaccgaaa ggucuuaccg gaaaacucga cgcaagaaaa 1740  
 aucagagaga uccucauaaa ggccaagaag ggcggaaagu ccaauuugua aaauugaacu 1800  
 cuagaggauc ccaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1860  
 aaca 1864

5 <210> 2  
 <211> 1571  
 <212> ARN  
 <213> Renilla reniformis

10 <400> 2

# ES 2 735 531 T3

ggcuagccac caugacuucg aaaguuuuug auccagaaca aaggaaacgg augauaacug 60  
 guccgcagug gugggccaga uguaaacaaa ugauguucu ugauucauuu auuaauuuu 120  
 augauucaga aaaacaugca gaaaaugcug uuauuuuuu acaugguaac gcggccucuu 180  
 cuuauuuuug gcgacauguu gugccacaua uugagccagu agcgcgguu auuauaccag 240  
 accuuauugg uaugggcaaa ucaggcaaa cuugguaaugg uucuuauagg uuacuugauc 300  
 auuacaaaau ucuuacugca ugguuuugaac uucuuauuu accaaagaag aucauuuuug 360  
 ucggccauga uuggggugcu uguuuggcau uucauuauag cuaugagcau caagauaaga 420  
 ucaaagcaau aguucacgcu gaaaguguag uagaugugau ugaaucaugg gaugaauggc 480  
 cugauuuuga agaagauuu gcguugauca aaucugaaga aggagaaaa augguuuugg 540  
 agaauaacuu cuucguggaa accauguugc caucaaaaau caugagaaaag uuagaaccag 600  
 aagaauuugc agcauauuu gaaccauua aagagaaagg ugaaguucgu cguccaacau 660  
 uaucauggcc ucgugaaauc ccguuaguaa aaggugguaa accugacguu guacaaaauug 720  
 uuaggaauua uaaugcuuau cuacgugcaa gugaugauuu accaaaaaug uuuaauugaau 780  
 cggaccagg auucuuuucc aaugcuauug uugaaggugc caagaaguuu ccuaauacug 840  
 aauuugucaa aguaaaaggu cuucauuuuu cgcaagaaga ugcaccugau gaaaugggaa 900  
 aaauaucaaa aucguucguu gagcgaguuc ucaaaaauga acaaauugc acggggggccc 960  
 cuaggaauuu uuuaagggaag aucuggccuu ccuacaaggg aaggccaggg aauuuucuu 1020  
 agagcagacc agagccaaca gccccaccag aagagagcuu caggucuggg guagagacaa 1080  
 caacucuccc ucagaagcag gagccgauag acaaggaacu guauccuuu acucuccuca 1140  
 gaucacucuu uggcaacgac ccucgucac aaauaagaua ggggggcaac uaaagggauc 1200  
 ggccgcuucg agcagacaug auuagauaca uugaugaguu uggacaaacc acaacuagaa 1260  
 ugcagugaaa aaaaugcuuu auuugugaaa uuugugaugc uauugcuuuu uuuguaacca 1320  
 uuauaagcug caauaaacaa guuaacaaca acaauugcau ucauuuuuug uuucagguuc 1380  
 agggggaggu gugggagguu uuuuaaagca aguaaaaccu cuacaaaugu gguaaaaucg 1440  
 auuaguuuaa acagaucag guggcacuuu ucggggaaau gugcgcgga ccccuauuug 1500  
 uuuaauuuu uaaauacauu caauauugua uccgcucaug agacaauaac ccugauaaau 1560  
 gcuucaauaa u 1571

5 <210> 3  
 <211> 726  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 3

gggaauuugg cccucgaggc caagaauucg gcacgaggca cgcggccagc cagcagacag 60  
aggacucuca uuaaggaagg uguccugugc ccugacccua caagaugcca agagaagaug 120  
cucacuucau cuaugguuac cccaagaagg ggcacggcca cucuuacacc acggcugaag 180  
aggccgcugg gaucggcauc cugacaguga uccugggagu cuuacugcuc aucggcuguu 240  
ggauuuguag aagacgaaau ggauacagag ccuugaugga uaaaagucuu cauguuggca 300  
cucaaugugc cuuaacaaga agaugcccac aagaaggguu ugaucaucgg gacagcaaag 360  
ugucucuuca agagaaaaac ugugaaccug ugguucccaa ugcuccaccu gcuuaugaga 420  
aacucucugc agaacaguca ccaccaccuu auucaccuua agagccagcg agacaccuga 480  
gacaugcuga aauuauuuu cucacacuuu ugcuuagaau uaaucagac aucuaauguu 540  
cuccuuugga augguguagg aaaaaugcaa gccaucucua auauaaguc aguguuaaaa 600  
uuuuaguagg uccgcuagca guacuaauca ugugaggaaa ugaugagaaa uauuaauug 660  
ggaaaacucc aucauauaa guugcaaugc augauaaaaa aaaaaaaaaa aaaaacugcg 720  
gccgca 726

<210> 4  
<211> 712  
<212> ARN  
<213> Homo sapiens

<400> 4

gggaauaagc uugcggccgc aguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuaucaugca uugcaacauu 60  
uauugaugga guuuucccaa uuuaauauuu cucaucauuu ccucacauga uuaguacugc 120  
uagcggaccu acuaaaauuu uaacacugac uuauuuuuag agauggcuug cauuuuuccu 180  
acaccauucc aaaggagaac auuagauguc uguauaaaau caagcaaaag ugugagagaa 240  
auaauuucag caugucucag gugucucgcu ggcucuuaag gugaauaagg ugguggugac 300  
uguucugcag agaguuuuc auaagcaggu ggagcauugg gaaccacagg uucacaguuu 360  
uucucuugaa gagacacuuu gcugucccga ugaucaaaacc cuucuugugg gcaucuucuu 420  
guuaaggcac auugagugcc aacaugaaga cuuuuaucca ucaaggcucu guauccauuu 480  
cgucuucuaa aaauaccaaca gccgaugagc aguaagacuc ccaggauacac ugucaggauu 540  
ccgaucccag cggccucuc agccguggug uaagaguggc cgugccccuu cuugggguaa 600  
ccauagauga agugagcauc uucucuuggc aucuuguagg gucagggcac aggacaccuu 660  
ccuuaaugag aguccucugu cugcuggcug gccgcgugcc ucgugccgaa uu 712

<210> 5  
<211> 494  
<212> ARN  
<213> Homo sapiens

<400> 5

# ES 2 735 531 T3

gggagaccca agcuggcuag cagucaucca acagaaucau gagacagacu uugccuugua 60  
 ucuacuuuug gggggggccuu uugcccuuug ggaugcugug ugcauccucc accaccaagu 120  
 gcacuguuag ccaugaaguu gcugacugca gccaccugaa guugacucag guacccgaug 180  
 aucuacccac aaacauaaca guguugaacc uuacccauaa ucaacucaga agauuaccag 240  
 ccgccaacuu cacaagguau agccagcuua cuagcuugga uguaggauuu aacaccaucu 300  
 caaaacugga gccagaauug ugccagaaac uucccauguu aaaaguuuug aaccuccagc 360  
 acaaugagcu aucucaacuu ucugauaaaa ccuuugccuu cugcacgaau uugacugaac 420  
 uccaucucau guccaacuca auccagaaaa uuaaaaaaua ucccuuuguc aagcagaaga 480  
 auuuauacac auua 494

5 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

15 <400> 6  
 uggauccggc uuugagauu u 21

20 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

30 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (11)..(11)  
 <223> urn

35 <400> 7  
 uggauccggc uuugagauu u 21

40 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Sintetizada químicamente

50 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (6)..(6)  
 <223> m5c

55 <400> 8  
 uggauccggc uuugagauu u 21

60 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

|    |                                    |    |
|----|------------------------------------|----|
|    | <223> Sintetizada químicamente     |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <221> base modificada              |    |
| 5  | <222> (12)..(12)                   |    |
|    | <223> p                            |    |
|    | <400> 9                            |    |
| 10 | uggaucggc uuugagau u               | 21 |
|    | <210> 10                           |    |
|    | <211> 31                           |    |
|    | <212> ARN                          |    |
| 15 | <213> Secuencia artificial         |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <223> Sintetizada químicamente     |    |
|    | <400> 10                           |    |
| 20 | gggagacagg gguguccgcc auuuccaggu u | 31 |
|    | <210> 11                           |    |
|    | <211> 31                           |    |
|    | <212> ARN                          |    |
| 25 | <213> Secuencia artificial         |    |
|    | <220>                              |    |
|    | <223> Sintetizada químicamente     |    |
| 30 | <400> 11                           |    |
|    | gggagacagg cuauaacuca cauaauguau u | 31 |

## REIVINDICACIONES

1. Un método no terapéutico para inducir a una célula de mamífero a producir una proteína recombinante, comprendiendo el método poner en contacto dicha célula de mamífero con un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende un marco abierto de lectura que codifica dicha proteína recombinante; y en el que el ARNm sintetizado *in vitro* comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina); y en el que la cantidad de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a dicho contacto es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta al contacto de dichas células de mamífero con un ARNm homólogo no modificado que no comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina).
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho ARNm sintetizado *in vitro* comprende:
- una cola de poli-A;
  - una caperuza  $m^7GpppG$ ;
  - un potenciador transcripcional independiente de caperuza; o
  - el nucleósido modificado 5-metilcitidina ( $m^5C$ ) en lugar de citidina.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha proteína codificada por dicho ARNm sintetizado *in vitro* se selecciona del grupo que consiste en: eritropoyetina (EPO); una enzima detectable seleccionada de luciferasa de luciérnaga, luciferasa de Renilla, beta-galactosidasa bacteriana (lacZ) y proteína fluorescente verde (GFP); un factor de transcripción seleccionado de MYC y SRY o MCOP; un factor de crecimiento o citocina seleccionados del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta1 (TGF-beta1), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), hormona estimulante de los melanocitos  $\alpha$  (alfa-MSH); factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I); IL-4; IL-13; e IL-10; óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS); una proteína de choque térmico; Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística (CFTR); una encima con actividad antioxidante seleccionada entre catalasa, fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa-1 y superóxido dismutasa-2; tirosina quinasa de Bruton; adenosina desaminasa; ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa; ABCA4; ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; APOA2; AVSD1; BRCD2; C1QA; C1QB; C1QG; C8A; C8B; CACNA1S; CCV; CD3Z; CDC2L1; CHML; CHS1; CIAS1; CLCNKB; CMD1A; CMH2; CMM; COL11A1; COL8A2; COL9A2; CPT2; CRB1; CSE; CSF3R; CTPA; CTSK; DBT; DIO1; DISC1; DPYD; EKV; ENO1; ENO1P; EPB41; EPHX1; F13B; F5; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FCHL; FH; FMO3; FMO4; FUCA1; FY; GALE; GBA; GFND; GJA8; GJB3; GLC3B; HF1; HMGCL; HPC1; HRD; HRPT2; HSD3B2; HSPG2; KCNQ4; KCS; KIF1B; LAMB3; LAMC2; LGMD1B; LMNA; LOR; MCKD1; MCL1; MPZ; MTHFR; MTR; MUTHY; MYOC; NB; NCF2; NEM1; NPHS2; NPPA; NRAS; NTRK1; OPTA2; PBX1; PCHC; PGD; PHA2A; PHGDH; PKLR; PKP1; PLA2G2A; PLOD; PPOX; PPTO; PRCC; PRG4; PSEN2; PTOS1; REN; RFX5; RHD; RMD1; RPE65; SCCD; SERPINC1; SJS1; SLC19A2; SLC2A1; SPG23; SPTA1; TAL1; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A; VMGLOM; VWS; WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACP1; AGXT; AHRH; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS; BMPR2; CHRNA1; CM-CWTD; CNGA3; COL3A1; COL4A3; COL4A4; COL6A3; CPS1; CRYGA; CRYGEP1; CYP1B1; CYP27A1; DBI; DES; DYSF; EDAR; EFEMP1; EIF2AK3; ERCC3; FSHR; GINGF; GLC1B; GPD2; GYPC; HADHA; HADHB; HOXD13; HPE2; IGK; IHH; IRS1; ITGA6; KHK; KYNU; LCT; LHCGR; LSFC; MSH2; MSH6; NEB; NMTC; NPHP1; PAFAH1P1; PAX3; PAX8; PMS1; PNKD; PPH1; PROC; REG1A; SAG; SFTPB; SLC11A1; SLC3A1; SOS1; SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFXH1B; ACAA1; AGS1; AGTR1; AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTD; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP; CPO; CRV; CTNNB1; DEM; ETM1; FANCD2; FIH; FOXL2; GBE1; GLB1; GLCLC; GNAI2; GNAT1; GP9; GPX1; HGD; HRG; ITIH1; KNG; LPP; LRS1; MCCC1; MDS1; MHS4; MITF; MLH1; MYL3; MYMY; OPA1; P2RY12; PBXP1; PCCB; POU1F1; PPARG; PROS1; PTHR1; RCA1; RHO; SCA7; SCLC1; SCN5A; SI; SLC25A20; SLC2A2; TF; TGFB2; THPO; THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS; UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A; XPC; ZNF35; ADH1B; ADH1C; AFP; AGA; AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTD2; ELONG; ENAM; ETV2; EVI2; F11; FABP2; FGA; FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC; GNPTA; GNRHR; GYPA; HCA; HCL2; HD; HTN3; HVBS6; IDUA; IF; JPD; KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2; MSX1; MTP; NR3C2; PBT; PDE6B; PEE1; PITX2; PKD2; QDPR; SGCB; SLC25A4; SNCA; SOD3; STATH; TAPVR1; TYS; WBS2; WFS1; WHCR; ADAMTS2; ADRB2; AMCN; AP3B1; APC; ARSB; B4GALT7; BHR1; C6; C7; CCAL2; CKN1; CMDJ; CRHBP; CSF1R; DHFR; DIAPH1; DTR; EOS; EPD; ERVR; F12; FBN2; GDNF; GHR; GLRA1; GM2A; HEXB; HSD17B4; ITGA2; KFS; LGMDLA; LOX; LTC4S; MAN2A1; MCC; MCCC2; MSH3; MSX2; NR3C1; PCSK1; PDE6A; PFBI; RASA1; SCZD1; SDHA; SGCD; SLC22A5; SLC26A2; SLC6A3; SM1; SMA@; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFB1; ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB; BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1; COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1; ELOVL4; EPM2A; ESR1; EYA4; F13A1; FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR; GSE; HCR; HFE; HLA-A; HLA-DPB1; HLA-DRA; HPFH; ICS1; IDDM1; IFNGR1; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCOS1; MUT; MYB; NEU1; NKS1; NYS2; OA3; ODDD; OFCO; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1; PLA2G7; PLG; POLH; PPAC; PSORS1; PUJO; RCD1; RDS; RHAG; RP14; RUNX2; RWS; SCA1; SCZD3; SIASD; SOD2; ST8; TAP1; TAP2; TFAP2B; TNDM; TNF; TPBG; TPMT; TULP1; WISP3; AASS; ABCB1; ABCB4; ACHE; AQP1; ASL; ASNS; AUTS1; BPGM; BRAF; C7orf2; CACNA2D1; CCM1; C23B; CFTR; CORDOMA; CLCN1; CMH6; CMT2D; COL1A2; CRS; CYMD; DFNA5; DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1; FKBP6; GCK; GHRHR; GHS; GLI3; GPDS1; GUSB; HLXB9; HOXA13; HPFH2; HRX; IAB; IMMP2L; KCNH2; LAMBI; LEP; MET; NCF1; NM; OGDH; OPN1SW; PEX1; PGAM2;

