

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 937 245**

51 Int. Cl.:

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/117 (2010.01)

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 19168984 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2022 EP 3611266**

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:

27.03.2023

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

Observaciones:

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

ES 2 937 245 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

Campo de la invención

La invención proporciona un uso de Ψ o $m^1\Psi$ (1-metilpseudouridina) en una molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido para reducir la inmunogenicidad de dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido, en donde la reducción en la inmunogenicidad de dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ es detectable mediante al menos el siguiente método, en donde el método comprende las etapas de: a) poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ y, separadamente, poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o $m^1\Psi$; y b) medir la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados en respuesta a poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ y, separadamente, medir la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados en respuesta a poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o $m^1\Psi$, en donde la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados desde la célula dendrítica murina o humana en respuesta a dicha puesta en contacto con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados desde la célula dendrítica murina o humana en respuesta a dicha puesta en contacto con la molécula homóloga de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o $m^1\Psi$.

Antecedentes de la invención

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 modificaciones de nucleósidos en células de mamíferos que de bacterias. El ARNr humano, por ejemplo, tiene 10 veces más pseudouridina (Ψ) 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 procariontico contiene significativamente menos modificaciones. El ARN mensajero bacteriano (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-metilguanosa (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.

El documento US 2003/171253 A1 desvela composiciones y métodos para tratar a un sujeto para una enfermedad caracterizada por muerte celular programada aberrante y/o inflamación, que comprende mediar la función A20 en el sujeto.

El documento WO 99/33982 A2 desvela polinucleótidos humanos y variantes de los mismos, sus polipéptidos codificados y variantes de los mismos, genes que corresponden a estos polinucleótidos y proteínas expresadas por los genes.

El documento WO 01/02608 A1 desvela oligonucleótidos que incorporan pirimidinas sustituidas tanto en 2- como en 5-aminoadenina.

Chui H.M.-P. et al., "Synthesis of helix 69 of Escherichia coli 23S rRNA containing its natural modified nucleosides, $m^3\Psi$ and Ψ ", Journal of Organic Chemistry, vol. 67, n.º 25, páginas 8847 - 8854, desvelan oligorribonucleótidos que comprenden nucleósidos modificados.

Sumario de la invención

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

La invención proporciona un uso de Ψ o $m^1\Psi$ (1-metilpseudouridina) en una molécula de ARNm sintetizado *in vitro*,

de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido para reducir la inmunogenicidad de dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido, en donde la reducción en la inmunogenicidad de dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ es detectable mediante al menos el siguiente método, en donde el método comprende las etapas de: a) poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ y, separadamente, poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o $m^1\Psi$; y b) medir la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados en respuesta a poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ y, separadamente, medir la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados en respuesta a poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o $m^1\Psi$, en donde la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados desde la célula dendrítica murina o humana en respuesta a dicha puesta en contacto con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados desde la célula dendrítica murina o humana en respuesta a dicha puesta en contacto con la molécula homóloga de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o $m^1\Psi$.

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

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^5C , m^5U , m^6A , s^2U , 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 inducir una célula de mamífero a que produzca una proteína recombinante, que comprende poner en contacto la célula de mamífero con una molécula de ARN sintetizada *in vitro* que codifica la proteína recombinante, comprendiendo la molécula de ARN sintetizada *in vitro* una pseudouridina o un nucleósido modificado, induciendo de esta manera una célula de mamífero a que produzca una proteína recombinante.

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 vasoespasmo 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 vasoespasmo 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

Breve descripción de las figuras

40 Figura 1. Producción de TNF- α 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 complementado con R-848 (1 μ g/ml) o ARN (5 μ 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- α 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.

50 Figura 2. La activación dependiente de TLR por ARN demuestra que la modificación de m6A y s2U 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 μ g) de ARN-1571 transcrito *in vitro* sin (ninguna) o con modificaciones de nucleósidos m⁵C, m⁶A, Ψ , m⁵U o s²U sobre un gel de agarosa desnaturante 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 μ g/ml) o ARN (5 μ 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 μ g/ml), LPS (1,0 μ 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.

65 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- α (B) y las CD1 y CD2 primarias (D) se trataron durante 8 a 16 h con Lipofectin® solo, Lipofectin®-R-848 (1 μ g/ml) o

ARN (5 µg/ml). Se observan los nucleósidos modificados presentes en el ARN-1571. TNF-α, IL-12 (p70) e IFN-α se midieron en el sobrenadante por ELISA. Se muestran los valores medios ± 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 µg/ml de poli(I):(C) o R-848 como controles positivos (panel superior) o Lipofectin® complejo con el ARN indicado (5 µg/ml; panel inferior). Se observan los nucleósidos modificados presentes en el ARN-1886. Se midió TNF-α 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 µg/ml) o ARN-1571, modificado como se indica (5 µg/ml). (A) Tinción de CD83 y HLA-DR. (B) Niveles de TNF-α 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 (Ψ:U) indicadas. Se observan tiempos de elución para los 3'-monofosfatos de pseudouridina (Ψ), citidina (C), guanosina (G), uridina (U), 7-metilguanosina ("m7G") y adenosina ("A"). (B) Contenido de nucleósidos modificados de ARN-1571. El porcentaje esperado de m⁶A, Ψ o m⁵C 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 m⁶ATP, ΨTP y m⁵CTP en relación con ATP UTP y CTP, respectivamente. B: valores (%) para m⁶A, Ψ y m⁵C monofosfatos en relación con todos los NMP. (C) Las MDDC se transfectaron con ARN-1571 protegido con caperuza complejo con Lipofectin® (5 µg/ml) que contenía la cantidad indicada de m⁶A, Ψ o m⁵C. Después de 8 horas, se midió TNF-α en los sobrenadantes. Datos expresados como inhibición relativa de TNF-α. Se muestran los valores medios ± SEM obtenidos en 3 experimentos independientes.

Figura 6. La expresión de TNF-α 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), m⁵C y Ψ. Las MDDC humanas se transfectaron con Lipofectin® solo (medio), R-848 (1 µg/ml) o Lipofectin® complejo con ARN (5 µg/ml). Donde se indicó las células se trataron con 2,5 µg/ml de cicloheximida (CHX). (B). Después de 8 horas de incubación, se midió TNF-α en el sobrenadante. (C) El ARN de las células se analizó mediante transferencia Northern. Se muestran los valores medios ± SEM representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 7. A. El ARNmΨ 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 µg de ARNm no modificado indujeron un nivel más alto de IFN-α que 3 µg de ARNm modificado con Ψ (P < 0,001). Los niveles de IFN-α inducidos por 3 µg de ARNm modificado con Ψ fueron similares a los obtenidos cuando a los animales se les inyectó lipofectin sin complejar. Los valores se expresan como la media ± s.e.m. (n = 3 o 5 animales/grupo). B. Se observaron resultados similares con TNF-α.

Figura 8. El ARNm que contiene pseudouridina (Ψ) no activa la PKR. Ψ: pseudouridina. Control: ARN no modificado. m⁵C: ARNm con modificación m⁵C.

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 m⁵C, m⁶A y m⁵U como se indica.

Figura 11. A. Efecto aditivo de los elementos 3' y 5' en la eficacia de traducción del ARNmΨ. Se transfectaron células 293 con luciferasa de luciérnaga convencional y ARNmΨ 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^o) del total de los lisados. B. El ARNmΨ es más estable que el ARNm no modificado. Las células 293 transfectadas con capTEVlucAn que contenían nucleósidos no modificados o modificados con Ψ se lisaron en los momentos indicados después de la

transfección. Se analizaron alícuotas (1/20^o) de los lisados para luciferasa. Los errores estándar son demasiado pequeños para visualizarse con barras de error. C. La expresión de β -galactosidasa se potencia usando ARNm Ψ en comparación con ARNm convencional. Se transfectaron células 293 sembradas en placas de 96 pocillos con ARNm complejados con lipofectin (0,25 μ g/pocillo) que codifican la β -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 Ψ . 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.

10 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 Ψ intravenoso se expresa en el bazo. Se administró un ARNm Ψ complejado con lipofectin (0,3 μ 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^o) 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 Ψ muestra mayor estabilidad y traducción *in vivo*. Se suministró por vía intra venosa CapTEVlucAn complejado con lipofectin (0,3 μ g/60 μ l/animal) con o sin modificaciones con Ψ 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^o) 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.

30 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 Ψ y ADN plasmídico pCMVluc en un volumen de 60 μ 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^o) de sus bazos homogeneizados en tampón de lisis. Se muestra el valor de cada animal y las líneas horizontales cortas indican la media; N.D., no detectable.

40 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 μ g de ARNm codificante de luciferasa de luciérnaga con o sin modificación con Ψ , 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.

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

50 Descripción detallada

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

La invención proporciona un uso de Ψ o m¹ Ψ (1-metilpseudouridina) en una molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido para reducir la inmunogenicidad de dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido, en donde la reducción en la inmunogenicidad de dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o m¹ Ψ es detectable mediante al menos el siguiente método, en donde el método comprende las etapas de: a) poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o m¹ Ψ y, separadamente, poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o m¹ Ψ ; y b) medir la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados en respuesta a poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o m¹ Ψ y, separadamente, medir la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados en respuesta a poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o m¹ Ψ , en donde la cantidad de IL-12,

- 5 IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados desde la célula dendrítica murina o humana en respuesta a dicha puesta en contacto con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o m¹ Ψ es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados desde la célula dendrítica murina o humana en respuesta a dicha puesta en contacto con la molécula homóloga de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o m¹ Ψ .
- 10 La presente solicitud divulga un ARN mensajero que comprende un resto de pseudouridina. En otra divulgación, el ARN mensajero codifica una proteína de interés.
- 15 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 una pseudouridina.
- 20 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.
- 25 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 divulgación 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.
- 30 En otra realización, la molécula de ARNm transcrita *in vitro* del uso de la invención de acuerdo con la invención es un oligorribonucleótido. En otra realización, la molécula de ARNm transcrita *in vitro* del uso de la invención 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 m⁵C, m⁵U, m⁶A, s²U, Ψ o 2'-O-metil-U.
- 35 La presente solicitud divulga un polirribonucleótido sintetizado *in vitro*, que comprende un pseudouridina o un nucleósido modificado, donde el nucleósido modificado es m⁵C, m⁵U, m⁶A, s²U, 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.
- 40 La molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención de la presente invención comprende un marco abierto de lectura que codifica una proteína funcional. En otra realización, 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 realización separada de la presente invención.
- 45 En otra realización, la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención de acuerdo con la invención comprende además una cola de poli-A. En otra realización, la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención no comprende una cola de poli-A. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 50 En otra realización, la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención comprende además una caperuza m⁷GpppG. En otra realización, la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención no comprende una caperuza m⁷GpppG. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 55 En otra realización, la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención comprende además un potenciador traduccional independiente de caperuza. En otra realización, la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de 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.
- 60
- 65

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.

5 La molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención de la presente invención comprende una pseudouridina o una 1-metilpseudouridina. En otra realización, la molécula de ARNm o la molécula de oligorribonucleótido del uso de la invención comprende un nucleósido modificado. En otra realización, la molécula de ARNm o la molécula de oligorribonucleótido del uso de la invención es una molécula de ARN o de oligorribonucleótido sintetizada *in vitro*. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

15 "Pseudouridina" se refiere, en otra realización, a m¹acp³Ψ (1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil) pseudouridina. En otra realización, el término se refiere a m¹Ψ (1-metilpseudouridina). En otra realización, el término se refiere a Ψm (2'-O-metilpseudouridina. En otra realización, el término se refiere a m⁵D (5-metildihidouridina). En otra realización, el término se refiere a m³Ψ (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, una molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención de la presente invención es un oligorribonucleótido terapéutico.

25 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 de la presente divulgación, suministrando, de este modo, una proteína recombinante a un sujeto.

30 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.

35 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.

40 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.

45 En otra realización, la longitud de una molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido (por ejemplo, una molécula de ARN monocatenario (ARNmc) o de ARNbc) del uso de la invención de acuerdo la presente invención tiene una longitud superior a 30 nucleótidos. En otra realización, la molécula de ARNm o de oligorribonucleótido 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. 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 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.

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

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
10 ARN cualquier otra polimerasa conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

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.
15 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
20 de la presente solicitud.

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
25 divulgación separada de la presente solicitud.

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.
30

El nucleósido que se modifica en una molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención de acuerdo con la presente 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).
35

En otra realización, el nucleósido modificado del uso de la invención de la presente invención es pseudouridina o 1-metilpseudouridina y opcionalmente m⁵C (5-metilcitidina). En otro ejemplo de la divulgación, el nucleósido modificado es m⁵U (5-metiluridina). En otro ejemplo de la divulgación, el nucleósido modificado es m⁶A (N⁶-metiladenosina). En otro ejemplo de la divulgación, el nucleósido modificado es s²U (2-tiouridina). En otra
40 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 m¹A (1-metiladenosina); m²A (2-metiladenosina); Am (2'-O-metiladenosina); ms²m⁶A (2-metil-N⁶-metiladenosina); i⁶A (N⁶-isopenteniladenosina); ms²i⁶A (2-metil-N⁶-isopenteniladenosina); io⁶A (N⁶-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); ms²io⁶A (2-metil-N⁶-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); g⁶A (N⁶-glicinilcarbamoiladenosina); t⁶A (N⁶-treonilcarbamoiladenosina); ms²t⁶A (2-metil-N⁶-treonilcarbamoiladenosina); m⁶t⁶A (N⁶-metil-N⁶-treonilcarbamoiladenosina); hn⁶A (N⁶-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina); ms²hn⁶A (2-metil-N⁶-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m¹I (1-metilinosina); m¹Im (1,2'-O-dimetilinosina); m³C (3-metilcitidina); Cm (2'-O-metilcitidina); s²C (2-tiocitidina); ac⁴C (N⁴-acetilcitidina); f⁶C (5-formilcitidina); s²Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp³U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); ho⁵U (5-hidroxiuridina); mo⁵U (5-metoxiuridina); cmo⁵U (ácido uridina 5-oxiacético); mcmo⁵U (metil éster de ácido uridina 5-oxiacético); chm⁵U (5-(carboxihidroximetil)uridina); mchm⁵U (metil éster de 5-(carboxihidroximetil)uridina); mcm⁵U (5-metoxycarbonilmetiluridina); mcm⁵Um (5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metiluridina); mcm⁵s²U (5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina); nm⁵s²U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm⁵U (5-metilaminometiluridina); mnm⁵s²U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm⁵se²U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm⁵U (5-carbamoilmetiluridina); ncm⁵Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm⁵U (5-carboximetilaminometiluridina); cmnm⁵Um (5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridina); cmnm⁵s²U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m⁶₂A (N⁶, N⁶-dimetiladenosina); Im (2'-O-metilinosina); m⁴C (N⁴-metilcitidina); m⁴Cm (N⁴,2'-O-dimetilcitidina); hm⁵C (5-hidroximetilcitidina); m³U (3-metiluridina); cm⁵U (5-carboximetiluridina);
45
50
55
60
65

m⁶Am (N⁶,2'-O-dimetiladenosina); m⁶₂Am (N⁶,N⁶,O-2'-trimetiladenosina); m^{2,7}G (N²,7-dimetilguanosina); m^{2,2,7}G (N²,N²,7-trimetilguanosina); m³Um (3,2'-O-dimetiluridina); m⁵D (5-metildihidrouridina); f⁶Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m¹Gm (1,2'-O-dimetilguanosina); m¹Am (1,2'-O-dimetiladenosina); tm⁵U (5-taurinometiluridina); tm^{5s}U (5-taurinometil-2-tiouridina); imG-14 (4-demetilwiosina); imG2 (isowiosina); o ac⁶A (N⁶-acetiladenosina).

5 En otra realización, una molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención de acuerdo con la presente invención, como se define en las reivindicaciones, comprende una combinación de 2 o más de las modificaciones anteriores. En otra realización, la molécula de ARNm o la molécula de oligorribonucleótido comprende una combinación de 3 o más de las modificaciones anteriores. En otra realización, la molécula de ARNm o la molécula de oligorribonucleótido comprende una combinación de más de 3 de las modificaciones anteriores. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

15 En otra realización, entre el 0,1% y el 100% de los restos la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención de la presente 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 %.

30 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 %.

40 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 %.

50 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 %.

60 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 uso de la invención 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 otra realización, 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. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

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.

La presente solicitud divulga un método para inducir a una célula de mamífero a producir una proteína de interés, comprendiendo poner en contacto dicha célula de mamífero con una molécula de ARN sintetizado *in vitro* que codifica la proteína recombinante, comprendiendo la molécula de ARN sintetizado *in vitro* una pseudouridina o un nucleósido modificado, induciendo de esta manera a una célula de mamífero a producir una proteína de interés. En otra divulgación, la proteína de interés es una proteína recombinante. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

"Codificante" se refiere, en otra realización, a una molécula de ARNm que contiene un gen que codifica la proteína de interés. La molécula de ARNm 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.

La solicitud divulga un método para inducir una célula de mamífero para producir una proteína recombinante, que comprende poner en contacto la célula de mamífero con una molécula de ARN transcrita *in vitro* que codifica la proteína recombinante, comprendiendo además la molécula de ARN transcrito *in vitro* una pseudouridina o un nucleósido modificado, induciendo de esta manera una célula de mamífero para producir una proteína recombinante.

En otra realización, una molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención de la presente invención se traduce en la célula de manera más eficaz que una molécula de ARN no modificada con

la misma secuencia. En otra realización, la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de 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 500 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 complejado 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 α en presencia de ARNm codificante de renilla protegido con caperuza (0,5 y 0,05 ng/ μ l). El ARNm que contenía pseudouridina (Ψ) no activó la PKR, como se detectó por la falta de autofosforilación de PKR y la fosforilación de eIF2 α , mientras que el ARN sin modificación de nucleósidos y el ARNm con modificación con m5C activaron PKR. Se sabe que eIF2 α 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 (Ψ).

En otra divulgación, 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 otra 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 divulgación, 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, la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención de acuerdo con la presente 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 ARNm 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 como se define en las reivindicaciones. 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 de la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención se puede administrar sin desencadenar una respuesta inmunitaria detectable. En otra realización, la expresión se refiere a una disminución tal que la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido 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 la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido puede administrarse de forma repetida sin provocar una respuesta inmunitaria suficiente para eliminar la expresión detectable de la proteína recombinante.

"Cantidad eficaz" de la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención 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 del uso de la invención de la presente invención 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- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α o β , IL-6, IFN- β , 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.

En otra realización, la inmunogenicidad relativa del nucleótido modificado y su homólogo no modificado se determina determinando la cantidad de citocinas (por ejemplo, IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α o β , IL-6, IFN- β 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 uso de la presente invención comprende además mezclar la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido con un reactivo de transfección antes de la etapa de contacto. En otra realización, un uso de la presente invención comprende además administrar la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido 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 polietilimina. 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 usos 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.

5 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, endimocito, 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, espermátida, espermatozocito, espermatozocito primario, espermatozocito secundario, epitelio germinal, célula gigante, célula glial, astroblasto, astrocito, oligodendroblasto, oligodendrocito, glioblasto, célula calciforme, gonadotropo, célula de la granulosa, hemocitoblasto, célula del pelo, hepatoblasto, hepatocito, hialocito, célula intersticial, célula yuxtglomerular, 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 citotóxico natural, timocito, macrófago, célula de Kupffer, macrófago alveolar, célula espumosa, histiocito, célula lútea, célula madre linfocítica, célula linfoide, célula madre linfoide, célula macroglial, mamotropa, 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 mioide, célula madre mioide, 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, pituicito, 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.

30 Se puede tratar una variedad de trastornos empleando usos de 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.

En otra realización, la proteína recombinante codificada por un la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido de los usos de la invención de la presente invención es ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa.

40 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; AHHR; 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; SOS1; SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFH1B; ACAA1; AGS1; AGTR1; AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTD; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP; CPO; CRV; CTNNA1; 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; 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; 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; PFBI; RASA1; SCZD1; SDHA; SGCD; SLC22A5; SLC26A2; SLC6A3; SM1; SMA@;
 5 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; 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;
 10 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;
 15 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;
 20 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;
 25 PCBD; 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;
 30 MLL; MYBPC3; MYO7A; NNO1; OPGG; 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; C1R; CD4; CDK4; CNA1; COL2A1; CYP27B1; DRPLA ENUR2; FEOM1;
 FGF23; PPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMG2; HMN2; HPD; IGF1; KCNA1; KERA; KRAS2; KRT1 KRT2A; KRT3;
 35 KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRTHB6; LDHB; LYZ; MGCT; MPE; MVK; MYL2; OAP; PAH; PKKB 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; GALC; GCH1; IBGC1; IGH@; grupo IGHC; IGHG1; IGHM; IGHR; IV
 40 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; OTS1; PWCR
 RLBP1; SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A; WMS; ABCC6; ALDOA; APRT; ATP2A1; BBS2; CARD15; CATM; CDH1
 45 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 CHRNB1; CHRNE; CMT1A; COL1A1; CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR;
 50 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;
 55 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; BFC; 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;
 60 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;
 65 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; KAL1; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MEC2; 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
 10 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; TBX2; 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;
 15 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; M TTL1; M TTL2; M TTN; M TTP; M TTS1; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1;
 20 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 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,
 25 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 molécula de ARN sintetizada *in vitro*, óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), tratando, de este modo, un vasoespasmio en un sujeto.
 35

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 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.
 40

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.
 45

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.
 50

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.
 55

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.
 60

En otra divulgación, la proteína inmunosupresora es la hormona estimulante de los melanocitos α (α -MSH). En otra divulgación, la proteína inmunosupresora es el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 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.
 65

5 En otra divulgación, 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.

10 En otra divulgación, la enzima es catalasa. En otra divulgación, la enzima es glutatión peroxidasa. En otra divulgación, la enzima es la fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa. En otra divulgación, la enzima es superóxido dismutasa-1. En otra divulgación, la enzima es superóxido dismutasa-2. En otra divulgación, la enzima es cualquier otra enzima con actividad antioxidante que es conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 En otra realización, una molécula de ARNm o una molécula de ribonucleótido del uso de la invención de acuerdo con la presente 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 14C-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).