PMS2; PON1; PPP1R3A; PRSS1; PTC; PTPN12; RP10; RP9; SERPINE1; SGCE; SHFM1; SHH; SLC26A3;  
 SLC26A4; SLOS; SMAD1; TBXAS1; TWIST; ZWS1; ACHM3; ADRB3; ANK1; CA1; CA2; CCAL1; CLN8; CMT4A;  
 CNGB3; COH1; CPP; CRH; CYP11B1; CYP11B2; DECR1; DPYS; DURS1; EBS1; ECA1; EGI; EXT1; EYA1; FGFR1;  
 GNRH1; GSR; GULOP; HR; KCNQ3; KFM; KWE; LGCR; LPL; MCPH1; MOS; MYC; NAT1; NAT2; NBS1; PLAT;  
 5 PLEC1; PRKDC; PXMP3; RP1; SCZD6; SFTPC; SGM1; SPG5A; STAR; TG; TRPS1; TTPA; VMD1; WRN; ABCA1;  
 ABL1; ABO; ADAMTS13; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP; AMCD1; ASS; BDMF; BSCL; C5; CDKN2A;  
 CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1; CRAT; DBH; DNAI1; DYS; DYT1; ENG; FANCC; FBP1; FCMD; FRDA; GALT  
 GLDC; GNE; GSM1; GSN; HSD17B3; HSN1; IBM2; INVS; JBTS1; LALL; LCCS1; LCCS; LGMD2H; LMX1B; MLLT3  
 MROS; MSSE; NOTCH1; ORM1; PAPP; PIP5K1B; PTCH; PTGS1; RLN1; RLN2; RMRP; ROR2; RPD1; SARDH  
 10 SPTLC1; STOM; TDFA; TEK; TMC1; TRIM32; TSC1; TYRP1; XPA; CACNB2; COL17A1; CUBN; CXCL12; CYP17  
 CYP2C19; CYP2C9; EGR2; EMX2; ERCC6; FGFR2; HK1; HPS1; IL2RA; LGI1; LIPA; MAT1A; MBL2; MKI67; MXI1  
 NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCBD; PEO1; PHYH; PNLP; PSAP; PTEN; RBP4; RDP; RET; SFTPA1; SFTPD  
 SHFM3; SIAL; THC2; TLX1; TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8; ACAT1; ALX4; AMPD3; ANC; APOAL; APOA4  
 APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1; CD3E; CD59; CDKNLC; CLN2; CNTF; CPT1A; CTSC  
 15 DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT; DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2; GIF; HBB  
 HBBP1; HBD; HBE1; HBG1; HBG2; HMBS; HND; HOMG2; HRAS; HVBS1; IDDM2; IGER; INS; JBS; KCNJ11  
 KCNJ1; KCNQ1; LDHA; LRP5; MEN1; MLL; MYBPC3; MYO7A; NNO1; OPPG; OPTB1; PAX6; PC; PDX1; PGL2  
 PGR; PORC; PTH; PTS; PVRL1; PYGM; RAG1; RAG2; ROM1; RRAS2; SAA1; SCA5; SCZD2; SDHD; SERPING1  
 SMPD1; TCIRG1; TCL2; TECTA; TH; TREH; TSG101; TYR; USH1C; VMD2; VRNI; WT1; WT2; ZNF145; A2M  
 20 AAAS; ACADS; ACLS; ACVRL1; ALDH2; AMHR2; AOM; AQP2; ATD; ATP2A2; BDC; CIR; CD4; CDK4; CNA1  
 COL2A1; CYP27B1; DRPLA; ENUR2; FEOM1; FGF23; FPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMG2; HMN2; HPD IGF1;  
 KCNA1; KERA; KRAS2; KRT1; KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRTHB6; LDHB; LYZ; MGCT MPE;  
 MVK; MYL2; OAP; PAH; PPKB; PRB3; PTPN11; PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1; SCA2; SCNN1A; SMAL SPPM;  
 SPSMA; TBX3; TBX5; TCF1; TPI1; TSC3; ULR; VDR; VWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1; CLN5; CPB2; ED2 EDNRB;  
 25 ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2; GJB6; IPF1; MBS1; MCOR; NYS4; PCCA; RB1; RHOK; SCZD7; SGCG SLC10A2;  
 SLC25A15; STARP1; ZNF198; ACHM1; ARVD1; BCH; CTA1; DAD1; DFN5; EML1; GALT; GCH1 IBGC1; IGH@;  
 grupo IGHC; IGHG1; IGHM; IGHR; IV; LTBP2; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP NPC2; PABPN1;  
 PSEN1; PYGL; RPGRIP1; SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7; SPG3A; SPTB; TCL1A TGM1; TITF1;  
 TMIP; TRA@; TSHR; USHLA; VP; ACCPN; AHO2; ANCR; B2M; BBS4; BLM; CAPN3; CDAN1 CDAN3; CLN6;  
 30 CMH3; CYP19; CYP1A1; CYP1A2; DYX1; EPB42; ETFA; EYCL3; FAH; FBN1; FES; HCVS; HEXA IVD; LCS1; LIPC;  
 MYO5A; OCA2; OTSC1; PWCR; RLB1; SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A; WMS; ABCC6 ALDOA; APRT; ATP2A1;  
 BBS2; CARD15; CATM; CDH1; CETP; CHST6; CLN3; CREBBP; CTH; CTM; CYBA CYLD; DHS; DNASA1; DPEP1;  
 ERCC4; FANCA; GALNS; GAN; HAGH; HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1; HBZ; HBZP HP; HSD11B2; IL4R; LIPB; MC1R;  
 MEFV; MHC2TA; MLYCD; MMVP1; PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS; PMM2 PXE; SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G;  
 35 SLC12A3; TAT; TSC2; VDI; WT3; ABR; ACACA; ACADVL; ACE ALDH3A2; APOH; ASPA; AXIN2; BCL5; BHD;  
 BLMH; BRCA1; CACD; CCA1; CCZS; CHRNB1; CHRNE; CMT1A COL1A1; CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC;  
 GAA; GALK1; GCGR; GFAP; GH1; GH2; GP1BA; GPSC; GUCY2D ITGA2B; ITGB3; ITGB4; KRT10; KRT12; KRT13;  
 KRT14; KRT14L1; KRT14L2; KRT14L3; KRT16; KRT16L1 KRT16L2; KRT17; KRT9; MAPT; MDB; MDCR; MGI;  
 MHS2; MKS1; MPO; MYO15A; NAGLU; NAPB; NF1; NME1 P4HB; PAFAH1B1; PECAM1; PEX12; PHB; PMP22;  
 40 PRKAR1A; PRKCA; PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLA RARA; RCV1; RMSA1; RP17; RSS; SCN4A; SERPINF2;  
 SGCA; SGSH; SHBG; SLC2A4; SLC4A1; SLC6A4; SMCR SOST; SOX9; SSTR2; SYM1; SYNS1; TCF2; THRA;  
 TIMP2; TOC; TOP2A; TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1; BCL2 CNS; CORD1; CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO;  
 LAMA3; LCF52; MADH4; MAFD1; MC2R; MCL; MYP2; NPC1 SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2;  
 APOE; ATHS; BAX; BCKDHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A CCO; CEACAM5; COMP; CRX; DBA; DDU; DFNA4;  
 45 DLL3; DM1; DMWD; E11S; ELA2; EPOR; ERCC2; ETFB EXT3; EYCL1; FTL; FUT1; FUT2; FUT6; GAMT; GCDH;  
 GPI; GUSM; HB1; HCL1; HHC2; HHC3; ICAM3; INSR JAK3; KLK3; LDLR; LHB; LIG1; LOH19CR1; LYL1; MAN2B1;  
 MCOLN1; MDRV; MLLT1; NOTCH3; NPHS1; OFC3 OPA3; PEPD; PRPF31; PRTN3; PRX; PSG1; PVR; RYR1;  
 SLC5A5; SLC7A9; STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNI3 TYROBP; ADA; AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1;  
 CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5 GBS; GSS; HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1;  
 50 PI3; PPCD; PPGB; PRNP; THBD; TOP1; AIRE; APP CNAS; COL6A1; COL6A2; CSTB; DCR; DSCR1; FPDMM;  
 HLCS; HPE1; ITGB2; KCNE1; KNO; PRSS7; RUNX1 SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR; CECR; CHEK2; COMT;  
 CRYBB2; CSF2RB; CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR DIA1; EWSR1; GGT1; MGCR; MN1; NAGA; NE2; OGS2;  
 PDGFB; PPARA; PRODH; SCO2; SCZD4; SERPIND1 SLC5A1; SOX10; TCN2; TIMP3; TST; VCF; ABCD1; ACTL1;  
 ADFN; AGMX2; AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2 AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1; ARSC2; ARSE; ARTS; ARX;  
 55 ASAT; ASSP5; ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS BGN; BTK; BZX; C1HR; CACNA1F; CALB3; CBBM; CCT; CDR1;  
 CFNS; CGF1; CHM; CHR39c; CIDX; CLA2 CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5; COL4A6;  
 CPX; CVD1; CYBB; DCX; DFN2; DFN4 DFN6; DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1; ELK1;  
 EMD; EVR2; F8; F9; FCP1; FDP5L5 FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDX; GJB1;  
 GK; GLA; GPC3; GRPR; GTD; GUST HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2c; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2;  
 60 JMS; KAL1; KFS; L1CAM; LAMP2 MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGC1;  
 MIC5; MID1; MLLT7; MLS; MRSD MRX14; MRX1; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTM1; MYCL2;  
 MYP1; NDP; NHS; NPHL1; NROB1 NSX; NYS1; NYX; OA1; OASD; OCRL; ODT1; OFD1; OPA2; OPD1; OPEM;  
 OPN1LW; OPN1MW; OTC; P3; PDHA1 PDR; PFC; PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2; PHP;  
 PIGA; PLP1; POF1; POLA; POU3F4; PPMX; PRD; PRPS1; PRPS2; PRS; RCCP2; RENBP; RENS1; RP2; RP6;  
 65 RPGR; RPS4X; RPS6KA3; RS1; S11; SDYS; SEDL; SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX; SRS;  
 STS; SYN1; SYP; TAF1; TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC; TIMM8A; TIM1; TKCR; TNFSF5; UBE1; UBE2A;

WAS; WSN; WTS; WWS; XIC; XIST; XK; XM; XS; ZFX; ZIC3; ZNF261; ZNF41; ZNF6; AMELY; ASSP6; AZF1; AZF2; DAZ; GCY; RPS4Y; SMCY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1; ASD1; ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3; CLN4; CSF2RA; CTS1; DF; DIH1; DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EEF1A1L14; EYCL2; FANCB; GCSH; GCSL; GIP; GTS; HHG; HMI; HOAC; HOKPP2; HRPT1; HSD3B3; HTC1; HV1S; ICHQ; ICR1; ICR5; IL3RA; KAL2; KMS; KRT18; KSS; LCAT; LHON; LIMM; MANBB; MCPH2; MEB; MELAS; MIC2; MPFD; MS; MSS; MTATP6; MTCO1; MTCO3; MTCYB; MTND1; MTND2; MTND4; MTND5; MTND6; MTRNR1; MTRNR2; MTTE; MTTG; MTTI; MTTK; MTTL1; MTTL2; MTTN; MTTT; MTTT1; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PRO1; PROP1; RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM; y TTD.

10 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, donde dicha célula de mamífero es una célula presentadora de antígenos, una célula dendrítica, un macrófago, una célula neuronal, una célula cerebral, un astrocito, una célula microglial y una neurona, una célula de bazo, una célula linfóide, una célula pulmonar, una célula epitelial pulmonar, una célula de la piel, un queratinocito, una célula endotelial, una célula alveolar, un macrófago alveolar, un neumocito alveolar, una célula endotelial vascular, una célula mesenquimática, una célula epitelial, una célula epitelial colónica, una célula hematopoyética, una célula de médula ósea, una célula de Claudius, una célula de Hensen, una célula de Merkel, una célula de Müller, una célula de Paneth, una célula de Purkinje, una célula de Schwann, una célula de Sertoli, una célula acidófila, una célula acinar, un adipoblasto, un adipocito, una célula alfa marrón o blanca, una célula amacrina, una célula beta, una célula capsular, un cementocito, una célula principal, un condroblasto, un condrocito, una célula cromafina, una célula cromófoba, un corticotropo, una célula delta, una célula de Langerhans, una célula dendrítica folicular, una célula enterocromafina, un endimocito, una célula epitelial, una célula basal, una célula escamosa, una célula endotelial, una célula transicional, un eritroblasto, un eritrocito, un fibroblasto, un fibrocito, una célula folicular, una célula germinal, un gameto, un óvulo, un espermatozoide, un ovocito, un ovocito primario, un ovocito secundario, una espermátida, un espermatozocito, un espermatozocito primario, un espermatozocito secundario, un epitelio germinal, una célula gigante, una célula glial, un astroblasto, un astrocito, un oligodendroblasto, un oligodendrocito, un glioblasto, una célula caliciforme, un gonadotropo, una célula de la granulosa, un hemocitoblasto, una célula del pelo, un hepatoblasto, un hepatocito, un hialocito, una célula intersticial, una célula yuxtaglomerular, un queratinocito, un queratocito, una célula de la lemma, un leucocito, un granulocito, un basófilo, un eosinófilo, un neutrófilo, un linfoblasto, un linfoblasto B, un linfoblasto T, un linfocito, un linfocito B, un linfocito T, un linfocito T inducido por auxiliar, un linfocito T Th1, un linfocito T Th2, un linfocito citolítico natural, un timocito, una célula de Kupffer, un macrófago alveolar, una célula espumosa, un histiocito, una célula lútea, una célula madre linfocítica, una célula linfóide, una célula madre linfóide, una célula macroglial, una mamotropa, un mastocito, un meduloblasto, un megacarioblasto, un megacariocito, un melanoblasto, un melanocito, una célula mesangial, una célula mesotelial, un metamielocito, un monoblasto, un monocito, una célula mucosa del cuello, un mioblasto, una célula muscular, una célula muscular cardíaca, una célula del músculo esquelético, una célula del músculo liso, un mielocito, una célula mielóide, una célula madre mielóide, un mioblasto, una célula mioepitelial, un miofibroblasto, un neuroblasto, una célula neuroepitelial, una neurona, un odontoblasto, un osteoblasto, un osteoclasto, un osteocito, una célula oxíntica, una célula parafolicular, una célula paralútea, una célula péptica, un pericito, una célula mononuclear de sangre periférica, un feocromocito, una célula falángica, un pinealocito, un pituitocito, una célula de plasma, una plaqueta, un podocito, un proeritroblasto, un promonocito, un promieloblasto, un promielocito, un pronormoblasto, un reticulocito, una célula epitelial de pigmento retiniano, un retinoblasto, una célula pequeña, un somatotropo, una célula madre, una célula sustentacular, una célula teloglial o una célula zimogénica.

45 5. El uso de un ARNm sintetizado *in vitro* que comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina) en la preparación de un medicamento para inducir a una célula de mamífero a producir una proteína recombinante en terapia génica, donde dicho ARNm sintetizado *in vitro* comprende un marco abierto de lectura que codifica dicha proteína recombinante; en el que dicha terapia génica comprende la administración repetida de dicho ARNm sintetizado *in vitro* a un sujeto; y  
50 en el que la cantidad de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de dicho ARNm sintetizado *in vitro* es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\beta$  o IL-8 secretada en respuesta a la administración de un ARNm homólogo no modificado que no comprende  $\Psi$  o  $m^1\Psi$  (1-metilpseudouridina).