45 Se pueden usar diversas realizaciones de intervalos de dosificación de compuestos del uso de la invención 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.

60 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 ARNm, oligorribonucleótidos o polirribonucleótidos del uso de 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 ARNm, comprendiendo el método la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de oligorribonucleótido o de la molécula de ARNm 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 ARNm.

5 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 ARNm, comprendiendo el método la etapa de reemplazar un nucleótido de la molécula de polirribonucleótido o de la molécula de ARNm con un nucleótido modificado que contiene un nucleósido modificado o una pseudouridina, reduciendo, de este modo, una inmunogenicidad del vector de terapia génica.

10 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.

15 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.

20 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.

30 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.

35 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).

40 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).

45 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 uso de la presente invención (Ejemplos).

50 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.

55 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 uso 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 uso 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 uso de la presente solicitud. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

65 En otra realización, todos los enlaces entre nucleótidos en la molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención 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, el uso de la invención de acuerdo con la 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. Como se proporciona en el presente documento, el número de restos modificados en una molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido determina, en otra realización, la magnitud de los efectos observados en la presente invención.

En otra divulgación, la presente solicitud divulga un método 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 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- α 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- α 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 una molécula de ARNm, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido del uso de la invención 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.

En otra realización, una ventaja es la falta de inmunogenicidad, que permite el suministro repetido sin generación de citocinas inflamatorias.

En otra realización, la estabilidad del ARN 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.

5 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.

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

15 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 divulgación, un protocolo de tratamiento de la presente divulgación es terapéutico. En otra divulgación, el protocolo es profiláctico. Cada posibilidad representa una divulgación separada de la presente solicitud.

20 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
25 tratamiento y se permite que la molécula entre en contacto con la célula *in vivo*.

30 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).

35 Las composiciones del uso de la invención de acuerdo con la 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.

40 En otra realización de los usos y composiciones del uso de la invención de acuerdo con la 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.

45 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.

55 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.

60 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.

65 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.*

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

30 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 algínico, 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.

50 En otra realización, las composiciones farmacéuticas para su uso en el uso de la invención 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.

55 En otra realización, las moléculas para su uso en el uso de la invención de acuerdo con 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.

65 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
5 tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro y base orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína 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
20 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
30 (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).
40 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.
45

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 10⁶ 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
55 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 oligorronucleótidos-5'-monofosfatos se sintetizaron químicamente (Dharmacon, Lafayette, CO). Se incubaron partes alícuotas de muestras de ARN en presencia de la nucleasa
65

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).

5 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).

10 **Análisis mediante HPLC**

10 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 (KH₂PO₄ 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.

20 **Análisis con células dendríticas**

20 Las células dendríticas en placas de 96 pocillos (aproximadamente 1,1 x 10⁵ 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.

30 **Análisis de transferencia Northern**

30 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.

35 **RESULTADOS**

40 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-α, los niveles de TNF-α 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-α, mientras que el ARN mitocondrial (mt) indujo mucho más TNF-α 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-α. 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-α 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.

55 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

60 **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

ARN transcrito in vitro

65 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

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 x 10⁴ células/pocillo) y se cultivaron sin antibióticos. Al día siguiente, las células se expusieron a R-848 o ARN complejo 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 transfetaron 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 transfectó 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 CD**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 e 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- α e IL-12 tanto por MDDC generadas por GM-CSF/IL-4 como por MDDC generadas por (GM-CSF)/IFN- α , 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- α 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- α 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- α tanto en CD1 como CD2, mientras que los transcritos modificados con m5U, Ψ 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/ Ψ no fueron estimulantes, mientras que una mezcla de moléculas de ARN con un solo tipo de modificación (m6A + Ψ) 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- α 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/ Ψ) 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- α (1.000 U/ml) (R & D Systems) para obtener IFN- α 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

5 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). 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, Ψ 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 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, Ψ o m5C casi tan eficazmente como los NTP básicos. Para confirmar esta expectativa, el ARN transcrito en presencia de UTP: Ψ en una proporción de 50:50 se digirió y se encontró que contenía UMP y Ψ en una relación de casi 50:50 (Figura 5A).

20 Se transfectaron moléculas de ARN con un contenido de nucleósidos modificados en aumento en MDDC y se evaluó la secreción de TNF-α. Cada modificación (m6A, Ψ y m5C) inhibió la secreción de TNF-α 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-α. En las 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.

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.

30 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-α, este efecto se eliminó por la 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.

35 Los resultados anteriores se confirmaron midiendo los niveles de ARNm de TNF-α 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-α, mientras que los ORN que contenían un solo nucleósido modificado fueron significativamente menos estimulantes; ORN2-Um exhibió la mayor disminución de la producción de TNF-α (Figura 6C).

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

45 En resumen, cada una de las modificaciones probadas (m6A, m5C, m5U, s2U, Ψ y 2'-O-metil) suprimieron la estimulación inmunitaria mediada por ARN, incluso cuando estaban presentes como una pequeña fracción de los 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 μg 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-α e IFN-α a partir de muestras de suero. El ARNm protegido con caperuza, modificado con pseudouridina, indujo significativamente menos ARNm de TNF-α e IFN-α que el que se obtuvo por el ARNm no modificado (Figura 7A-B).

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

65

Análisis de fosforilación de PKR

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 [γ 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 (m⁵C, pseudouridina, m⁶A, m⁵U) y ARNbc. Se añadió eIF2 α 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/ μ 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 α (factor de iniciación eucariótico 2 alfa) en presencia de ARNm codificante de renilla protegido con caperuza (0,5 y 0,05 ng/ μ l). El ARNm que contenía pseudouridina (Ψ) no activó PKR, como se detectó por la falta de autofosforilación de PKR y la fosforilación de eIF2 α , mientras que el ARN sin modificación de nucleósidos y el ARNm con modificación con m⁵C 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 m⁵C**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 μ l del lisado se suplementó con 1 μ l (1 μ g) de ARNm y se incubó durante 60 minutos a 30 °C. Se retiró un μ 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 μ g/ μ 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 m⁵C. 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 m⁵C 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 10⁴ 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 μ g de ARNm-0,8 μ g de lipofectin en 50 μ l por pocillo). Las células se incubaron con la mezcla de transfección durante 1 hora a 37 °C, en una incubadora con CO₂ 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 m⁵C 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_n) 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_n, 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 estereotáxico. 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

5 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 IFN α mediante ELISA como se describe en los Ejemplos anteriores, utilizando anticuerpos específicos de ratón.

15 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 ARNm Ψ) se construyeron con caperuza, TEV (capTEVA₅₀) 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 ARNm Ψ 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 ARNm Ψ (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 ARNm Ψ , pero en todo momento fue sustancialmente mayor en animales que recibieron ARNm Ψ (Figura 12C, panel izquierdo). A las 24 horas, solo los animales inyectados con ARNm Ψ 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).

45 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*

50 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 ARNm Ψ capTEVlucAn, aunque parcialmente degradado, todavía era claramente detectable. Por lo tanto, el ARNm Ψ se conserva *in vivo* de forma más estable que el ARNm control.

60 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.

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

La inmunogenicidad adicional del ARNm Ψ 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 Ψ 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 Ψ SUMINISTRADO A TRAVÉS DEL TRACTO RESPIRATORIO SE COMPORTA DE MANERA SIMILAR AL ARNm ADMINISTRADO POR VÍA INTRAVENOSA

Para probar la capacidad de ARNm Ψ 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 Ψ 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- α y TNF- α) en comparación con los vehículos control, mientras que el ARNm Ψ no (Figura 15).

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

EJEMPLO 16: SUMINISTRO DE ARNm Ψ DE EPO A CÉLULAS 293

El ARNm Ψ se generó a partir de un plásmido que contiene el ADNc de EPO humano. Cuando se transfectaron 0,25 μ g de ARNm Ψ 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 Ψ 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 Ψ de EPO. Los ARNm Ψ 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, Ψ trifosfato (TriLink, San Diego, CA) reemplaza a UTP en la reacción de transcripción. Para garantizar la protección con caperuza del ARNm Ψ , 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 Ψ cola de poli(A) en una reacción de 1,5 μ g/ μ l de ARN, ATP 5 mM y 60 U/ μ 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 Ψ 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 Ψ 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 Ψ 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 β -globina.

Además, la longitud de la cola de poli (A) durante la producción de ARNm Ψ 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 Ψ 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 ARNm Ψ de EPO (0.25 μ g/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 ARNm Ψ , se prueba el ARNm Ψ 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 ARNm Ψ 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 ARNm Ψ DE EPO *IN VIVO***MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES****Administración de ARNm Ψ 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 N₂O y O₂ (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 ARNm Ψ de EPO-lipofectin (construidos mezclando cantidades variables de ácido nucleico con 1 μ l de lipofectin en 60 μ l 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 ARNmΨ 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 ARNmΨ de EPO. El momento óptimo resultante para medir la proteína EPO después de la administración de ARNmΨ de EPO se utiliza en estudios posteriores.

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

Relación entre la producción de EPOh y la reticulocitosis. Para medir el efecto del ARNmΨ 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 ARNmΨ de EPO y la sangre se extrae diariamente de los ratones desde los días 2-6. La relación entre la dosis de ARNmΨ de EPO y la frecuencia de reticulocitos se evalúa, a continuación, en el momento de la reticulocitosis máxima. La dosis de ARNmΨ 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 ARNmΨ 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-α, TNF-α e IL-12 de ratón utilizando kits ELISA.

Análisis de transferencia Northern.

Las partes alícuotas (2,0 µg) de las muestras de ARN aisladas de bazo se separan mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1,4%, se transfieren a membranas cargadas (Schleicher y Schuell) y se hibridan en MiracleHyb® (Stratagene). Las membranas se sondaron para TNF-α, 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 [α-³²P] 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 ARNmΨ 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 ARNmΨ 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 µg 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 ARNmΨ DE EPO

Formación de complejos de nanopartículas.

Las soluciones de polímeros y ARNmΨ se mezclan para formar complejos. Se prueban y optimizan varias condiciones de formulación: (1) los complejos de polietilénimina (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 CK₃₀-PEG_{10k} en un tampón de contraíón 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 CK₃₀PEG_{10k} 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 CK₃₀PEG_{10k} (2,5 mg en 11,25 ml de H₂O sin RNasa) durante 1-2 minutos. Después de 15 minutos, se diluye 1: 2 en H₂O sin RNasa.

Suministro intratraqueal.

Los ratones se anestesian con halotano al 3% (70% de N₂O + 30% de O₂) en una cámara de anestesia y se mantienen con halotano al 1% (70% de N₂O + 30% de O₂) 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 CK₃₀PEG_{10k}) 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- β) 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 del uso de la invención de acuerdo con la invención se usan para proporcionar factores de coagulación (por ejemplo, para hemofílicos).

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

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

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

En experimentos adicionales, las moléculas de ARNm modificadas del uso de la invención de acuerdo con la 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; 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; AHHR; 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;
 5 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; 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; ITH1; 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;
 10 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; PKD2; QDPR; SGCB; SLC25A4; SNCA; SOD3; STATH; TAPVR1; TYS; WBS2;
 WFS1; WHCR; ADAMTS2; ADRB2; AMCN; AP3B1; APC; ARSB; B4GALT7; BHR1; C6; C7; CCAL2; CKN1; CNDJ;
 15 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;
 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;
 20 HLA-A; HLA-DPB1; HLA-DRA; HPFH; ICS1; IDDM1; IFNGR1; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2; LAP; LCA5; LPA;
 MCDR1; MOC51; 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;
 25 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
 30 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;
 35 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; SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1; TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8;
 40 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; OPGG;
 OPTB1; PAX6; PC; PDX1; PGL2; PGR PORC; PTH; PTS; PVRL1; PYGM; RAG1; RAG2; ROM1; RRAS2; SAA1;
 45 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; MVK; MYL2; OAP; PAH PPKB; PRB3; PTPN11; PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1;
 50 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; CTAA1; DAD1;
 DFN5; EML1; GALC; GCH1; IBGC1; IGH@; grupo IGHC; IGHG1; IGHM IGHR; IV; LTBP2; MCOP; MJD; MNG1;
 MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1; PSEN1; PYGL; RPGRIP1 SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6;
 55 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; DNASA1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS; GAN HAGH; HBA1; HBA2;
 60 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 CHRNB1;
 CHRNE; CMT1A; COL1A1; CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR; GFAP; GH1; GH2 GP1BA;
 GPSC; GUCY2D; ITGA2B; ITGB4; KRT10; KRT12; KRT13; KRT14; KRT14L1; KRT14L2; KRT14L3 KRT16;
 65 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; LCF52; MADH4; MAFD1; MC2R; MCL; MYP2 NPC1; SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE; ATHS; BAX; BCKDHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A CCO; 5 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; TNNT3; TYROBP; ADA AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5; GNAS; GSS; 10 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; TN2; TIMP3; TST VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2; AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2; GINS; AMELX; 15 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; 20 HTC2; HTR2C; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2; JMS; KALI; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MEC2; 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; 25 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; 30 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; 35 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

40 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

50 ARN modificado con pseudouridina o nucleósidos que codifica una telomerasa o una proteína inmunosupresora (por ejemplo, α -MSH, TGF- β 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 ARN_{ip}

60 Se sintetiza una molécula de ARN bicatenario (ARN_{bc}) que comprende pseudouridina o un nucleósido modificado y que además comprende un ARN de interferencia pequeño (ARN_{ip}) o ARN de horquilla corta (ARN_{hc}) 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. Estas modificaciones son realizaciones adicionales del uso de la invención de acuerdo con la invención.

- Las modificaciones probadas incluyen, p.ej.: m¹A; m²A; Am; ms²m⁶A; i⁶A; ms²i⁶A; io⁶A; ms²io⁶A; g⁶A; t⁶A; ms²t⁶A; m⁶t⁶A; hn⁶A; ms²hn⁶A; Ar(p); l; m¹l; m¹lm; m³C; Cm; s²C; ac⁴C; f⁵C, m⁵Cm; ac⁴Cm; k²C; m¹G; m²G; m⁷G; Gm; m²G; m²Gm; m²Gm; Gr(p); yW; o₂yW; OHyW; OHyW*; imG; mimG; Q; oQ; galQ; manQ; preQ₀; preQ₁; G+; D; m⁵Um; m¹Ψ; Ψm; s⁴U; m⁵s²U; s²Um; acp³U; ho⁵U; mo⁵U; cmo⁵U; mcmo⁵U; chm⁵U; mchm⁵U; mcm⁵U; mcm⁵Um; mcm⁵s²U; nm⁵s²U; mnm⁵U; mnm⁵s²U; mnm⁵se²U; ncm⁵U; ncm⁵Um; cmnm⁵U; cmnm⁵Um; cmnm⁵s²U; m⁶₂A; lm; m⁴C; m⁴Cm; hm⁵C; m³U; m¹acp³Ψ; cm⁵U; m⁶Am; m⁶₂Am; m²⁷G; m²²⁷G; m³Um; m⁵D; m³Ψ; f⁵Cm; m¹Gm; m¹Am; tm⁵U; tm⁵s²U; imG-14; imG2; y ac⁶A.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> The Trustees of the University of Pennsylvania
- <120> ARN que contiene nucleósidos modificados y métodos de uso del mismo
- <130> EP81461IISZ358pau
- <140> aún no asignado
- <141> con la presente
- <150> EP12008048.6
- <151> 21-08-2006
- <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 2 937 245 T3

ggaauucuca	acacaacaua	uacaaaacaa	acgaaucuca	agcaaucaag	cauucuacuu	60
cuauugcagc	aauuuaaauuc	auuucuuuuu	aagcaaaaagc	aauuuucuga	aaauuuucac	120
cauuuacgaa	cgauagccau	ggaagacgcc	aaaaacauaa	agaaaggccc	ggcgccauuc	180
uauccucuag	aggauggaac	cgcuaggagag	caacugcaua	aggcuaukaa	gagauacgcc	240
cugguuccug	gaacaauugc	uuuuacagau	gcacauaucg	aggugaacau	cacguacgcg	300
gaauacuucg	aaauguccgu	ucgguuggca	gaagcuauka	aacgauaugg	gcugaauaca	360
aaucacagaa	ucgucguaug	cagugaaaac	ucucuucaku	ucuuuaukcc	gguguuuggc	420
gcuuuuuuuu	ucggaguugc	aguugcgccc	gcgaacgaca	uuuauaauga	acgugaauug	480
cucaacagua	ugaacauuuc	gcagccuacc	guaguguuug	uuuccaaaaa	gggguugcaa	540
aaaauuuuga	acgugcaaaa	aaaauuacca	auaauccaga	aaauuauuau	cauggauucu	600
aaaacggauu	accagggauu	ucagucgaug	uacacguucg	ucacaucuca	ucuaccucucc	660
gguuuuuauk	aaucagauuu	uguaccagag	uccuuugauc	gugacaaaac	aauugcacug	720
auaaugaaau	ccucuggauc	uacuggguua	ccuaagggug	uggcccuucc	gcuaagaacu	780
gccugcguca	gauucucgca	ugccagagau	ccuauuuuug	gcaaucaaa	cauuccggau	840
acugcgauuu	uaaguguugu	uccauuccau	cacgguuuug	gauguuuac	uacacucgga	900

ES 2 937 245 T3

uauuugauau	guggauuucg	agucgucuua	auguauagau	uugaagaaga	gcuguuuuua	960
cgaucuccuuc	aggauuacaa	aauucaaagu	gcguugcuag	uaccaacccu	auuuucauuc	1020
uucgccaaaa	gcacucugau	ugacaaaauac	gauuuaucua	auuuacacga	aauugcuucu	1080
gggggcgcac	cucuuucgaa	agaagucggg	gaagcggguug	caaaacgcuu	ccaucuucca	1140
gggauacgac	aaggauaugg	gcucacugag	acuacaucag	cuauucugau	uacacccgag	1200
ggggaugaua	aaccgggcg	ggucgguaaa	guuguuccau	uuuuugaagc	gaagguugug	1260
gaucuggaua	ccgggaaaac	gcugggcguu	aaucagagag	gcgaauuau	ugucagagga	1320
ccuaugauua	uguccgguaa	uguaaacaau	ccggaagcga	ccaacgccuu	gauugacaag	1380
gauggauggc	uacauucugg	agacauagcu	uacugggacg	aagacgaaca	cuucuucaua	1440
guugaccgcu	ugaagucuuu	aauuaaaauac	aaaggauauc	agguggcccc	cgcugaaauug	1500
gaaucgauau	uguuacaaca	ccccaaacuc	uucgacgcgg	gcguggcagg	ucuucccgac	1560
gaugacgccg	gugaacuucc	cgccgccguu	guuguuuugg	agcacggaaa	gacgaugacg	1620
gaaaaagaga	ucguggauua	cguggccagu	caaguaacaa	ccgcgaaaaa	guugcgcgga	1680
ggaguugugu	uuguggacga	aguaccgaaa	ggucuuaccg	gaaaacucga	cgcaagaaaa	1740
aucagagaga	uccucauaaa	ggccaagaag	ggcggaaagu	ccaaauugua	aaauguaacu	1800
cuagagggauc	ccccaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1860
aaca						1864

<210> 2
 <211> 1571
 <212> ARN
 <213> *Renilla reniformis*
 <400> 2

5

ES 2 937 245 T3

ggcuagccac caugacuucg aaaguuuuug auccagaaca aaggaaacgg augauaacug 60
guccgcagug guggggccaga uguaaaca aa ugaanguucu ugauucauuu auuaauuuuu 120
augauucaga aaaacaugca gaaaaugcug uuauuuuuuu acaugguaac gcggccucuu 180
cuuauuuuug gcgacauguu gugccacaua uugagccagu agcgcgguu auuauaccag 240
accuuauugg uaugggcaaa ucaggcaaa uugguaaugg uucuuauagg uuacuugauc 300
auuacaaaua ucuuacugca ugguuugaac uucuuuuuuu accaaagaag aucauuuuug 360
ucggccauga uugggggugcu uguuuggcau uucauuuauag cuaugagcau caagauaaga 420
ucaagcaau aguucacgcu gaaaguguag uagaugugau ugaaucaugg gaugaauggc 480
cugauuuuga agaagauuu gcguugauca aaucugaaga aggagaaaa augguuuugg 540
agaauaacuu cuucguggaa accauguugc caucaaaaau caugagaaag uuagaaccag 600
aagaauuugc agcauauuu gaaccauua aagagaaagg ugaaguucgu cguccaacau 660
uaucauggcc ucgugaaauc ccguuaguua aaggugguaa accugacguu guacaaauug 720
uuaggaauua uaaugcuuau cuacgugcaa gugauguuu accaaaaug uuuauugaau 780
cggacccagg auucuuuuucc aaugcuauug uugaaggugc caagaaguuu ccuaauacug 840
aauuugucua aguaaaaggu cuucauuuuu cgcaagaaga ugcaccugau gaaaugggaa 900
aauauaucaa aucguucguu gagcgaguuc ucaaaaauga acaauugucg acgggggccc 960
cuaggaauuu uuuagggag aucuggccuu ccuacaaggg aaggccaggg aauuuucuu 1020
agagcagacc agagccaaca gcccaccag aagagagcuu caggucuggg guagagacaa 1080
caacuccccc ucagaagcag gagccgauag acaaggaacu guauccuuua acuucccuca 1140
gaucacucuu uggcaacgac cccucgucac aauaaagaua ggggggcaac uaaagggauc 1200
ggccgcucug agcagacaug auaagauaca uugaugaguu uggacaaacc acaacuagaa 1260
ugcagugaaa aaaauugcuuu auuugugaaa uuugugaugc uauugcuuuu uuuguaacca 1320
uuauaagcug caauaaaca guuaacaaca acaauugcau ucauuuuuug uuucagguuc 1380
agggggaggu gugggagguu uuuuaagca aguaaaaccu cuacaaaugu gguaaaucg 1440
auaaguuuaa acagauccag guggcacuuu ucggggaaau gugcgcgga ccccuuuug 1500
uuuuuuuuu uaaauacauu caauaugua uccgcucaug agacaauaac ccugauaaau 1560
gcuucaauaa u 1571