55 6. El uso de la reivindicación 5, en el que dicha proteína recombinante se selecciona del grupo que consiste en: eritropoyetina (EPO); un factor de transcripción seleccionado de MYC y SRY o MCOP; un factor de crecimiento o citocina seleccionados del grupo que consiste en factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta1 (TGF-beta1), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), hormona estimulante de los melanocitos  $\alpha$  (alfa-MSH); factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I); IL-4; IL-13; e IL-10; óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS); una proteína de choque térmico; Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística (CFTR); una encima con actividad antioxidante seleccionada de entre catalasa, fosfolípido hidróperóxido glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa-1 y superóxido dismutasa-2; tirosina quinasa de Bruton; adenosina desaminasa; ectonucleósido trifosfato difosfodihidrolasa; ABCA4 ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; APOA2; AVSD1; BRCD2; C1QA; C1QB; C1QG; C8A C8B; CACNA1S; CCV; CD3Z; CDC2L1; CHML; CHS1; CIAS1; CLCNKB; CMD1A; CMH2; CMM; COL11A1 COL8A2; COL9A2; CPT2; CRB1; CSE; CSF3R; CTPA; CTSK; DBT; DIO1; DISC1; DPYD; EKV; ENO1;

ENO1P EPB41; EPHX1; F13B; F5; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FCHL; FH; FMO3; FMO4; FUCA1; FY; GALE;  
 GBA GFND; GJA8; GJB3; GLC3B; HF1; HMGCL; HPC1; HRD; HRPT2; HSD3B2; HSPG2; KCNQ4; KCS; KIF1B;  
 LAMB3 LAMC2; LGMD1B; LMNA; LOR; MCKD1; MCL1; MPZ; MTHFR; MTR; MUTYH; MYOC; NB; NCF2; NEM1;  
 NPHS2 NPPA; NRAS; NTRK1; OPTA2; PBX1; PCHC; PGD; PHA2A; PHGDH; PKLR; PKP1; PLA2G2A; PLOD;  
 5 PPOX PPTO; PRCC; PRG4; PSEN2; PTOS1; REN; RFX5; RHD; RMD1; RPE65; SCCD; SERPINC1; SJS1;  
 SLC19A2 SLC2A1; SPG23; SPTA1; TAL1; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A;  
 VMGLOM; VWS WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACP1; AGXT; AHHR; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB;  
 BDE; BDMR; BJS BMPR2; CHRNA1; CMCWTD; CNGA3; COL3A1; COLAA3; COL4A4; COL6A3; CPS1; CRYGA;  
 CRYGEP1 CYP1B1; CYP27A1; DBI; DES; DYSF; EDAR; EFEMP1; EIF2AK3; ERCC3; FSHR; GINGF; GLC1B;  
 10 GPD2; GYPC HADHA; HADHB; HOXD13; HPE2; IGKC; IHH; IRS1; ITGA6; KHK; KYNU; LCT; LHCGR; LSFC;  
 MSH2; MSH6 NEB; NMTC; NPHP1; PAFAH1P1; PAX3; PAX8; PMS1; PNKD; PPH1; PROC; REG1A; SAG; SFTPB;  
 SLC11A1 SLC3A1; SOS1; SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70;  
 ZFH1B; ACAA1 AGS1; AGTR1; AHSB; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTG; CASR; CCR2; CCR5; CDL1;  
 CMT2B; COL7A1 CP; CPO; CRV; CTNNA1; DEM; ETM1; FANCD2; FIH; FOXL2; GBE1; GLB1; GLCLC; GNAI2;  
 15 GNAT1; GP9; GPX1 HGD; HRG; ITIH1; KNG; LPP; LRS1; MCCC1; MDS1; MHS4; MITF; MLH1; MYL3; MYMY;  
 OPA1; P2RY12; PBXP1 PCCB; POU1F1; PPARG; PROS1; PTHR1; RCA1; RHO; SCA7; SCLC1; SCN5A; SI;  
 SLC25A20; SLC2A2; TF TGFBR2; THPO; THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS; UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A;  
 XPC; ZNF35; ADH1B ADH1C; AFP; AGA; AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTDP2; ELONG;  
 ENAM; ETFDH EVC; F11; FABP2; FGA; FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC; GNPTA; GNRHR; GYPA; HCA; HCL2;  
 20 HD; HTN3 HVBS6; IDUA; IF; JPD; KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2; MSX1; MTP; NR3C2; PBT; PDE6B; PEE1;  
 PITX2 PKD2; QDPR; SGCB; SLC25A4; SNCA; SOD3; STATH; TAPVR1; TYS; WBS2; WFS1; WHCR; ADAMTS2;  
 ADRB2 AMCN; AP3B1; APC; ARSB; B4GALT7; BHR1; C6; C7; CCAL2; CKN1; CMDJ; CRHBP; CSF1R; DHFR;  
 DIAPH1 DTR; EOS; EPD; ERVR; F12; FBN2; GDNF; GHR; GLRA1; GM2A; HEXB; HSD17B4; ITGA2; KFS;  
 LGMDLA; LOX LTC4S; MAN2A1; MCC; MCCC2; MSH3; MSX2; NR3C1; PCSK1; PDE6A; PFBI; RASA1; SCZD1;  
 25 SDHA; SGCD SLC22A5; SLC26A2; SLC6A3; SM1; SMA@; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFB1;  
 ALDH5A1; ARG1 AS; ASSP2; BCKDHB; BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1; COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1;  
 ELOVL4; EPM2A ESR1; EYA4; F13A1; FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR; GSE; HCR; HFE; HLA-A; HLA-  
 DPB1; HLA-DRA HPFH; ICS1; IDDM1; IFNGR1; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCS1;  
 MUT; MYB NEU1; NKS1; NYS2; OA3; ODDD; OFCO; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7;  
 30 PKHD1; PLA2G7 PLG; POLH; PPAC; PSORS1; PUJO; RCD1; RDS; RHAG; RP14; RUNX2; RWS; SCA1; SCZD3;  
 SIASD; SOD2 ST8; TAP1; TAP2; TFAP2B; TNDM; TNF; TPBG; TPMT; TULP1; WISP3; AASS; ABCB1; ABCB4;  
 ACHE; AQP1 ASL; ASNS; AUTS1; BPGM; BRAF; C7orf2; CACNA2D1; CCM1; CD36; CFTR; CORDOMA; CLCN1;  
 CMH6 CMT2D; COL1A2; CRS; CYMD; DFNA5; DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1; FKBP6; GCK; GHRHR; GHS;  
 GLI3 GPD51; GUSB; HLXB9; HOXA13; HPFH2; HRX; IAB; IMMP2L; KCNH2; LAMBI; LEP; MET; NCF1; NM; OGDH  
 35 OPN1SW; PEX1; PGAM2; PMS2; PON1; PPP1R3A; PRSS1; PTC; PTPN12; RP10; RP9; SERPINE1; SGCE  
 SHFM1; SHH; SLC26A3; SLC26A4; SLOS; SMAD1; TBXAS1; TWIST; ZWS1; ACHM3; ADRB3; ANK1; CA1; CA2  
 CCAL1; CLN8; CMT4A; CNGB3; COH1; CPP; CRH; CYP11B1; CYP11B2; DECR1; DPYS; DURS1; EBS1; ECA1  
 EGI; EXT1; EYA1; FGFR1; GNRH1; GSR; GULOP; HR; KCNQ3; KFM; KWE; LGCR; LPL; MCPH1; MOS; MYC  
 NAT1; NAT2; NBS1; PLAT; PLEC1; PRKDC; PXMP3; RP1; SCZD6; SFTPC; SGM1; SPG5A; STAR; TG; TRPS1  
 40 TTPA; VMD1; WRN; ABCA1; ABL1; ABO; ADAMTS13; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP; AMCD1; ASS  
 BDMF; BSCL; C5; CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1; CRAT; DBH; DNAI1; DYS; DYT1; ENG; FANCC  
 FBP1; FCMD; FRDA; GALT; GLDC; GNE; GSM1; GSN; HSD17B3; HSN1; IBM2; INVS; JBTS1; LALL; LCCS1  
 LCCS; LGMD2H; LMX1B; MLLT3; MROS; MSSE; NOTCH1; ORM1; PAPPA; PIP5K1B; PTCH; PTGS1; RLN1 RLN2;  
 RMRP; ROR2; RPD1; SARDH; SPTLC1; STOM; TDFA; TEK; TMC1; TRIM32; TSC1; TYRP1; XPA; CACNB2  
 45 COL17A1; CUBN; CXCL12; CYP17; CYP2C19; CYP2C9; EGR2; EMX2; ERCC6; FGFR2; HK1; HPS1; IL2RA LGI1;  
 LIPA; MAT1A; MBL2; MKI67; MXI1; NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCBD; PEO1; PHYH; PNLIP; PSAP PTEN; RBP4;  
 RDPA; RET; SFTPA1; SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1; TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8 ACAT1; ALX4;  
 AMPD3; ANC; APOAL; APOA4; APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1; CD3E; CD3G CD59; CDKNLC;  
 CLN2; CNTF; CPT1A; CTSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT; DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2 F2; FSHB; FTH1;  
 50 G6PT1; G6PT2; GIF; HBB; HBBP1; HBD; HBE1; HBG1; HBG2; HMBS; HND; HOMG2; HRAS HVBS1; IDDM2;  
 IGER; INS; JBS; KCNJ11; KCNJ1; KCNQ1; LDHA; LRP5; MEN1; MLL; MYBPC3; MYO7A; NNO1 OPPG; OPTB1;  
 PAX6; PC; PDX1; PGL2; PGR; PORC; PTH; PTS; PVRL1; PYGM; RAG1; RAG2; ROM1; RRAS2 SAA1; SCA5;  
 SCZD2; SDHD; SERPING1; SMPD1; TCIRG1; TCL2; TECTA; TH; TREH; TSG101; TYR; USH1C VMD2; VRNI;  
 WT1; WT2; ZNF145; A2M; AAAS; ACADS; ACLS; ACVRL1; ALDH2; AMHR2; AOM; AQP2; ATD; ATP2A2; BDC;  
 55 CIR; CD4; CDK4; CNA1; COL2A1; CYP27B1; DRPLA; ENUR2; FEOM1; FGF23; FPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1;  
 HMGA2; HMN2; HPD; IGF1; KCNA1; KERA; KRAS2; KRT1; KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRTHB6;  
 LDHB; LYZ; MGCT; MPE; MVK; MYL2; OAP; PAH; PKBK; PRB3; PTPN11; PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1; SCA2;  
 SCNN1A; SMAL; SPPM; SPSMA; TBX3; TBX5; TCF1; TP11; TSC3; ULR; VDR; VWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1;  
 CLN5; CPB2; ED2; EDNRB; ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2; GJB6; IPF1; MBS1; MCOR; NYS4; PCCA; RB1;  
 60 RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2; SLC25A15; STARP1; ZNF198; ACHM1; ARVD1; BCH; CTAA1; DAD1; DFNB5;  
 EML1; GALC; GCH1; IBGC1; IGH@; grupo IGHC; IGHG1; IGHM; IGHR; IV; LTBP2; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C;  
 MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1; PSEN1; PYGL; RPGRIP1; SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7;  
 SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1; TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USHLA; VP; ACCPN; AHO2; ANCR; B2M; BBS4; BLM;  
 CAPN3; CDAN1; CDAN3; CLN6; CMH3; CYP19; CYP1A1; CYP1A2; DYX1; EPB42; ETFA; EYCL3; FAH; FBN1;  
 65 FES; HCVS; HEXA; IVD; LCS1; LIPC; MYO5A; OCA2; OTSC1; PWCR; RLBP1; SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A;  
 WMS; ABCC6; ALDOA; APRT; ATP2A1; BBS2; CARD15; CATM; CDH1; CETP; CHST6; CLN3; CREBBP; CTH;

- CTM; CYBA; CYLD; DHS; DNASA1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS; GAN; HAGH; HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1; HBZ; HBZP; HP; HSD11B2; IL4R; LIPB; MC1R; MEFV; MHC2TA; MLYCD; MMVP1; PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS; PMM2; PXE; SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2; VDI; WT3; ABR; ACACA; ACADVL; ACE; ALDH3A2; APOH; ASPA; AXIN2; BCL5; BHD; BLMH; BRCA1; CACD; CCA1; CCZS; CHRN1; CHRNE; CMT1A; COL1A1; CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR; GFAP; GH1; GH2; GP1BA; GPSC; GUCY2D; ITGA2B; ITGB3; ITGB4; KRT10; KRT12; KRT13; KRT14; KRT14L1; KRT14L2; KRT14L3; KRT16; KRT16L1; KRT16L2; KRT17; KRT9; MAPT; MDB; MDCR; MGI; MHS2; MKS1; MPO; MYO15A; NAGLU; NAPB; NF1; NME1; P4HB; PAFAH1B1; PECAM1; PEX12; PHB; PMP22; PRKAR1A; PRKCA; PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLAH; RARA; RCV1; RMSA1; RP17; RSS; SCN4A; SERPINF2; SGCA; SGSH; SHBG; SLC2A4; SLC4A1; SLC6A4; SMCR; SOST; SOX9; SSTR2; SYM1; SYNS1; TCF2; THRA; TIMP2; TOC; TOP2A; TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1; BCL2; CNSN; CORD1; CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO; LAMA3; LCFS2; MADH4; MAFD1; MC2R; MCL; MYP2; NPC1; SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE; ATHS; BAX; BCK-DHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A; CCO; CEACAM5; COMP; CRX; DBA; DDU; DFNA4; DLL3; DM1; DMWD; E11S; ELA2; EPOR; ERCC2; ETFB; EXT3; EYCL1; FTL; FUT1; FUT2; FUT6; GAMT; GCDH; GPI; GUSM; HB1; HCL1; HHC2; HHC3; ICAM3; INSR; JAK3; KLK3; LDLR; LHB; LIG1; LOH19CR1; LYL1; MAN2B1; MCOLN1; MDRV; MLLT1; NOTCH3; NPHS1; OFC3; OPA3; PEPD; PRPF31; PRTN3; PRX; PSG1; PVR; RYR1; SLC5A5; SLC7A9; STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNI3; TYROBP; ADA; AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5; GNAS; GSS; HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBI1; PCK1; PI3; PPCD; PPGB; PRNP; THBD; TOP1; AIRE; APP; CBS; COL6A1; COL6A2; CSTB; DCR; DSCR1; FPDMM; HLCS; HPE1; ITGB2; KCNE1; KNO; PRSS7; RUNX1; SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR; CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2; CSF2RB; CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR; DIA1; EWSR1; GGT1; MGC1; MN1; NAGA; NE2; OGS2; PDGFB; PPARA; PRODH; SCO2; SCZD4; SERPIND1; SLC5A1; SOX10; TCN2; TIMP3; TST; VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2; AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2; AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1; ARSC2; ARSE; ARTS; ARX; ASAT; ASSP5; ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS; BGN; BTK; BZX; C1HR; CACNA1F; CALB3; CBBM; CCT; CDR1; CFNS; CGF1; CHM; CHR39c; CIDX; CLA2; CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5; COL4A6; CPX; CVD1; CYBB; DCX; DFN2; DFN4; DFN6; DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1; ELK1; EMD; EVR2; F8; F9; FCP1; FDP5L5; FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDXY; GJB1; GK; GLA; GPC3; GRPR; GTD; GUST; HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2c; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2; JMS; KAL1; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGC1; MIC5; MID1; MLLT7; MLS; MRSD; MRX14; MRX1; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTM1; MYCL2; MYP1; NDP; NHS; NPHL1; NROB1; NSX; NYS1; NYX; OA1; OASD; OCRL; ODT1; OFD1; OPA2; OPD1; OPEM; OPN1LW; OPN1MW; OTC; P3; PDHA1; PDR; PFC; PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2; PHP; PIGA; PLP1; POF1; POLA; POU3F4; PPMX; PRD; PRPS1; PRPS2; PRS; RCCP2; RENBP; RENS1; RP2; RP6; RPGR; RPS4X; RPS6KA3; RS1; S11; SDYS; SEDL; SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX; SRS; STS; SYN1; SYP; TAF1; TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC; TIMM8A; TIM1; TKCR; TNFSF5; UBE1; UBE2A; WAS; WSN; WTS; WWS; XIC; XIST; XK; XM; XS; ZFX; ZIC3; ZNF261; ZNF41; ZNF6; AMELY; ASSP6; AZF1; AZF2; DAZ; GCY; SMCY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1; ASD1; ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3; CLN4; CSF2RA; CTS1; DF; DIH1; DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EEF1A1L14; EYCL2; FANCB; GCSH; GCSL; GIP; GTS; HHG; HMI; HOAC; HOKPP2; HRPT1; HSD3B3; HTC1; HV1S; ICHQ; ICR1; ICR5; IL3RA; KAL2; KMS; KRT18; KSS; LCAT; LHON; LMM; MANBB; MCPH2; MEB; MELAS; MIC2; MPFD; MS; MSS; MTATP6; MTCO1; MTCO3; MTCYB; MTND1; MTND2; MTND4; MTND5; MTND6; MTRNR1; MTRNR2; MTTE; MTTG; MTTI; MTTK; MTTL1; MTTL2; MTTN; MTTT; MTTT1; MTTT2; MTTT3; MTTT4; MTTT5; MTTT6; MTTT7; MTTT8; MTTT9; MTTT10; MTTT11; MTTT12; MTTT13; MTTT14; MTTT15; MTTT16; MTTT17; MTTT18; MTTT19; MTTT20; MTTT21; MTTT22; MTTT23; MTTT24; MTTT25; MTTT26; MTTT27; MTTT28; MTTT29; MTTT30; MTTT31; MTTT32; MTTT33; MTTT34; MTTT35; MTTT36; MTTT37; MTTT38; MTTT39; MTTT40; MTTT41; MTTT42; MTTT43; MTTT44; MTTT45; MTTT46; MTTT47; MTTT48; MTTT49; MTTT50; MTTT51; MTTT52; MTTT53; MTTT54; MTTT55; MTTT56; MTTT57; MTTT58; MTTT59; MTTT60; MTTT61; MTTT62; MTTT63; MTTT64; MTTT65; MTTT66; MTTT67; MTTT68; MTTT69; MTTT70; MTTT71; MTTT72; MTTT73; MTTT74; MTTT75; MTTT76; MTTT77; MTTT78; MTTT79; MTTT80; MTTT81; MTTT82; MTTT83; MTTT84; MTTT85; MTTT86; MTTT87; MTTT88; MTTT89; MTTT90; MTTT91; MTTT92; MTTT93; MTTT94; MTTT95; MTTT96; MTTT97; MTTT98; MTTT99; MTTT100; MTTT101; MTTT102; MTTT103; MTTT104; MTTT105; MTTT106; MTTT107; MTTT108; MTTT109; MTTT110; MTTT111; MTTT112; MTTT113; MTTT114; MTTT115; MTTT116; MTTT117; MTTT118; MTTT119; MTTT120; MTTT121; MTTT122; MTTT123; MTTT124; MTTT125; MTTT126; MTTT127; MTTT128; MTTT129; MTTT130; MTTT131; MTTT132; MTTT133; MTTT134; MTTT135; MTTT136; MTTT137; MTTT138; MTTT139; MTTT140; MTTT141; MTTT142; MTTT143; MTTT144; MTTT145; MTTT146; MTTT147; MTTT148; MTTT149; MTTT150; MTTT151; MTTT152; MTTT153; MTTT154; MTTT155; MTTT156; MTTT157; MTTT158; MTTT159; MTTT160; MTTT161; MTTT162; MTTT163; MTTT164; MTTT165; MTTT166; MTTT167; MTTT168; MTTT169; MTTT170; MTTT171; MTTT172; MTTT173; MTTT174; MTTT175; MTTT176; MTTT177; MTTT178; MTTT179; MTTT180; MTTT181; MTTT182; MTTT183; MTTT184; MTTT185; MTTT186; MTTT187; MTTT188; MTTT189; MTTT190; MTTT191; MTTT192; MTTT193; MTTT194; MTTT195; MTTT196; MTTT197; MTTT198; MTTT199; MTTT200; MTTT201; MTTT202; MTTT203; MTTT204; MTTT205; MTTT206; MTTT207; MTTT208; MTTT209; MTTT210; MTTT211; MTTT212; MTTT213; MTTT214; MTTT215; MTTT216; MTTT217; MTTT218; MTTT219; MTTT220; MTTT221; MTTT222; MTTT223; MTTT224; MTTT225; MTTT226; MTTT227; MTTT228; MTTT229; MTTT230; MTTT231; MTTT232; MTTT233; MTTT234; MTTT235; MTTT236; MTTT237; MTTT238; MTTT239; MTTT240; MTTT241; MTTT242; MTTT243; MTTT244; MTTT245; MTTT246; MTTT247; MTTT248; MTTT249; MTTT250; MTTT251; MTTT252; MTTT253; MTTT254; MTTT255; MTTT256; MTTT257; MTTT258; MTTT259; MTTT260; MTTT261; MTTT262; MTTT263; MTTT264; MTTT265; MTTT266; MTTT267; MTTT268; MTTT269; MTTT270; MTTT271; MTTT272; MTTT273; MTTT274; MTTT275; MTTT276; MTTT277; MTTT278; MTTT279; MTTT280; MTTT281; MTTT282; MTTT283; MTTT284; MTTT285; MTTT286; MTTT287; MTTT288; MTTT289; MTTT290; MTTT291; MTTT292; MTTT293; MTTT294; MTTT295; MTTT296; MTTT297; MTTT298; MTTT299; MTTT300; MTTT301; MTTT302; MTTT303; MTTT304; MTTT305; MTTT306; MTTT307; MTTT308; MTTT309; MTTT310; MTTT311; MTTT312; MTTT313; MTTT314; MTTT315; MTTT316; MTTT317; MTTT318; MTTT319; MTTT320; MTTT321; MTTT322; MTTT323; MTTT324; MTTT325; MTTT326; MTTT327; MTTT328; MTTT329; MTTT330; MTTT331; MTTT332; MTTT333; MTTT334; MTTT335; MTTT336; MTTT337; MTTT338; MTTT339; MTTT340; MTTT341; MTTT342; MTTT343; MTTT344; MTTT345; MTTT346; MTTT347; MTTT348; MTTT349; MTTT350; MTTT351; MTTT352; MTTT353; MTTT354; MTTT355; MTTT356; MTTT357; MTTT358; MTTT359; MTTT360; MTTT361; MTTT362; MTTT363; MTTT364; MTTT365; MTTT366; MTTT367; MTTT368; MTTT369; MTTT370; MTTT371; MTTT372; MTTT373; MTTT374; MTTT375; MTTT376; MTTT377; MTTT378; MTTT379; MTTT380; MTTT381; MTTT382; MTTT383; MTTT384; MTTT385; MTTT386; MTTT387; MTTT388; MTTT389; MTTT390; MTTT391; MTTT392; MTTT393; MTTT394; MTTT395; MTTT396; MTTT397; MTTT398; MTTT399; MTTT400; MTTT401; MTTT402; MTTT403; MTTT404; MTTT405; MTTT406; MTTT407; MTTT408; MTTT409; MTTT410; MTTT411; MTTT412; MTTT413; MTTT414; MTTT415; MTTT416; MTTT417; MTTT418; MTTT419; MTTT420; MTTT421; MTTT422; MTTT423; MTTT424; MTTT425; MTTT426; MTTT427; MTTT428; MTTT429; MTTT430; MTTT431; MTTT432; MTTT433; MTTT434; MTTT435; MTTT436; MTTT437; MTTT438; MTTT439; MTTT440; MTTT441; MTTT442; MTTT443; MTTT444; MTTT445; MTTT446; MTTT447; MTTT448; MTTT449; MTTT450; MTTT451; MTTT452; MTTT453; MTTT454; MTTT455; MTTT456; MTTT457; MTTT458; MTTT459; MTTT460; MTTT461; MTTT462; MTTT463; MTTT464; MTTT465; MTTT466; MTTT467; MTTT468; MTTT469; MTTT470; MTTT471; MTTT472; MTTT473; MTTT474; MTTT475; MTTT476; MTTT477; MTTT478; MTTT479; MTTT480; MTTT481; MTTT482; MTTT483; MTTT484; MTTT485; MTTT486; MTTT487; MTTT488; MTTT489; MTTT490; MTTT491; MTTT492; MTTT493; MTTT494; MTTT495; MTTT496; MTTT497; MTTT498; MTTT499; MTTT500; MTTT501; MTTT502; MTTT503; MTTT504; MTTT505; MTTT506; MTTT507; MTTT508; MTTT509; MTTT510; MTTT511; MTTT512; MTTT513; MTTT514; MTTT515; MTTT516; MTTT517; MTTT518; MTTT519; MTTT520; MTTT521; MTTT522; MTTT523; MTTT524; MTTT525; MTTT526; MTTT527; MTTT528; MTTT529; MTTT530; MTTT531; MTTT532; MTTT533; MTTT534; MTTT535; MTTT536; MTTT537; MTTT538; MTTT539; MTTT540; MTTT541; MTTT542; MTTT543; MTTT544; MTTT545; MTTT546; MTTT547; MTTT548; MTTT549; MTTT550; MTTT551; MTTT552; MTTT553; MTTT554; MTTT555; MTTT556; MTTT557; MTTT558; MTTT559; MTTT560; MTTT561; MTTT562; MTTT563; MTTT564; MTTT565; MTTT566; MTTT567; MTTT568; MTTT569; MTTT570; MTTT571; MTTT572; MTTT573; MTTT574; MTTT575; MTTT576; MTTT577; MTTT578; MTTT579; MTTT580; MTTT581; MTTT582; MTTT583; MTTT584; MTTT585; MTTT586; MTTT587; MTTT588; MTTT589; MTTT590; MTTT591; MTTT592; MTTT593; MTTT594; MTTT595; MTTT596; MTTT597; MTTT598; MTTT599; MTTT600; MTTT601; MTTT602; MTTT603; MTTT604; MTTT605; MTTT606; MTTT607; MTTT608; MTTT609; MTTT610; MTTT611; MTTT612; MTTT613; MTTT614; MTTT615; MTTT616; MTTT617; MTTT618; MTTT619; MTTT620; MTTT621; MTTT622; MTTT623; MTTT624; MTTT625; MTTT626; MTTT627; MTTT628; MTTT629; MTTT630; MTTT631; MTTT632; MTTT633; MTTT634; MTTT635; MTTT636; MTTT637; MTTT638; MTTT639; MTTT640; MTTT641; MTTT642; MTTT643; MTTT644; MTTT645; MTTT646; MTTT647; MTTT648; MTTT649; MTTT650; MTTT651; MTTT652; MTTT653; MTTT654; MTTT655; MTTT656; MTTT657; MTTT658; MTTT659; MTTT660; MTTT661; MTTT662; MTTT663; MTTT664; MTTT665; MTTT666; MTTT667; MTTT668; MTTT669; MTTT670; MTTT671; MTTT672; MTTT673; MTTT674; MTTT675; MTTT676; MTTT677; MTTT678; MTTT679; MTTT680; MTTT681; MTTT682; MTTT683; MTTT684; MTTT685; MTTT686; MTTT687; MTTT688; MTTT689; MTTT690; MTTT691; MTTT692; MTTT693; MTTT694; MTTT695; MTTT696; MTTT697; MTTT698; MTTT699; MTTT700; MTTT701; MTTT702; MTTT703; MTTT704; MTTT705; MTTT706; MTTT707; MTTT708; MTTT709; MTTT710; MTTT711; MTTT712; MTTT713; MTTT714; MTTT715; MTTT716; MTTT717; MTTT718; MTTT719; MTTT720; MTTT721; MTTT722; MTTT723; MTTT724; MTTT725; MTTT726; MTTT727; MTTT728; MTTT729; MTTT730; MTTT731; MTTT732; MTTT733; MTTT734; MTTT735; MTTT736; MTTT737; MTTT738; MTTT739; MTTT740; MTTT741; MTTT742; MTTT743; MTTT744; MTTT745; MTTT746; MTTT747; MTTT748; MTTT749; MTTT750; MTTT751; MTTT752; MTTT753; MTTT754; MTTT755; MTTT756; MTTT757; MTTT758; MTTT759; MTTT760; MTTT761; MTTT762; MTTT763; MTTT764; MTTT765; MTTT766; MTTT767; MTTT768; MTTT769; MTTT770; MTTT771; MTTT772; MTTT773; MTTT774; MTTT775; MTTT776; MTTT777; MTTT778; MTTT779; MTTT780; MTTT781; MTTT782; MTTT783; MTTT784; MTTT785; MTTT786; MTTT787; MTTT788; MTTT789; MTTT790; MTTT791; MTTT792; MTTT793; MTTT794; MTTT795; MTTT796; MTTT797; MTTT798; MTTT799; MTTT800; MTTT801; MTTT802; MTTT803; MTTT804; MTTT805; MTTT806; MTTT807; MTTT808; MTTT809; MTTT810; MTTT811; MTTT812; MTTT813; MTTT814; MTTT815; MTTT816; MTTT817; MTTT818; MTTT819; MTTT820; MTTT821; MTTT822; MTTT823; MTTT824; MTTT825; MTTT826; MTTT827; MTTT828; MTTT829; MTTT830; MTTT831; MTTT832; MTTT833; MTTT834; MTTT835; MTTT836; MTTT837; MTTT838; MTTT839; MTTT840; MTTT841; MTTT842; MTTT843; MTTT844; MTTT845; MTTT846; MTTT847; MTTT848; MTTT849; MTTT850; MTTT851; MTTT852; MTTT853; MTTT854; MTTT855; MTTT856; MTTT857; MTTT858; MTTT859; MTTT860; MTTT861; MTTT862; MTTT863; MTTT864; MTTT865; MTTT866; MTTT867; MTTT868; MTTT869; MTTT870; MTTT871; MTTT872; MTTT873; MTTT874; MTTT875; MTTT876; MTTT877; MTTT878; MTTT879; MTTT880; MTTT881; MTTT882; MTTT883; MTTT884; MTTT885; MTTT886; MTTT887; MTTT888; MTTT889; MTTT890; MTTT891; MTTT892; MTTT893; MTTT894; MTTT895; MTTT896; MTTT897; MTTT898; MTTT899; MTTT900; MTTT901; MTTT902; MTTT903; MTTT904; MTTT905; MTTT906; MTTT907; MTTT908; MTTT909; MTTT910; MTTT911; MTTT912; MTTT913; MTTT914; MTTT915; MTTT916; MTTT917; MTTT918; MTTT919; MTTT920; MTTT921; MTTT922; MTTT923; MTTT924; MTTT925; MTTT926; MTTT927; MTTT928; MTTT929; MTTT930; MTTT931; MTTT932; MTTT933; MTTT934; MTTT935; MTTT936; MTTT937; MTTT938; MTTT939; MTTT940; MTTT941; MTTT942; MTTT943; MTTT944; MTTT945; MTTT946; MTTT947; MTTT948; MTTT949; MTTT950; MTTT951; MTTT952; MTTT953; MTTT954; MTTT955; MTTT956; MTTT957; MTTT958; MTTT959; MTTT960; MTTT961; MTTT962; MTTT963; MTTT964; MTTT965; MTTT966; MTTT967; MTTT968; MTTT969; MTTT970; MTTT971; MTTT972; MTTT973; MTTT974; MTTT975; MTTT976; MTTT977; MTTT978; MTTT979; MTTT980; MTTT981; MTTT982; MTTT983; MTTT984; MTTT985; MTTT986; MTTT987; MTTT988; MTTT989; MTTT990; MTTT991; MTTT992; MTTT993; MTTT994; MTTT995; MTTT996; MTTT997; MTTT998; MTTT999; MTTT1000; MTTT1001; MTTT1002; MTTT1003; MTTT1004; MTTT1005; MTTT1006; MTTT1007; MTTT1008; MTTT1009; MTTT1010; MTTT1011; MTTT1012; MTTT1013; MTTT1014; MTTT1015; MTTT1016; MTTT1017; MTTT1018; MTTT1019; MTTT1020; MTTT1021; MTTT1022; MTTT1023; MTTT1024; MTTT1025; MTTT1026; MTTT1027; MTTT1028; MTTT1029; MTTT1030; MTTT1031; MTTT1032; MTTT1033; MTTT1034; MTTT1035; MTTT1036; MTTT1037; MTTT1038; MTTT1039; MTTT1040; MTTT1041; MTTT1042; MTTT1043; MTTT1044; MTTT1045; MTTT1046; MTTT1047; MTTT1048; MTTT1049; MTTT1050; MTTT1051; MTTT1052; MTTT1053; MTTT1054; MTTT1055; MTTT1056; MTTT1057; MTTT1058; MTTT1059; MTTT1060; MTTT1061; MTTT1062; MTTT1063; MTTT1064; MTTT1065; MTTT1066; MTTT1067; MTTT1068; MTTT1069; MTTT1070; MTTT1071; MTTT1072; MTTT1073; MTTT1074; MTTT1075; MTTT1076; MTTT1077; MTTT1078; MTTT1079; MTTT1080; MTTT1081; MTTT1082; MTTT1083; MTTT1084; MTTT1085; MTTT1086; MTTT1087; MTTT1088; MTTT1089; MTTT1090; MTTT1091; MTTT1092; MTTT1093; MTTT1094; MTTT1095; MTTT1096; MTTT1097; MTTT1098; MTTT1099; MTTT1100; MTTT1101; MTTT1102; MTTT1103; MTTT1104; MTTT1105; MTTT1106; MTTT1107; MTTT1108; MTTT1109; MTTT1110; MTTT1111; MTTT1112; MTTT1113; MTTT1114; MTTT1115; MTTT1116; MTTT1117; MTTT1118; MTTT1119; MTTT1120; MTTT1121; MTTT1122; MTTT1123; MTTT1124; MTTT1125; MTTT1126; MTTT1127; MTTT1128; MTTT1129; MTTT1130; MTTT1131; MTTT1132; MTTT1133; MTTT1134; MTTT1135; MTTT1136; MTTT1137; MTTT1138; MTTT1139; MTTT1140; MTTT1141; MTTT1142; MTTT1143; MTTT1144; MTTT1145; MTTT1146; MTTT1147; MTTT1148; MTTT1149; MTTT1150; MTTT1151; MTTT1152; MTTT1153; MTTT1154; MTTT1155; MTTT1156; MTTT1157; MTTT1158; MTTT1159; MTTT1160; MTTT1161; MTTT1162; MTTT1163; MTTT1164; MTTT1165; MTTT1166; MTTT1167; MTTT1168; MTTT1169; MTTT1170; MTTT1171; MTTT1172; MTTT1173; MTTT1174; MTTT1175; MTTT1176; MTTT1177; MTTT1178; MTTT1179; MTTT1180; MTTT1181; MTTT1182; MTTT1183; MTTT1184; MTTT1185; MTTT1186; MTTT1187; MTTT1188; MTTT1189; MTTT1190; MTTT1191; MTTT1192; MTTT1193; MTTT1194; MTTT1195; MTTT1196; MTTT1197; MTTT1198; MTTT1199; MTTT1200; MTTT1201; MTTT1202; MTTT1203; MTTT1204; MTTT1205; MTTT1206; MTTT1207; MTTT1208; MTTT1209; MTTT1210; MTTT1211; MTTT1212; MTTT1213; MTTT1214; MTTT1215; MTTT1216; MTTT1217; MTTT1218; MTTT1219; MTTT1220; MTTT1221; MTTT1222; MTTT1223; MTTT1224; MTTT1225; MTTT1226; MTTT1227; MTTT1228; MTTT1229; MTTT1230; MTTT1231; MTTT1232; MTTT1233; MTTT1234; MTTT1235; MTTT1236; MTTT1237; MTTT1238; MTTT1239; MTTT1240; MTTT1241; MTTT1242; MTTT1243; MTTT1244; MTTT1245; MTTT1246; MTTT1247; MTTT1248; MTTT1249; MTTT1250; MTTT1251; MTTT1252; MTTT1253; MTTT1254; MTTT1255; MTTT1256; MTTT1257; MTTT1258; MTTT1259; MTTT1260; MTTT1261; MTTT1262; MTTT1263; MTTT1264; MTTT1265; MTTT1266; MTTT1267; MTTT1268; MTTT1269; MTTT1270; MTTT1271; MTTT1272; MTTT1273; MTTT1274; MTTT1275; MTTT1276; MTTT1277; MTTT1278; MTTT1279; MTTT1280; MTTT1281; MTTT1282; MTTT1283; MTTT1284; MTTT1285; MTTT1286; MTTT1287; MTTT1288; MTTT1289; MTTT1290; MTTT1291; MTTT1292; MTTT1293; MTTT1294; MTTT1295; MTTT1296; MTTT1297; MTTT1298; MTTT1299; MTTT1300; MTTT1301; MTTT1302; MTTT1303; MTTT1304; MTTT1305; MTTT1306; MTTT1307; MTTT1308; MTTT1309; MTTT1310; MTTT1311; MTTT1312; MTTT1313; MTTT1314; MTTT1315; MTTT1316; MTTT1317; MTTT1318; MTTT1319; MTTT1320; MTTT1321; MTTT1322; MTTT1323; MTTT1324; MTTT1325; MTTT1326; MTTT1327; MTTT1328; MTTT1329; MTTT1330; MTTT1331; MTTT1332; MTTT1333; MTTT1334; MTTT1335; MTTT1336; MTTT1337; MTTT1338; MTTT1339; MTTT1340; MTTT1341; MTTT1342; MTTT1343; MTTT1344; MTTT1345; MTTT1346; MTTT1347; MTTT1348; MTTT1349; MTTT1350; MTTT1351; MTTT1352; MTTT1353; MTTT1354; MTTT1355; MTTT1356; MTTT1357; MTTT1358; MTTT1359; MTTT1360; MTTT1361; MTTT1362; MTTT1363; MTTT1364; MTTT1365; MTTT1366; MTTT1367; MTTT1368; MTTT1369; MTTT1370; MTTT1371; MTTT1372; MTTT1373; MTTT1374; MTTT1375; MTTT1376; MTTT1377; MTTT1378; MTTT1379; MTTT1380; MTTT1381; MTTT1382; MTTT1383; MTTT1384; MTTT1385; MTTT1386; MTTT1387; MTTT1388