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

10 <400> 3

ES 2 937 245 T3

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
 gguauuguag aagacgaaau ggauacagag ccuugaugga uaaaagucuu cauguuggca 300
 cucaaugugc cuuaacaaga agaugcccac aagaaggguu ugaucaucgg gacagcaaag 360
 ugucucuuca agagaaaaac ugugaaccug ugguucccaa ugcuccaccu gcuuaugaga 420
 aacucucugc agaacaguca ccaccacuu auucacuuu agagccagcg agacaccuga 480
 gacaugcuga aauuauuucu cucacacuuu ugcuugaauu uaauacagac aucuaauguu 540
 cuccuuugga augguguagg aaaaauugcaa gccaucucua auaauaaguc aguguuaaaa 600
 uuuuaguagg uccgcuagca guacuaauca ugugaggaaa ugaugagaaa uauuuuuuug 660
 ggaaaacucc aucauuaaa guugcaaugc augauaaaaa aaaaaaaaaa aaaaacugcg 720
 gccgca 726

5 <210> 4
 <211> 712
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4
 gggaauaagc uugcggccgc aguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuaucaugca uugcaacauu 60
 uauugaugga guuuucccaa uuuaauuuu cucaucuuu ccucacauga uuaguacugc 120
 uagcggaccu acuaaaauuu uaacacugac uuauuuuag agauggcuug cauuuuuccu 180
 acaccauucc aaaggagaac auuagauguc uguauaaaau caagcaaaag ugugagagaa 240
 auaauuucag caugucucag gugucucgcu ggcucuuuag gugaauaagg ugguggugac 300
 uguucugcag agaguuuucuc auuagcaggu ggagcauugg gaaccacagg uucacaguuu 360
 uucucuugaa gagacacuuu gcugucccga ugaucuaacc cuucuugugg gcaucuucuu 420
 guuaaggcac auugagugcc aacaugaaga cuuuuaucca ucaaggcucu guauccauuu 480
 cgucuucucac aauaccaaca gccgaugagc aguaagacuc ccaggaucau ugucaggaug 540
 ccgaucuccag cggccucuc agccguggug uaagaguggc cgugcccuu cuugggguaa 600
 ccuagauga agugagcauc uucucuuggc aucuuguagg gucagggcac aggacacuuu 660
 ccuuaaugag aguccucugu cugcuggcug gccgcgugcc ucgugccgaa uu 712

10 <210> 5
 <211> 494
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 937 245 T3

	gggagaccca agcuggcuag cagucaucca acagaaucau gagacagacu uugccuugua	60
	ucuacuuuug gggggggccuu uugcccuuug ggaugcugug ugcauccucc accaccaagu	120
	gcacuguuag ccaugaaguu gcugacugca gccaccugaa guugacucag guacccgaug	180
	aucuaccac aaacauaaca guguugaacc uuacccauaa ucaacucaga agauuaccag	240
	ccgccaacuu cacaagguau agccagcuaa cuagcuugga uguaggauuu aacaccaucu	300
	caaacugga gccagaauug ugccagaaac uucccauguu aaaaguuuug aaccuccagc	360
	acaugagcu aucucaacuu ucugauaaaa ccuugccuu cugcacgaau uugacugaac	420
	uccaucucau guccaacuca auccagaaaa uuaaaaauaa ucccuuuguc aagcagaaga	480
	auuuauacac auua	494
5	<210> 6 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintetizada químicamente	
	<400> 6 uggauccggc uuugagaucu u	21
15	<210> 7 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintetizada químicamente	
25	<220> <221> modified_base <222> (11)..(11) <223> um	
	<400> 7 uggauccggc uuugagaucu u	21
30	<210> 8 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintetizada químicamente	
40	<220> <221> modified_base <222> (6)..(6) <223> m5c	
45	<400> 8 uggauccggc uuugagaucu u	21
	<210> 9 <211> 21 <212> ARN	

ES 2 937 245 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizada químicamente	
5	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (12)..(12)	
	<223> p	
10	<400> 9	
	uggaucagg uuugagaucu u	21
	<210> 10	
15	<211> 31	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Sintetizada químicamente	
	<400> 10	
	gggagacagg ggugucgcc auuuccaggu u	31
25	<210> 11	
	<211> 31	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sintetizada químicamente	
	<400> 11	
	gggagacagg cuauaacuca cauaauguau u	31
35		

REIVINDICACIONES

1. Uso de Ψ o $m^1\Psi$ (1-metilpseudouridina) en una molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido para reducir la inmunogenicidad de dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido,

en donde la reducción en la inmunogenicidad de dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ es detectable mediante al menos el siguiente método, en donde el método comprende las etapas de:

a) poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ y, separadamente, poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o $m^1\Psi$; y

b) medir la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados en respuesta a poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ y, separadamente, medir la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados en respuesta a poner en contacto una célula dendrítica murina o humana con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende Ψ o $m^1\Psi$,

en donde la cantidad de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados desde la célula dendrítica murina o humana en respuesta a dicha puesta en contacto con la molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ es menor que la cantidad respectiva de IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β o IL-8 secretados desde la célula dendrítica murina o humana en respuesta a dicha puesta en contacto con la molécula homóloga de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que no comprende dichos Ψ o $m^1\Psi$.

2. El uso de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido que comprende Ψ o $m^1\Psi$ comprende además m^5C (5-metilcitidina).

3. El uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha molécula de ARNm sintetizado *in vitro*, de oligorribonucleótido o de polirribonucleótido codifica una proteína recombinante seleccionada 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 y 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 α (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 hidropéroxido 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; MUTYH; 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; COLAA3; 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; SOS1; SPG4; SRD5A2; TCL4; TGFA; TMD; TPO; UGT1A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFH1B; 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; TGFBR2; THPO; THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS; UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A; XPC; ZNF35; ADH1B; ADH1C; AFP; AGA; AIH2; ALB; ASDM; 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; 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; ELVOL4; 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; 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; 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; PLEC1; PRKDC; PXMP3; RP1; SCZD6; SFTPC; SGM1; SPG5A; STAR; TG; TRPS1; TTPA; VMD1; WRN; ABCA1; ABL1; ABO; ADAMTS1B; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP; AMCD1; ASS; BDMF; BSCL; C5; CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD13; 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 A; 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; RDP A; 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; 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; CIR; CD4; CDK4; CNA1 COL2A1; CYP27B1; DRPLA; ENUR2; FEOM1; FGF23; PPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMG A2; 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; TP11; 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; GALC; GCH1 IBGC1; IGH@; grupo IGH C; IGHG1; IGHM; IGHR; IV; LTBP2; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP NPC2; PABPN1; PSEN1; PYGL; RPRIP1; 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; FES; HCVS; HEXA IVD; LCS1; LIPC; MYO5A; OCA2; OTSC1; PWCR; RLB P1; 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; 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; PRKAR1A; PRKCA; PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLAH RARA; RCV1; RSA1; 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; LCF5; 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; TNNT3 TYROBP; ADA; AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEEV1; FTL1; GDF5 GNAS; GSS; HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1; PI3; PPGC; 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; 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;
 5 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; FDPSL5 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;
 10 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;
 15 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;
 20 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; MTTP; MTTT1; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PRO1;
 PROP1; RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM; y TTD.