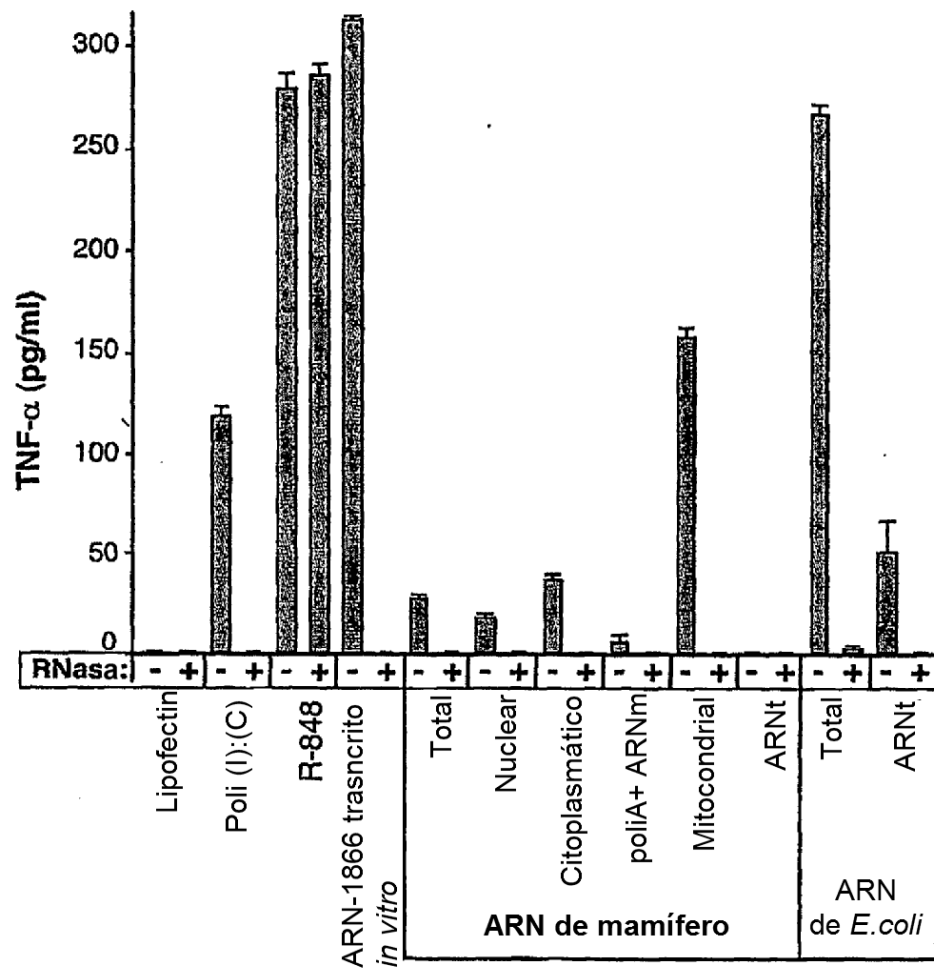


Figura 1

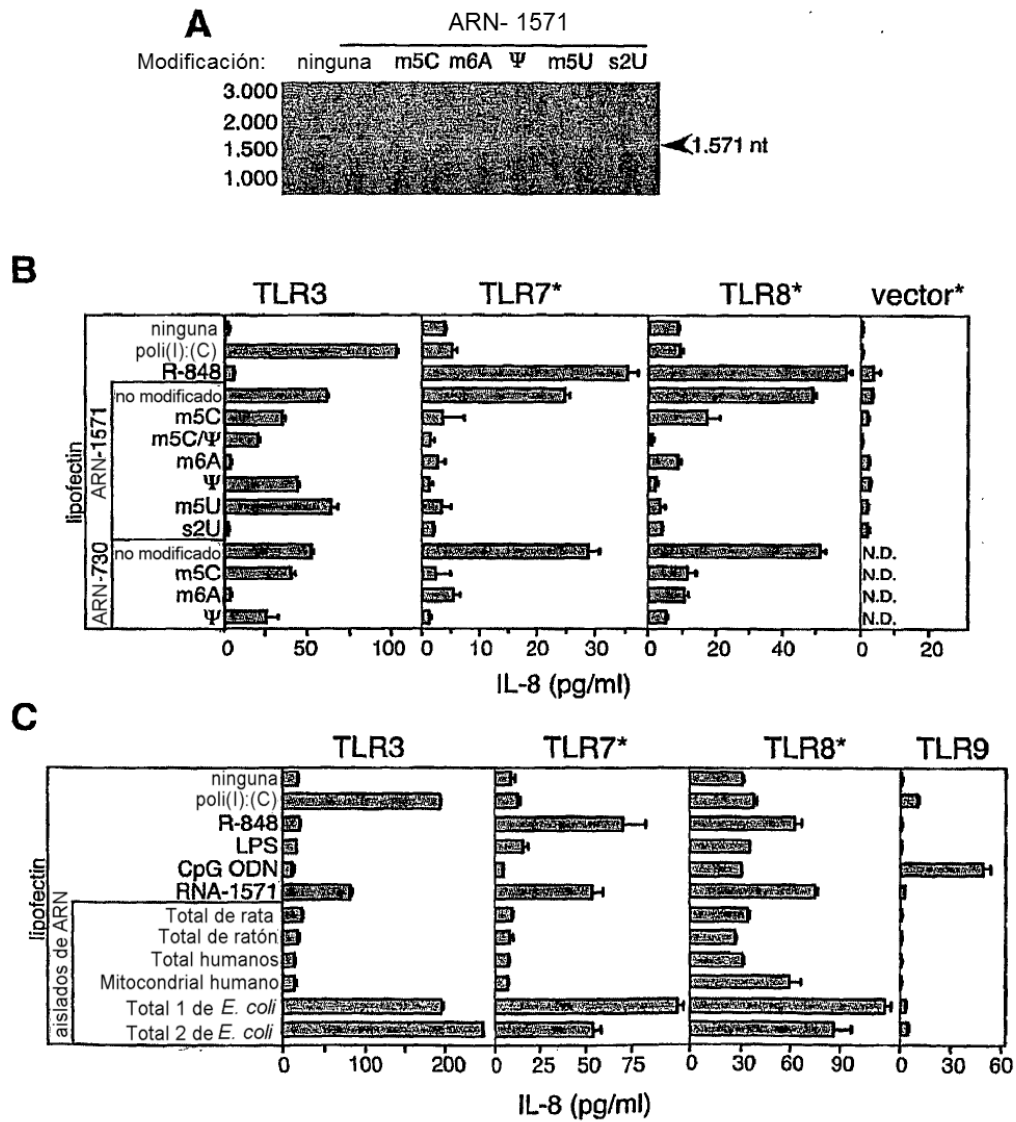


Figura 2

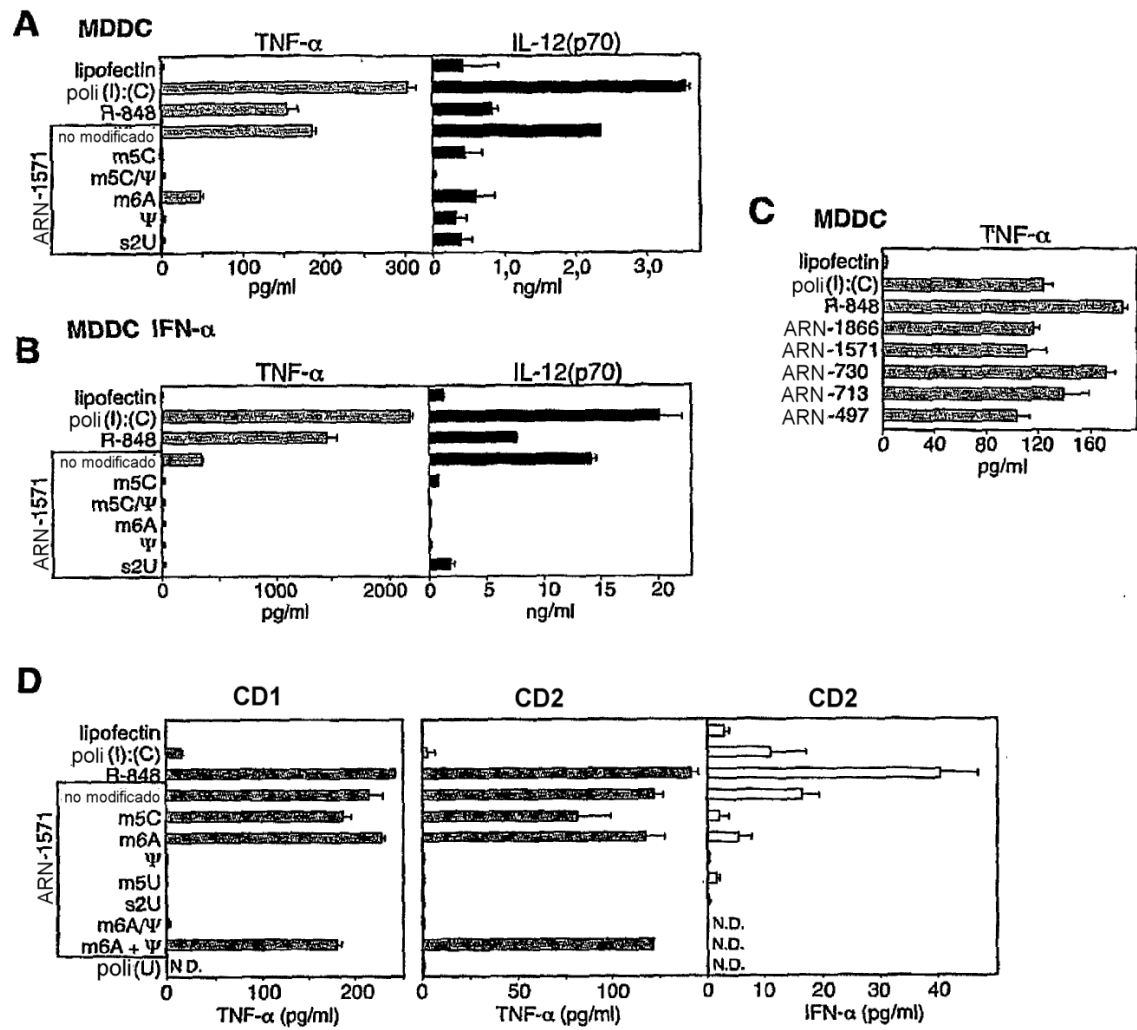


Figura 3A-D

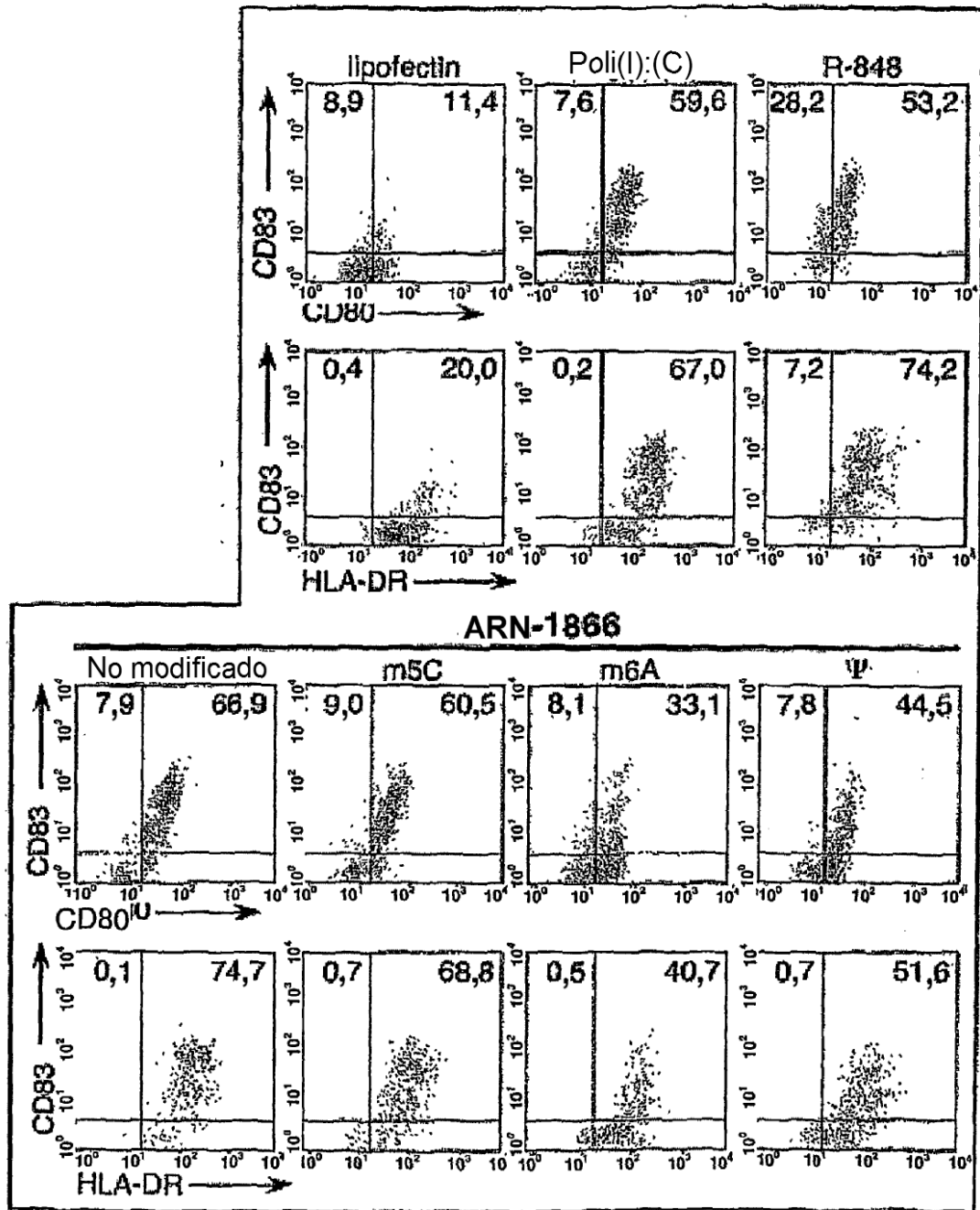
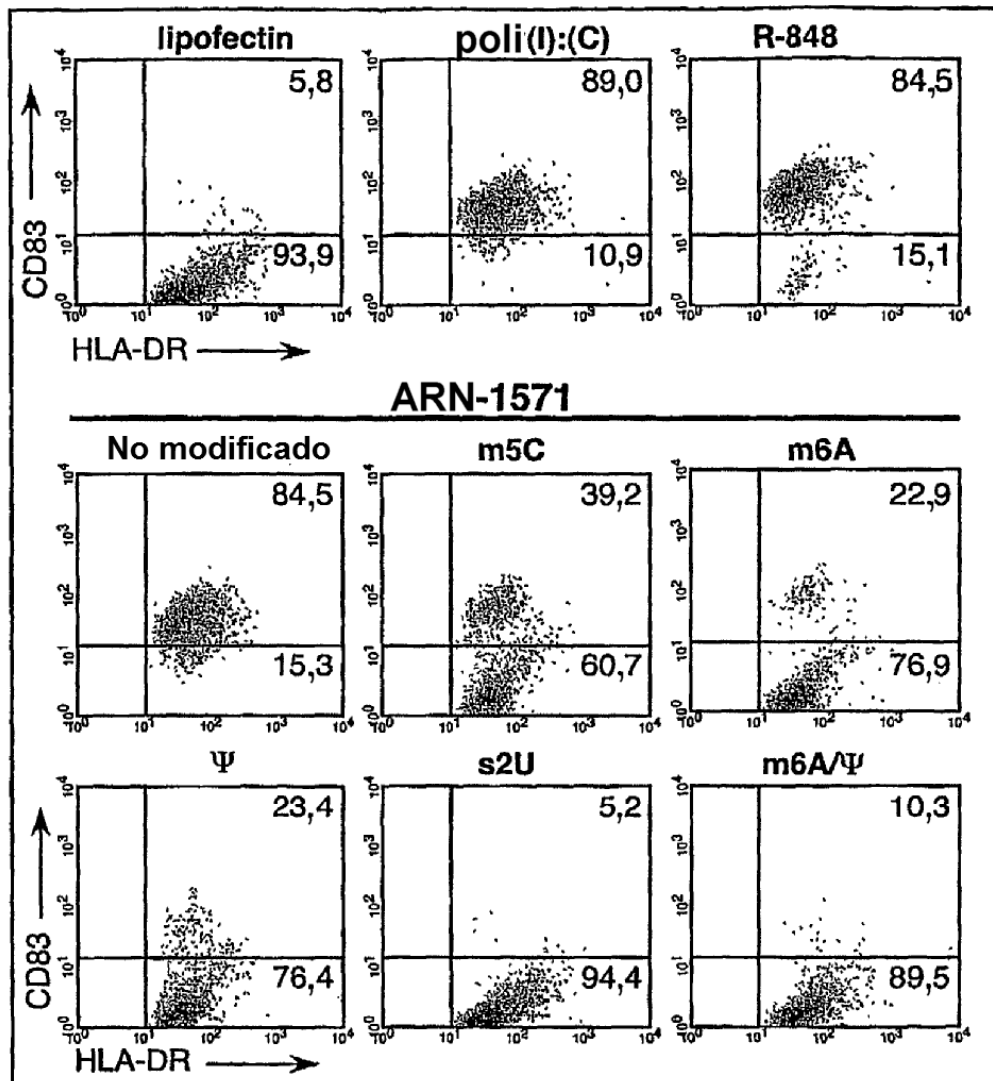


Figura 3E

**A****B**

|               | TNF- $\alpha$ * | CD80                | CD86  |
|---------------|-----------------|---------------------|-------|
|               | pg/ml           | Fluorescencia media |       |
| lipofectin    | 0               | 7,6                 | 55,3  |
| poli(I):(C)   | 45,6            | 59,4                | 257,4 |
| R848          | 48,3            | 55,2                | 235,4 |
| ARN-1866      |                 |                     |       |
| no modificado | 26,7            | 52,7                | 246,4 |
| m5C           | 0               | 16,4                | 108,6 |
| m6A           | 0               | 12,4                | 78,4  |
| ψ             | 0               | 12,0                | 87,5  |
| s2U           | 0               | 8,0                 | 62,7  |
| m6A/ψ         | 0               | 8,6                 | 68,4  |

Figura 4

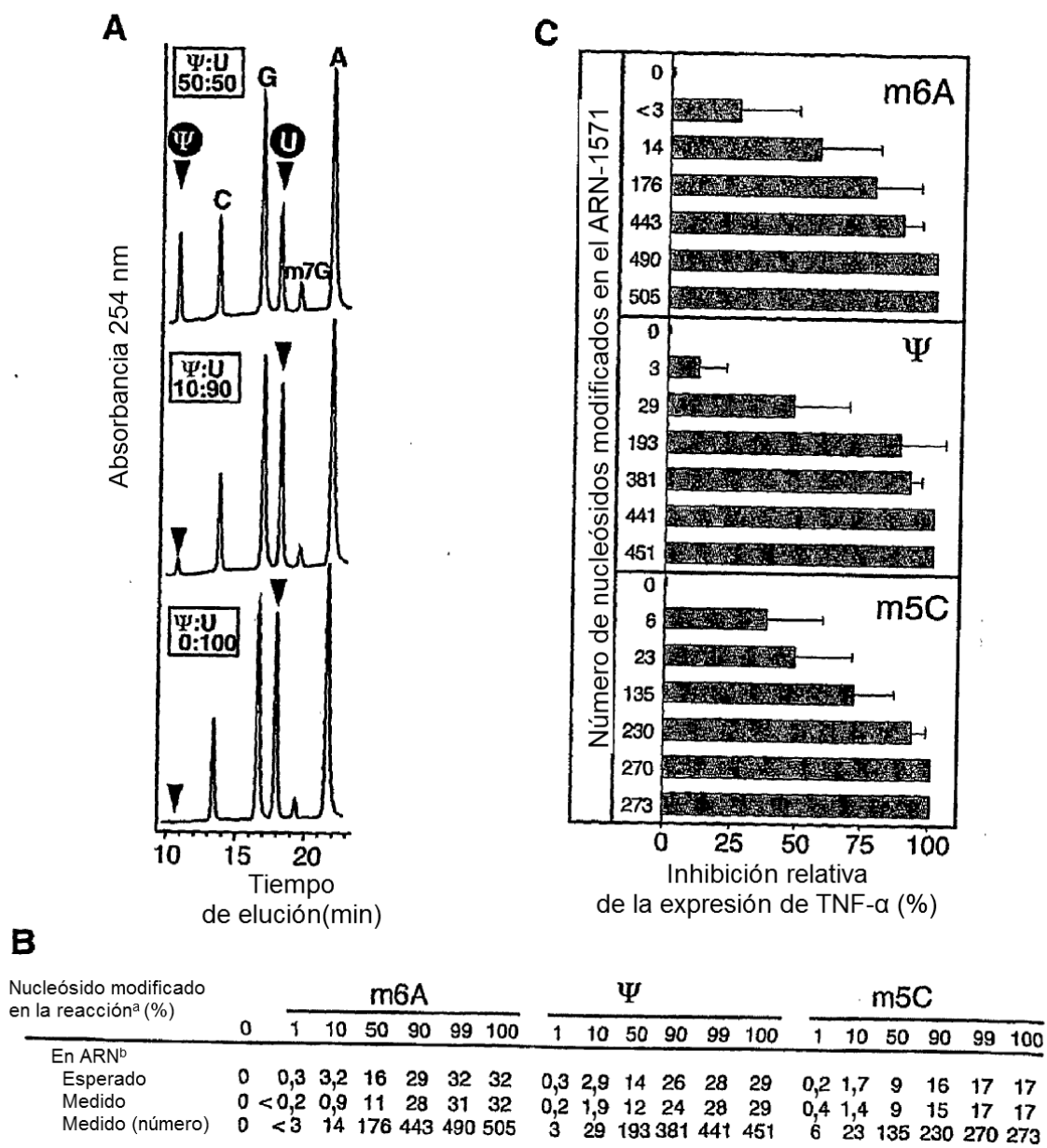


Figura 5

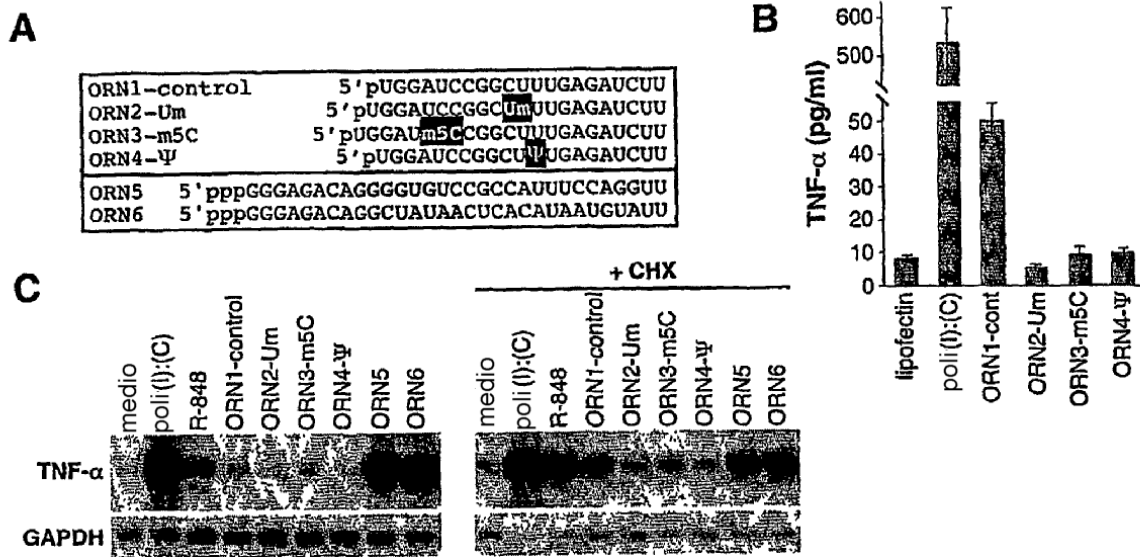


Figura 6

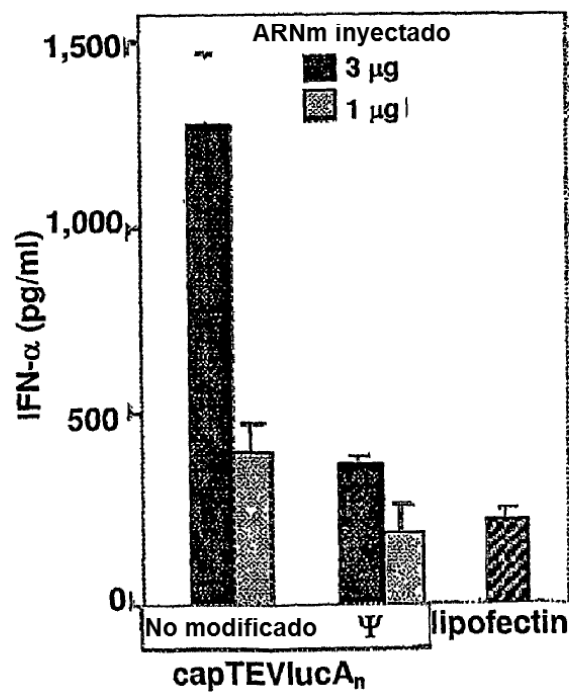


Figura 7A

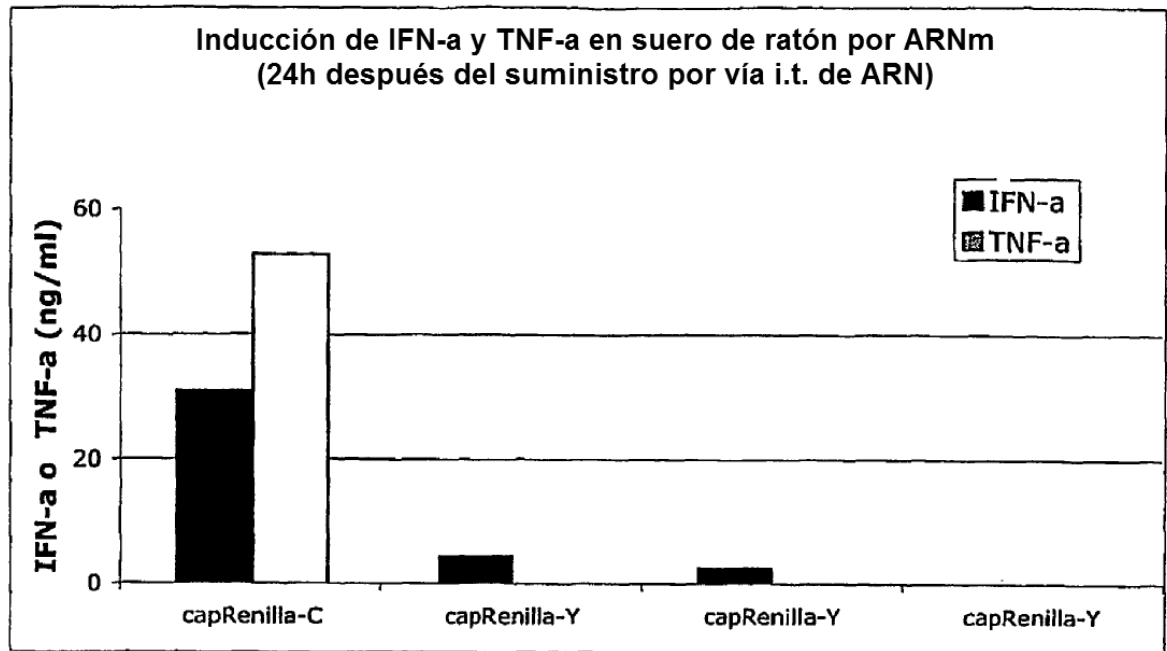


Figura 7B

### Activación de PKR por ARNm

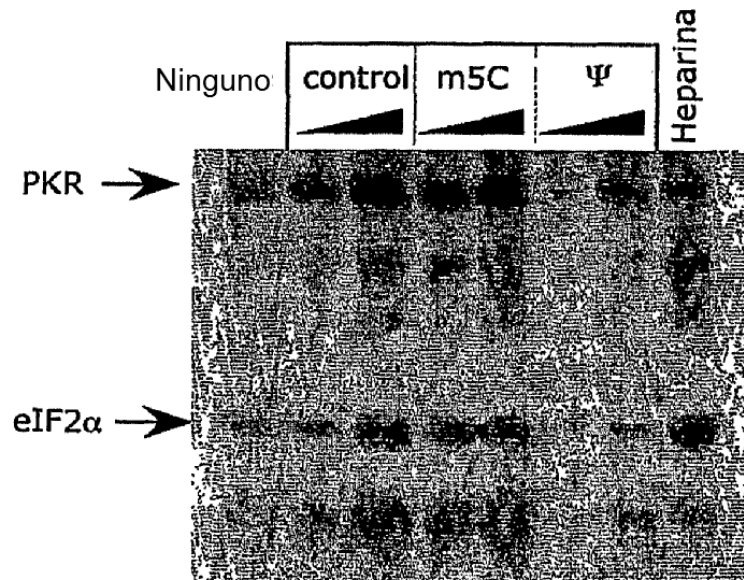


Figura 8

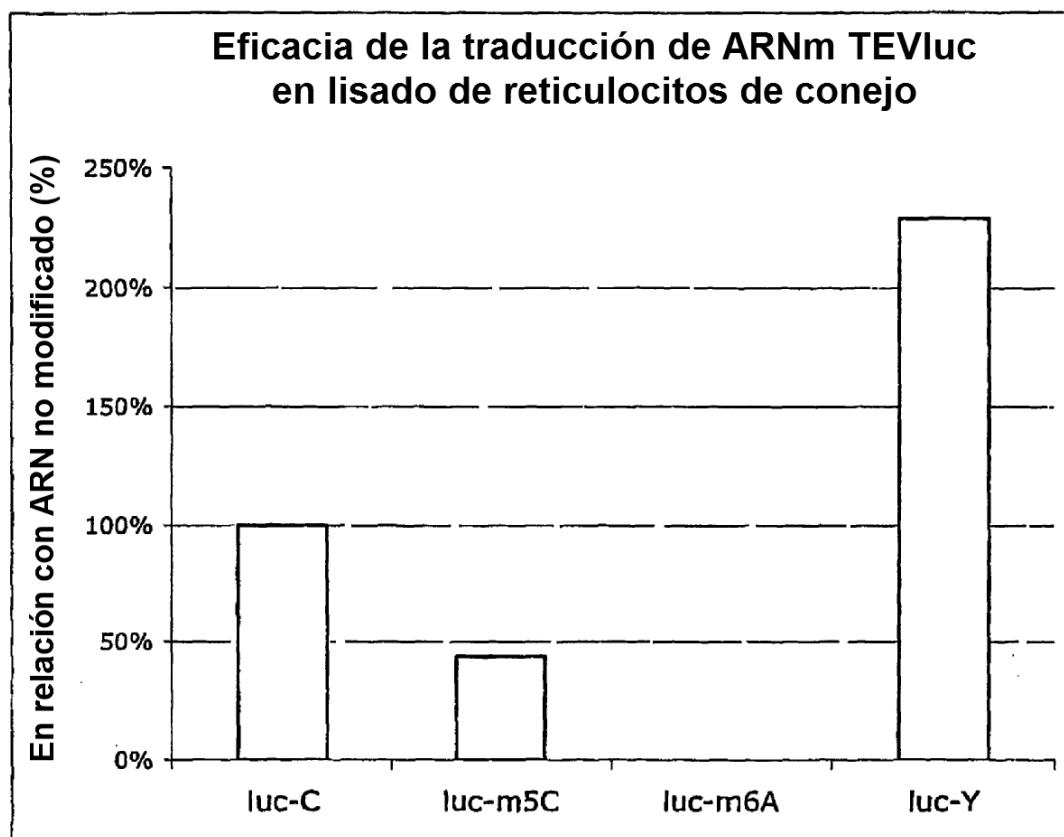


Figura 9

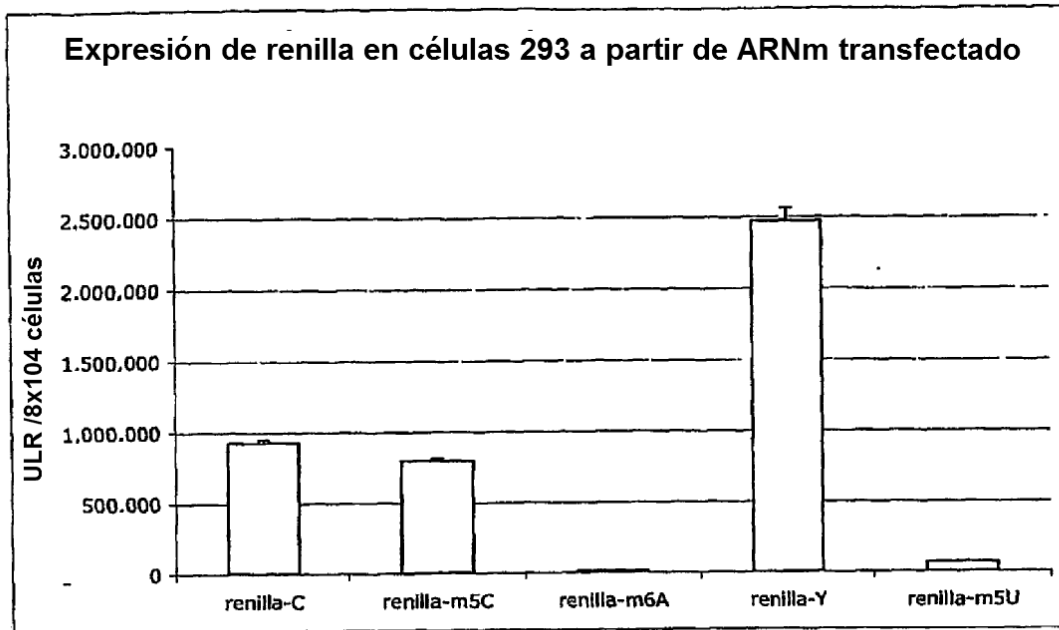


Figura 10A

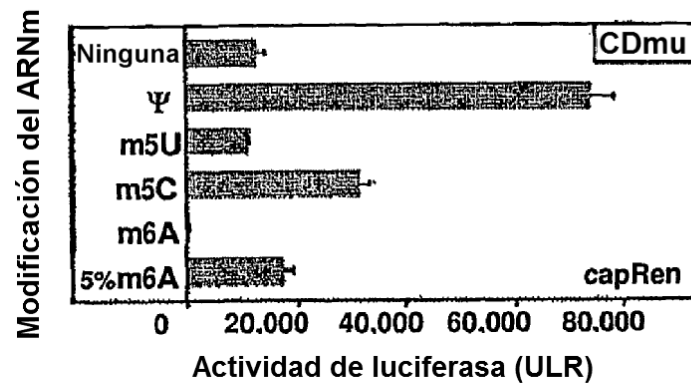


Figura 10B

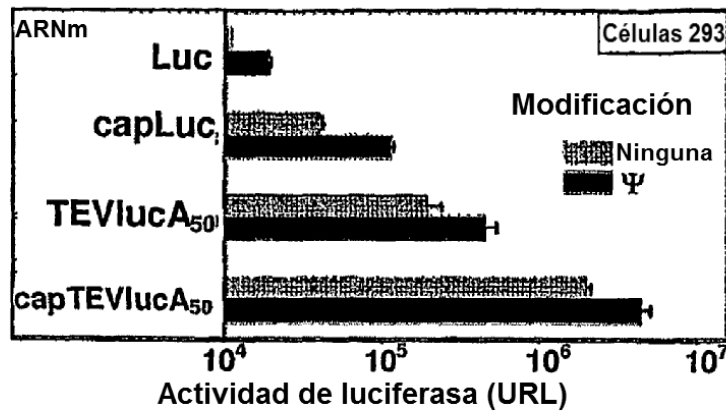