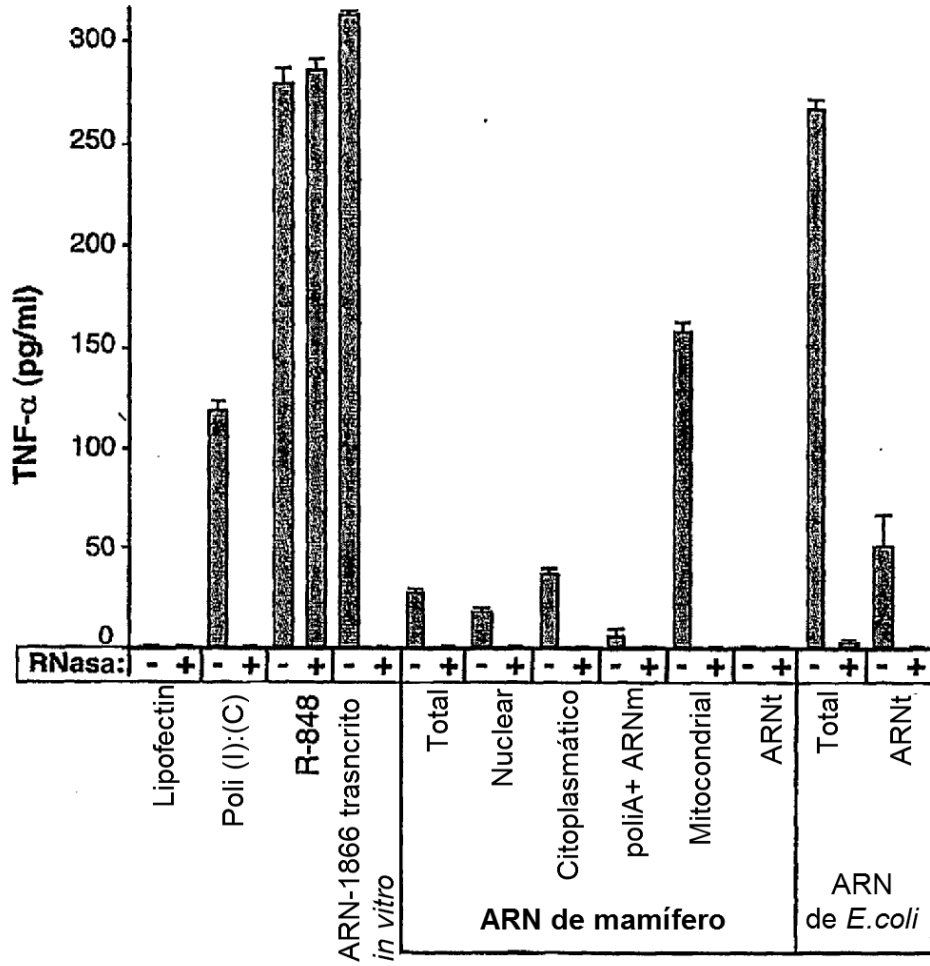


Figura 1

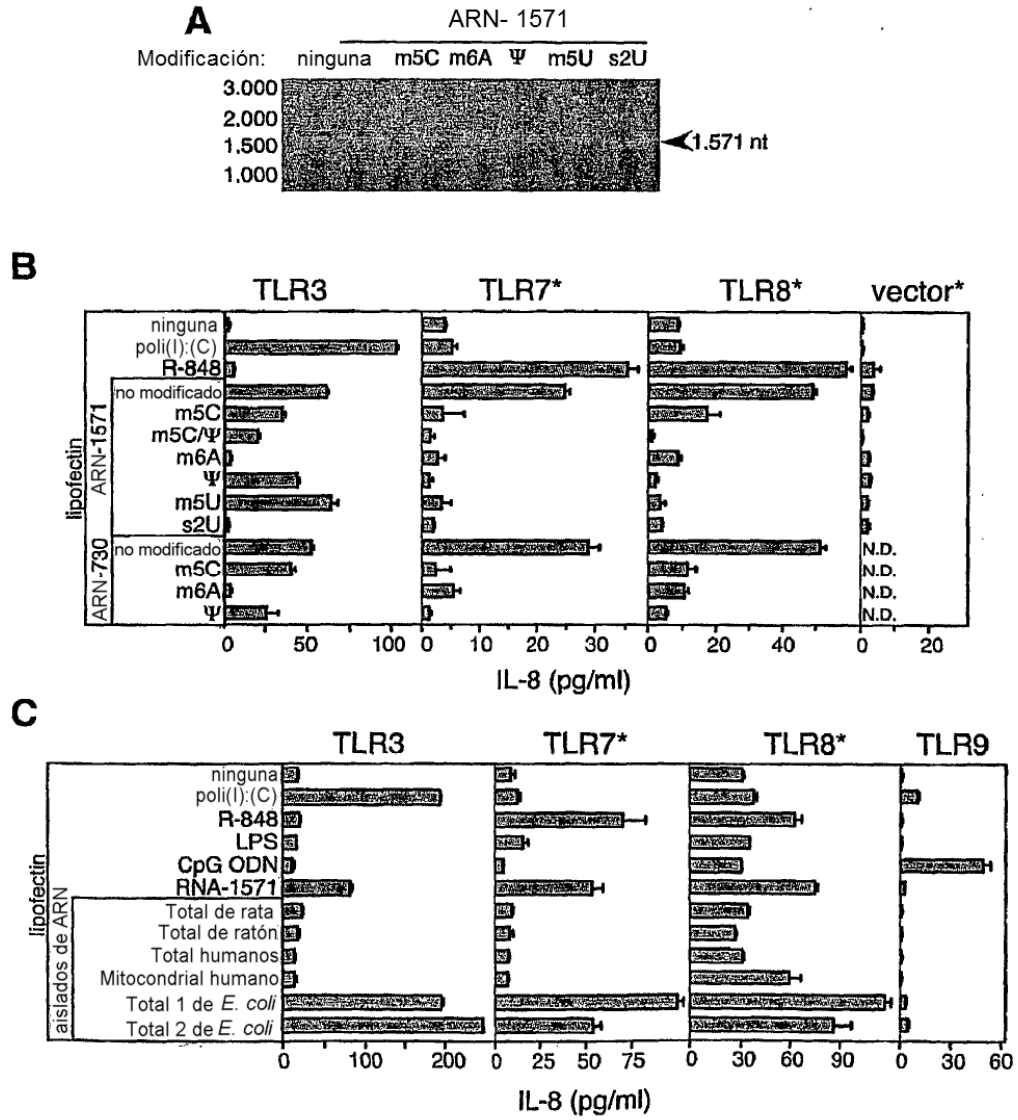


Figura 2

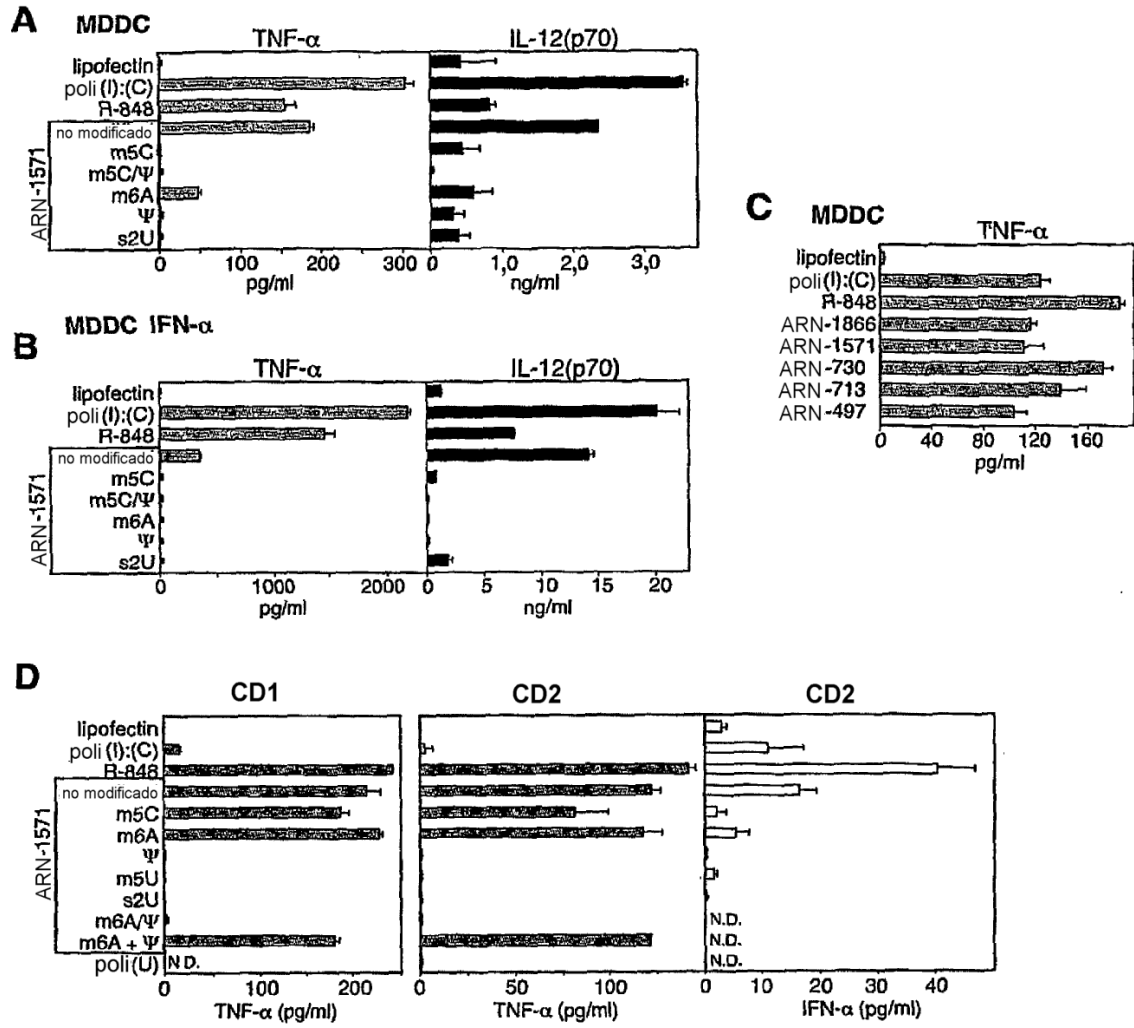


Figura 3A-D

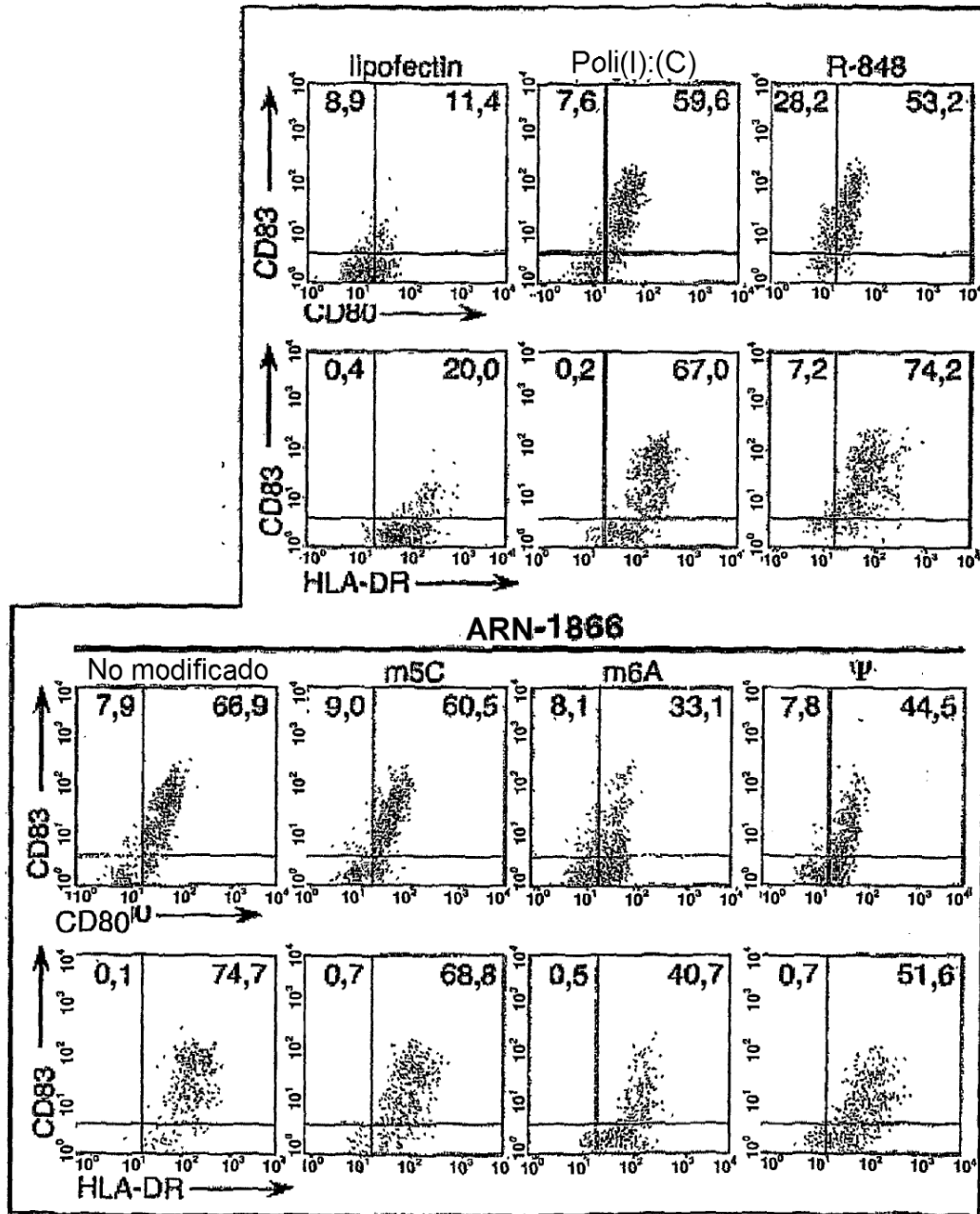
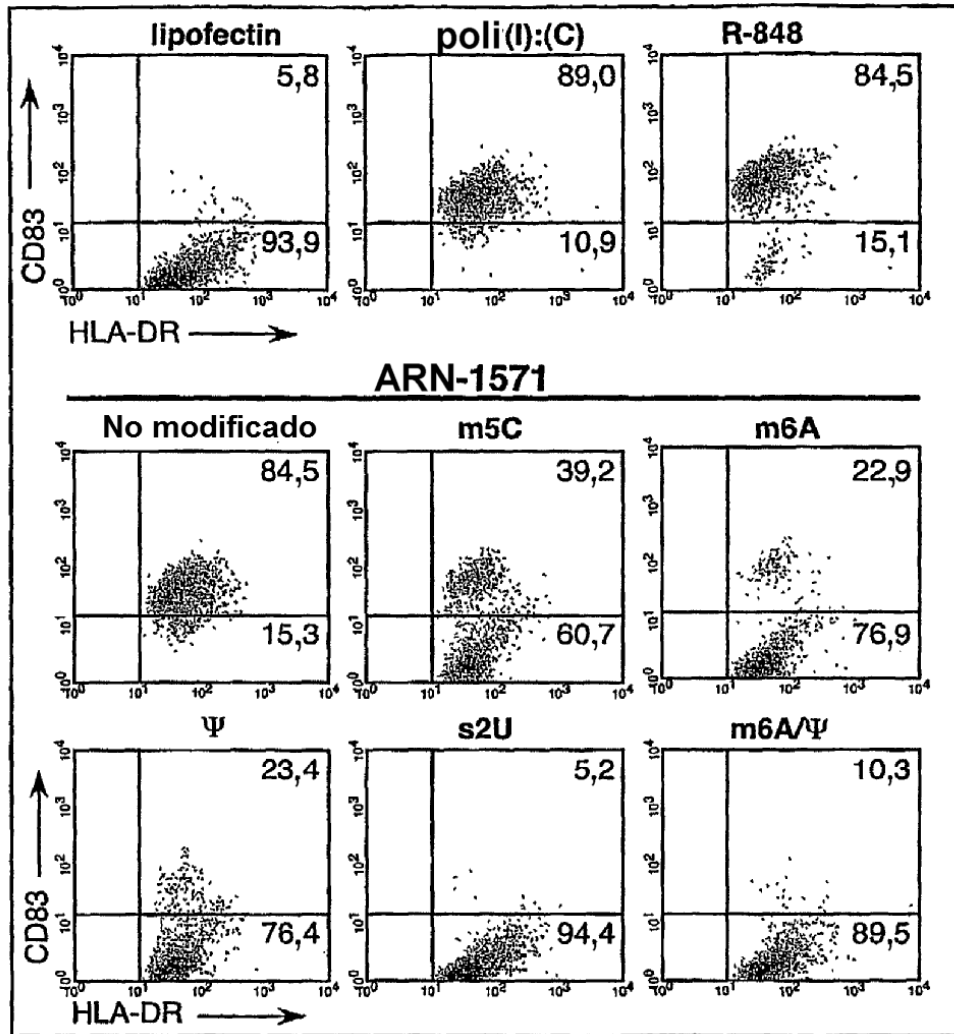