Figura 11A

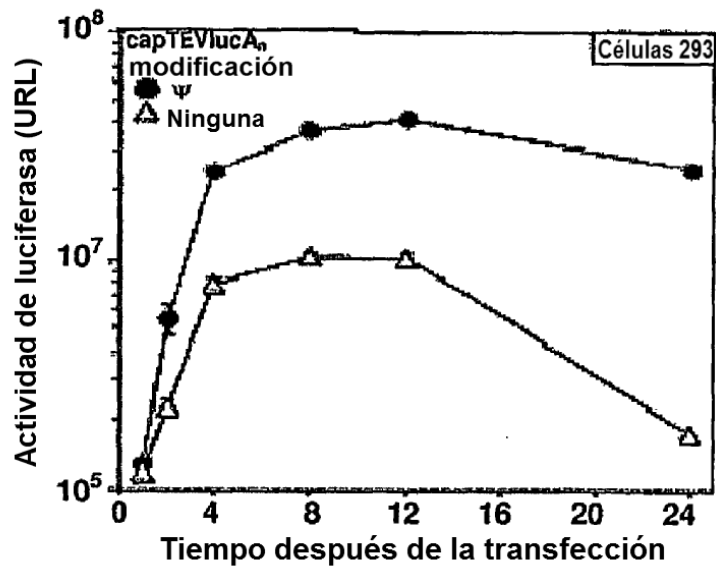


Figura 11B

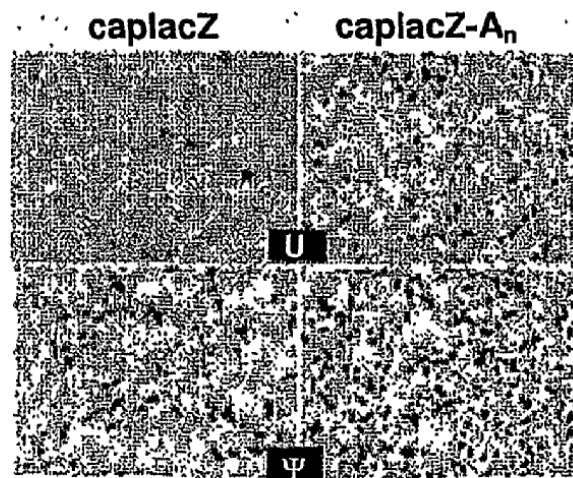


Figura 11C

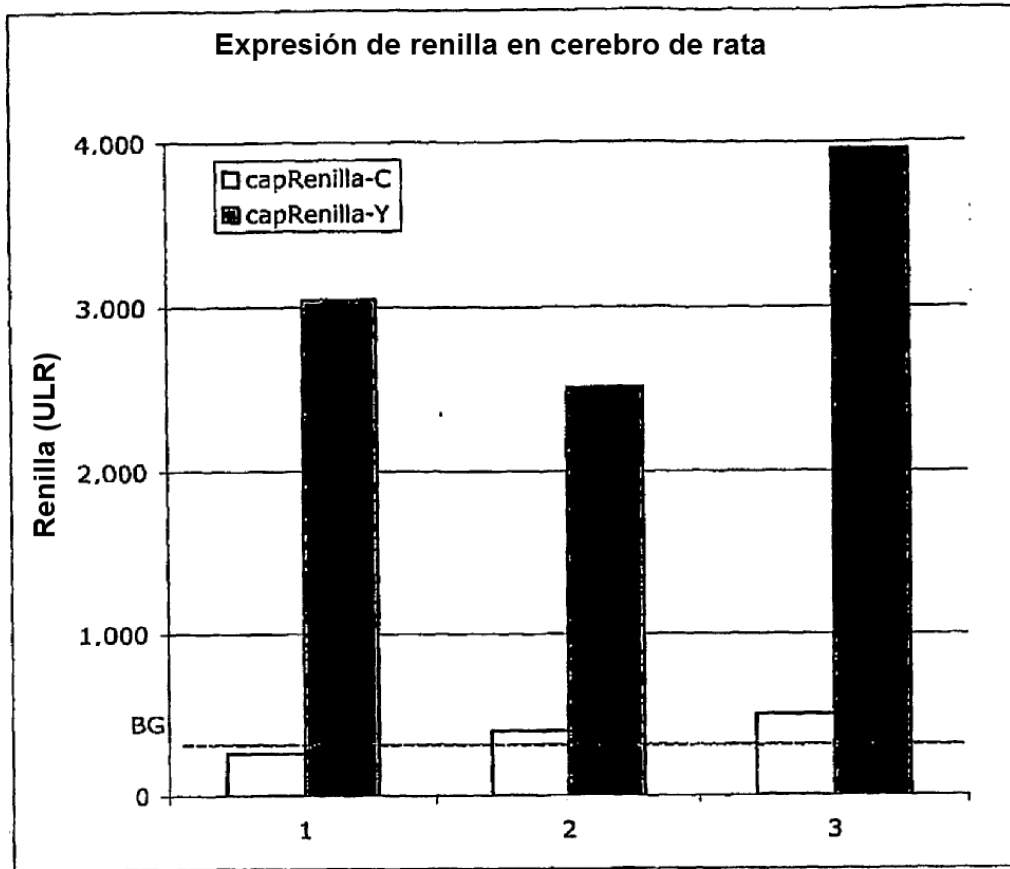


Figura 12A

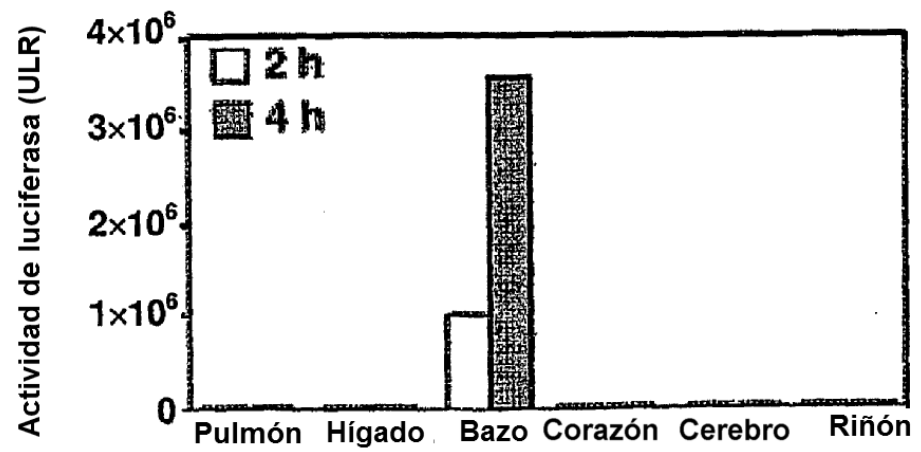


Figura 12B

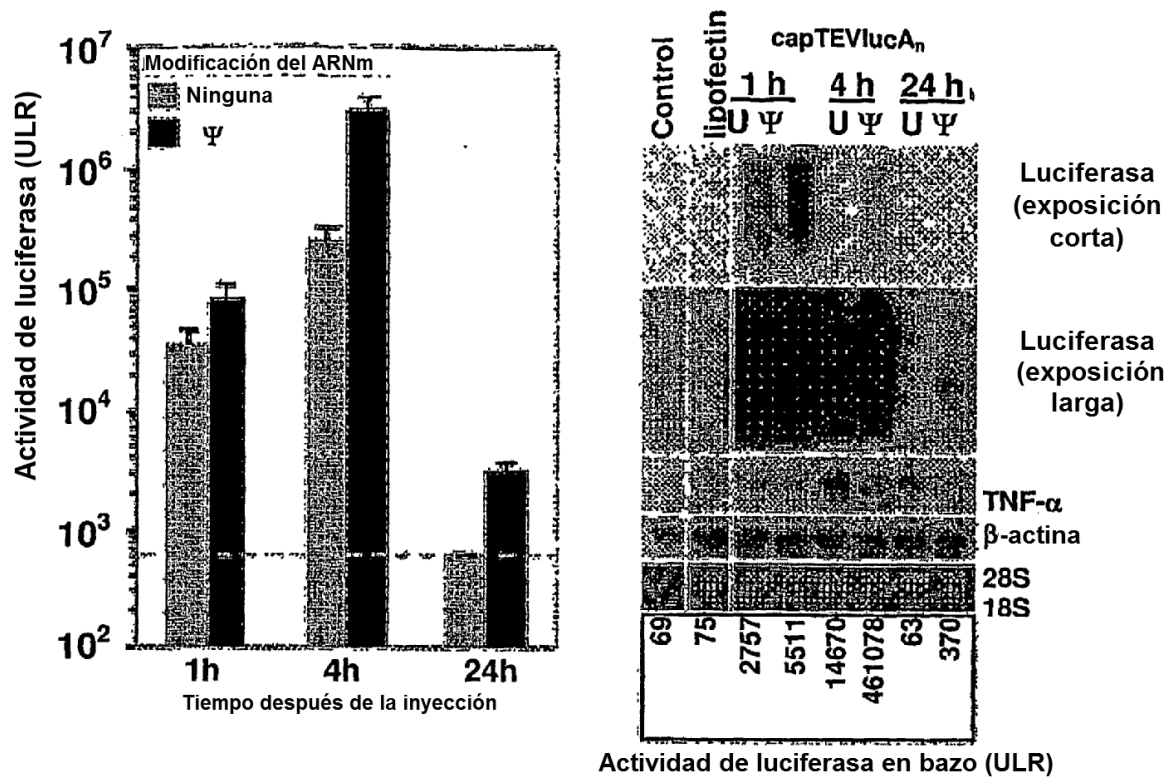


Figura 12C

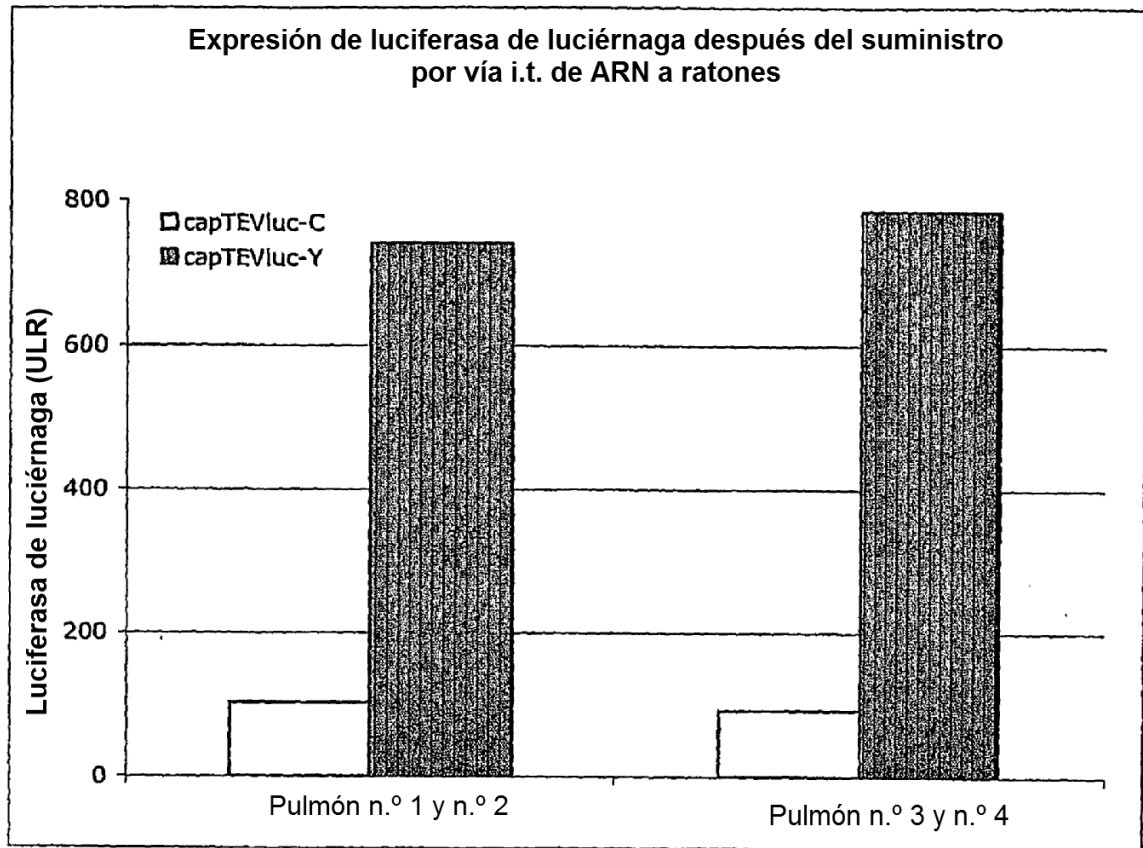


Figura 12D

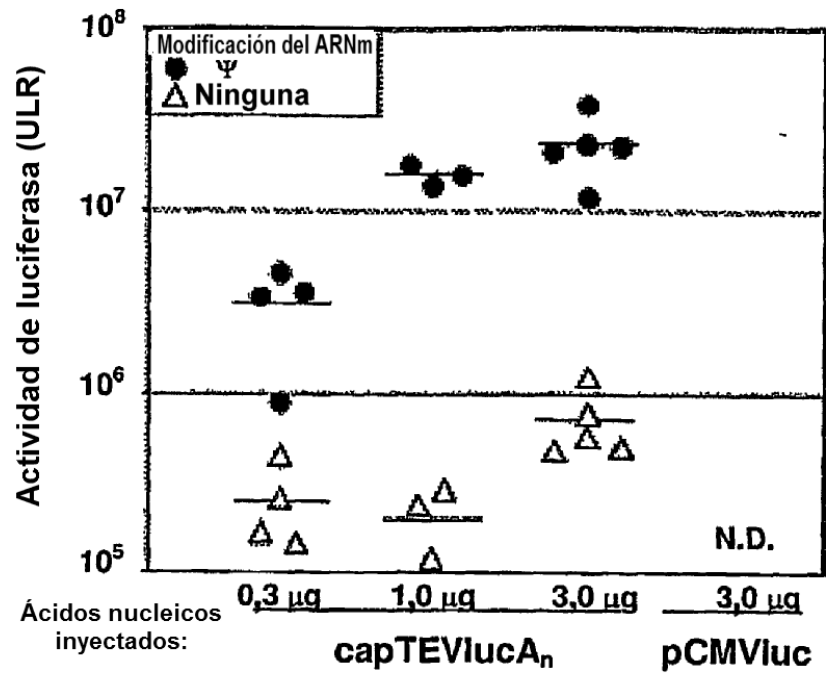


Figura 13

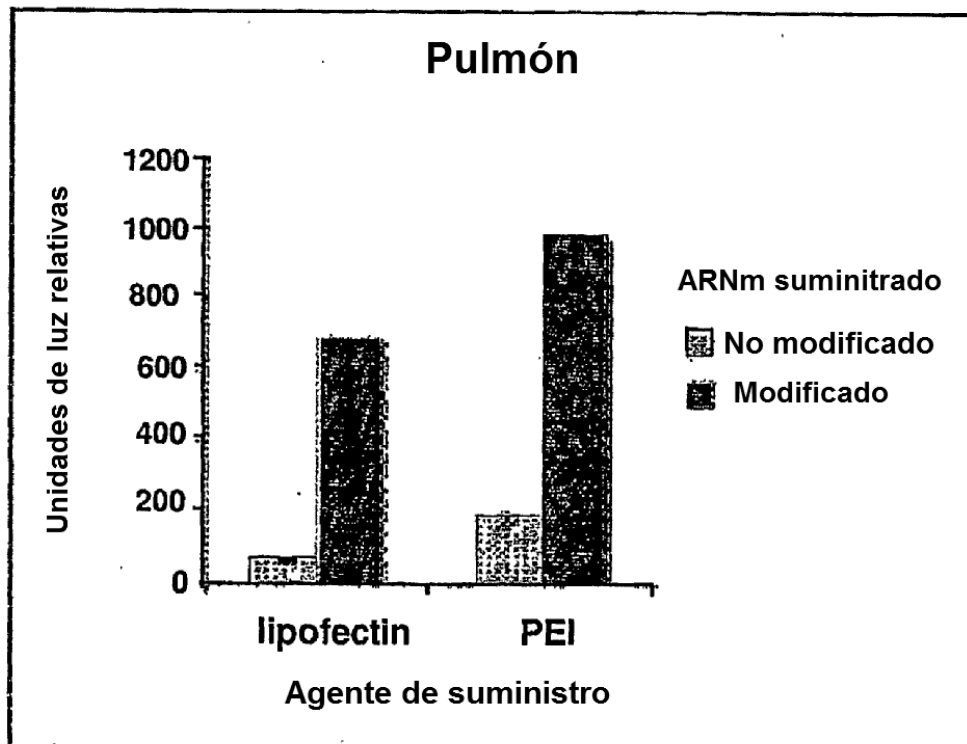


Figura 14

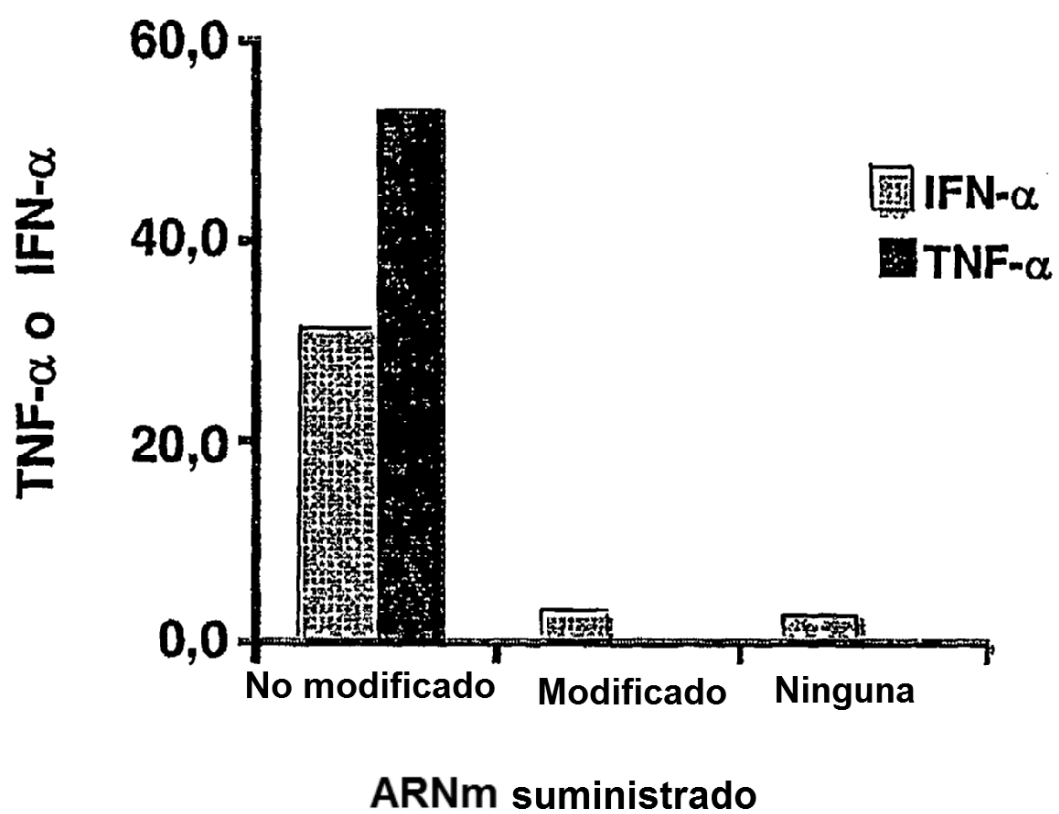


Figura 15