Figura 3E

A



B

	TNF- α * pg/ml	CD80 Fluorescencia media	CD86 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

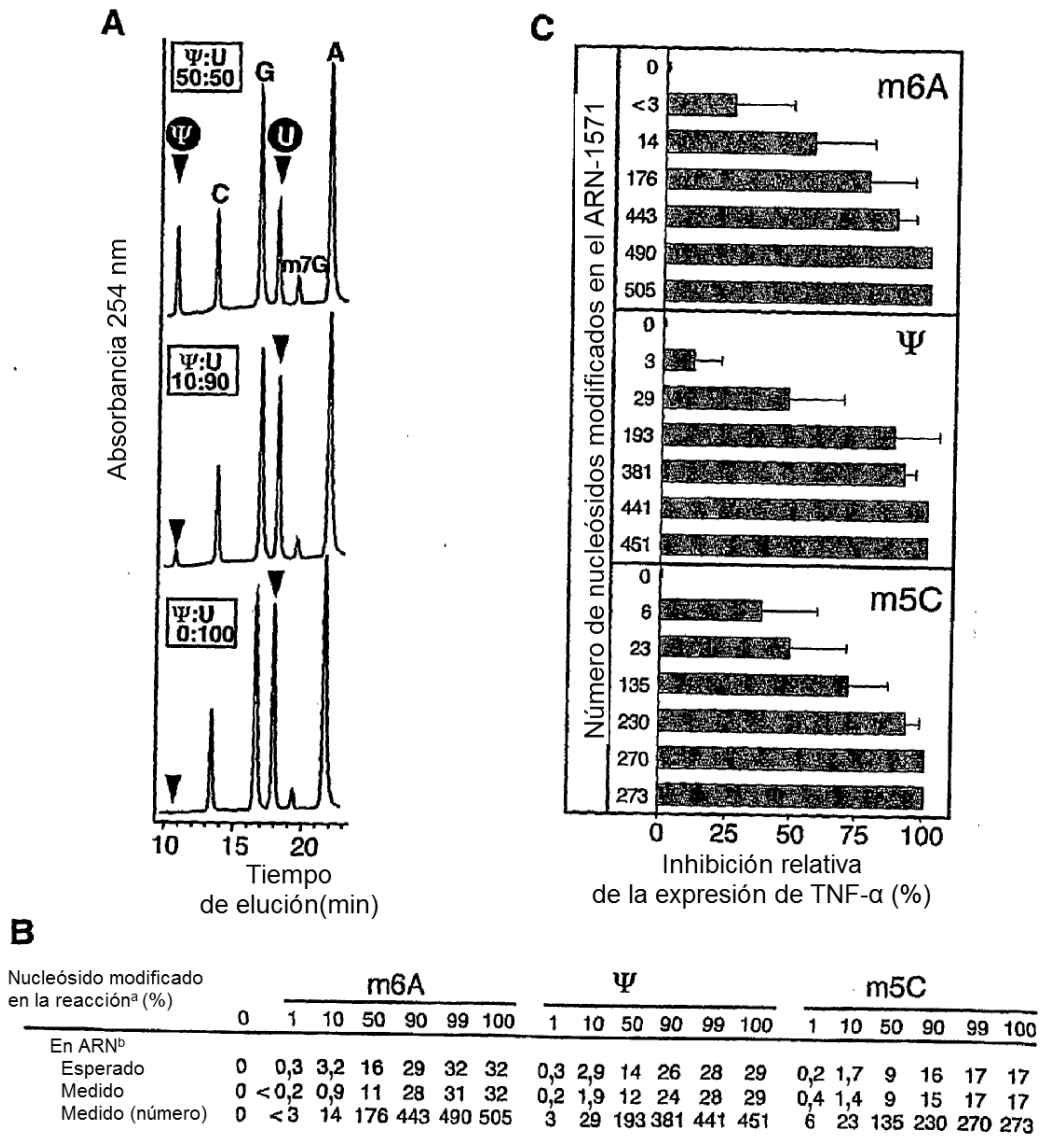


Figura 5

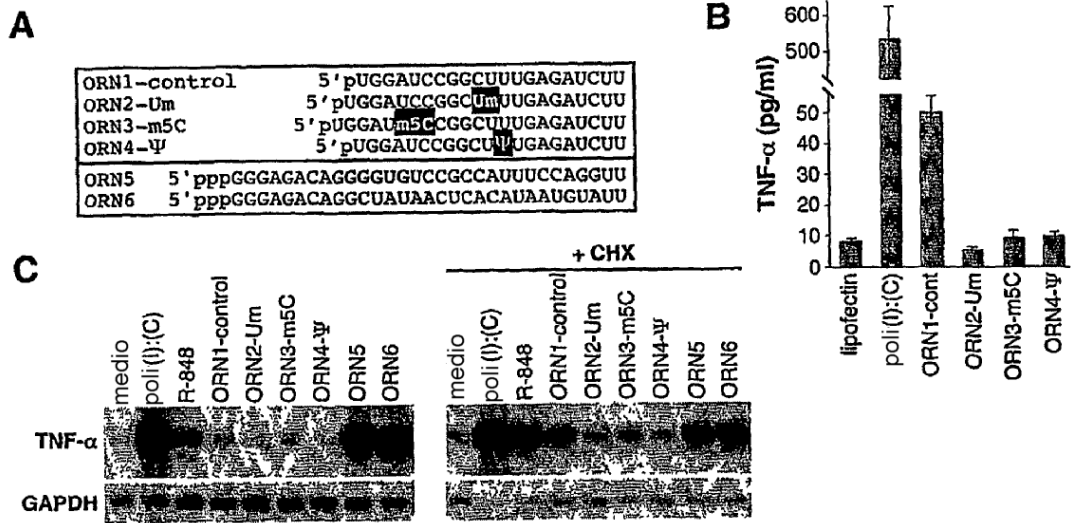


Figura 6

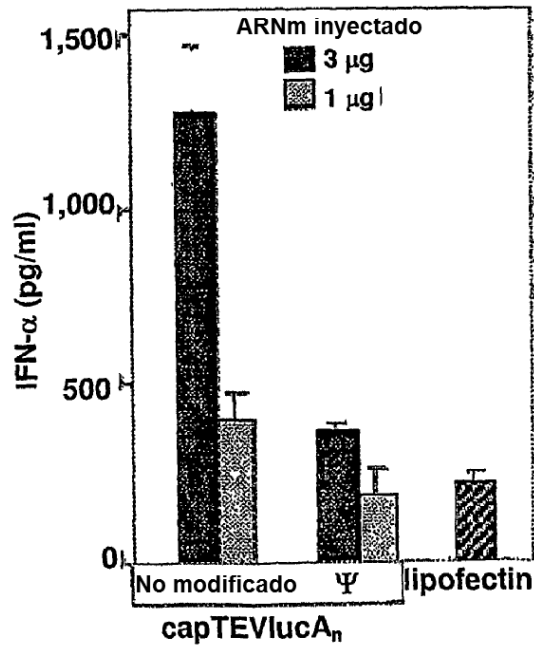


Figura 7A

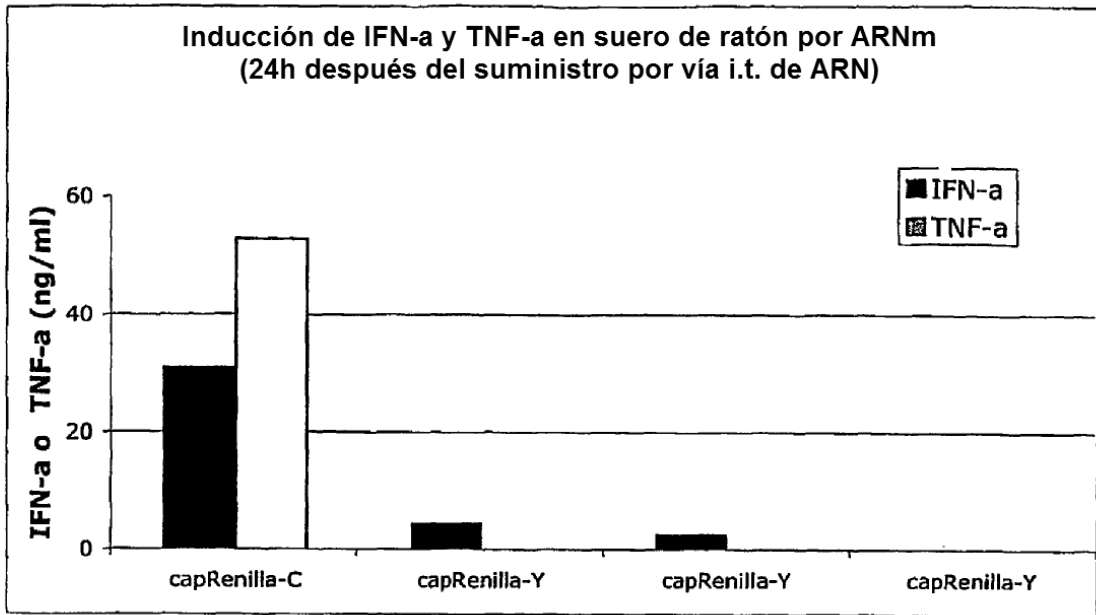


Figura 7B

Activación de PKR por ARNm

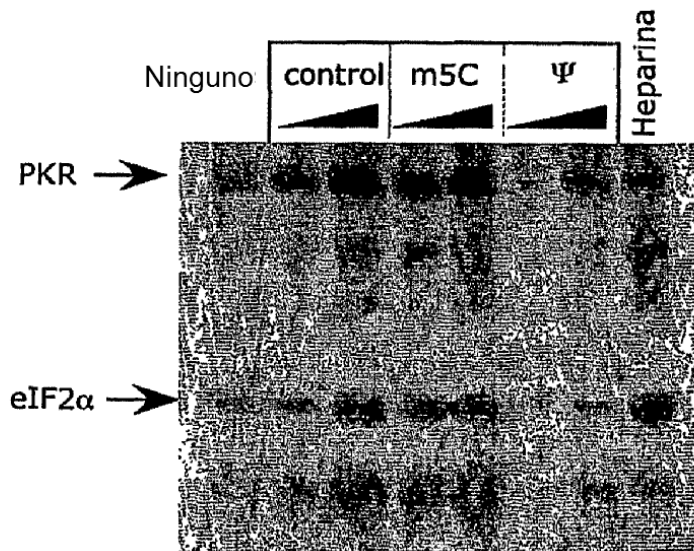


Figura 8

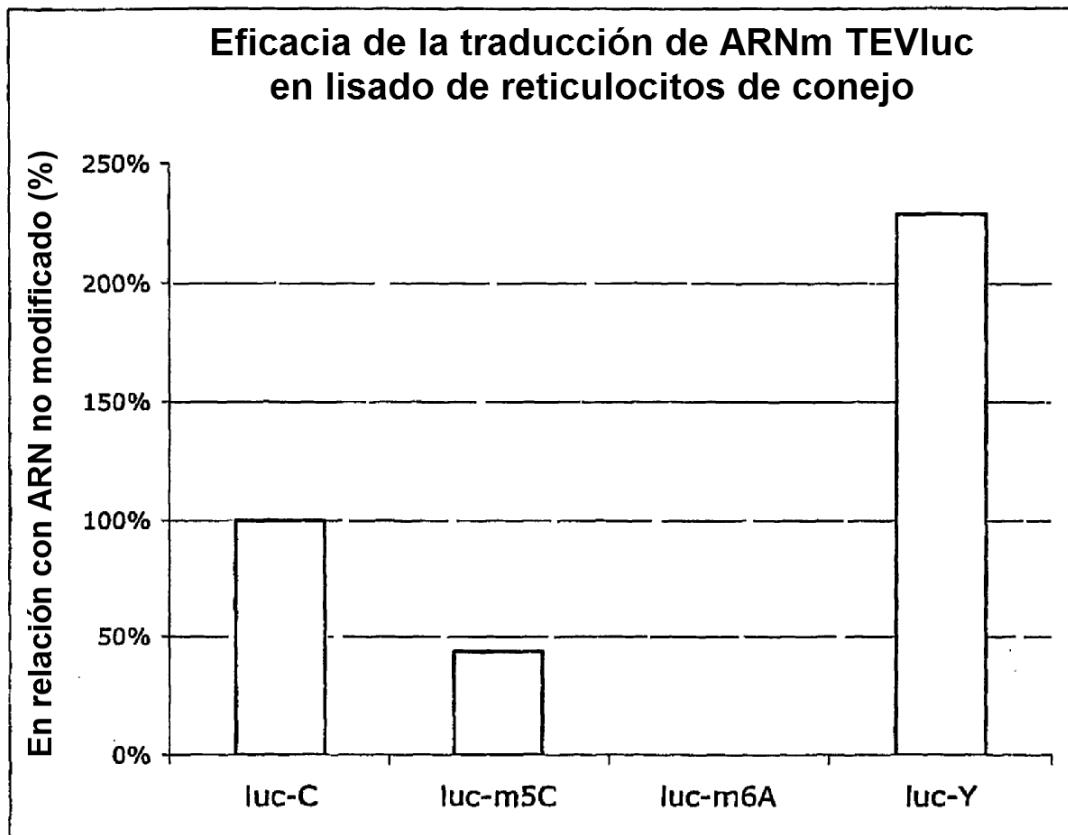


Figura 9

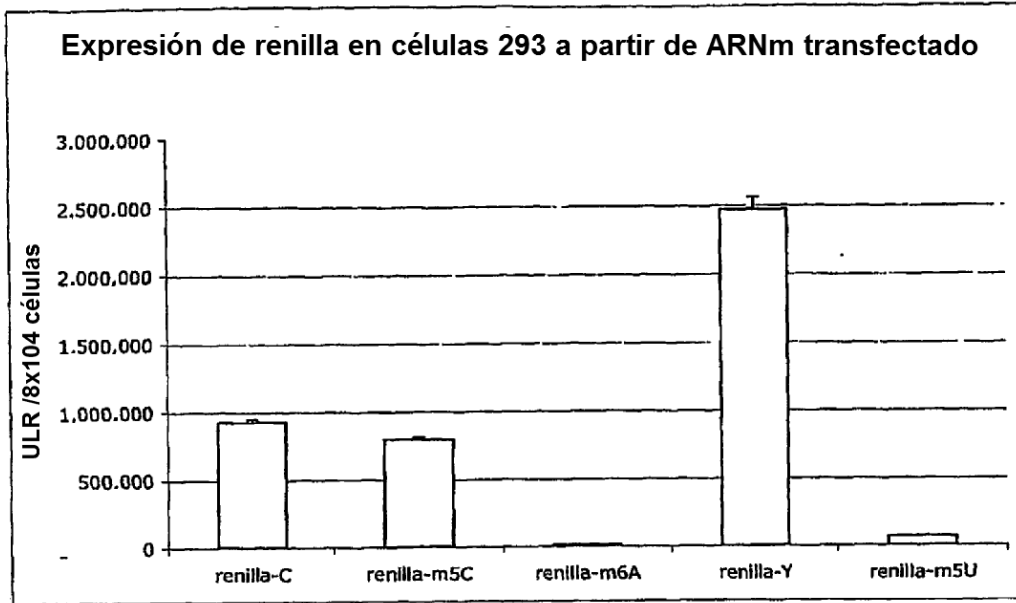


Figura 10A

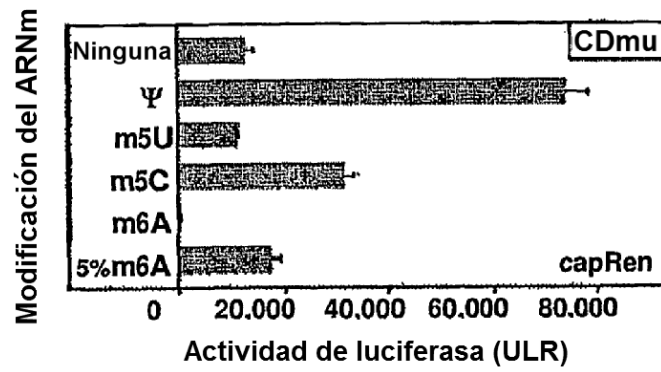


Figura 10B

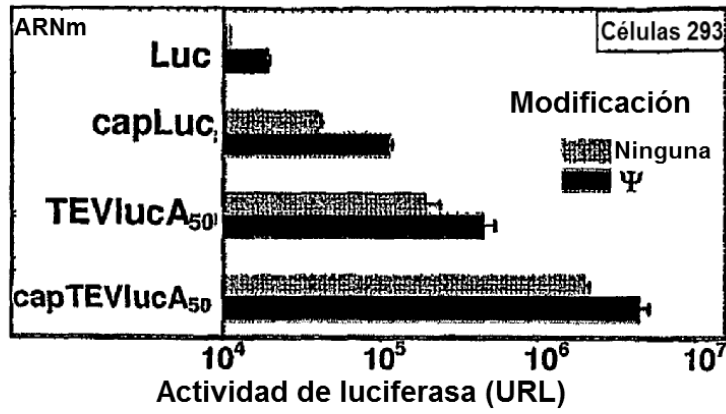


Figura 11A

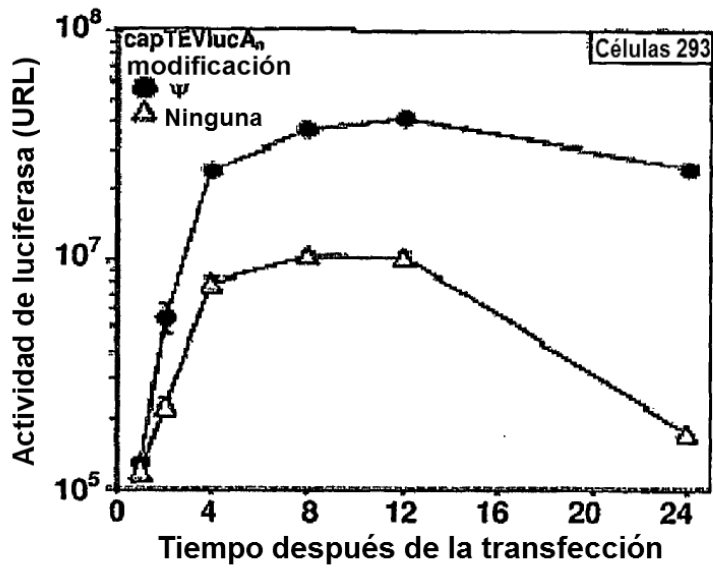


Figura 11B

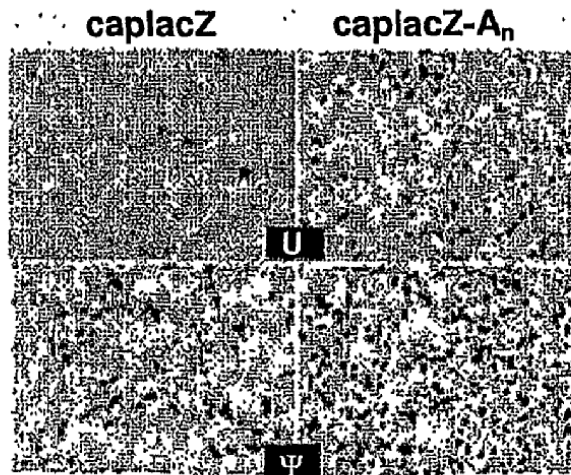


Figura 11C

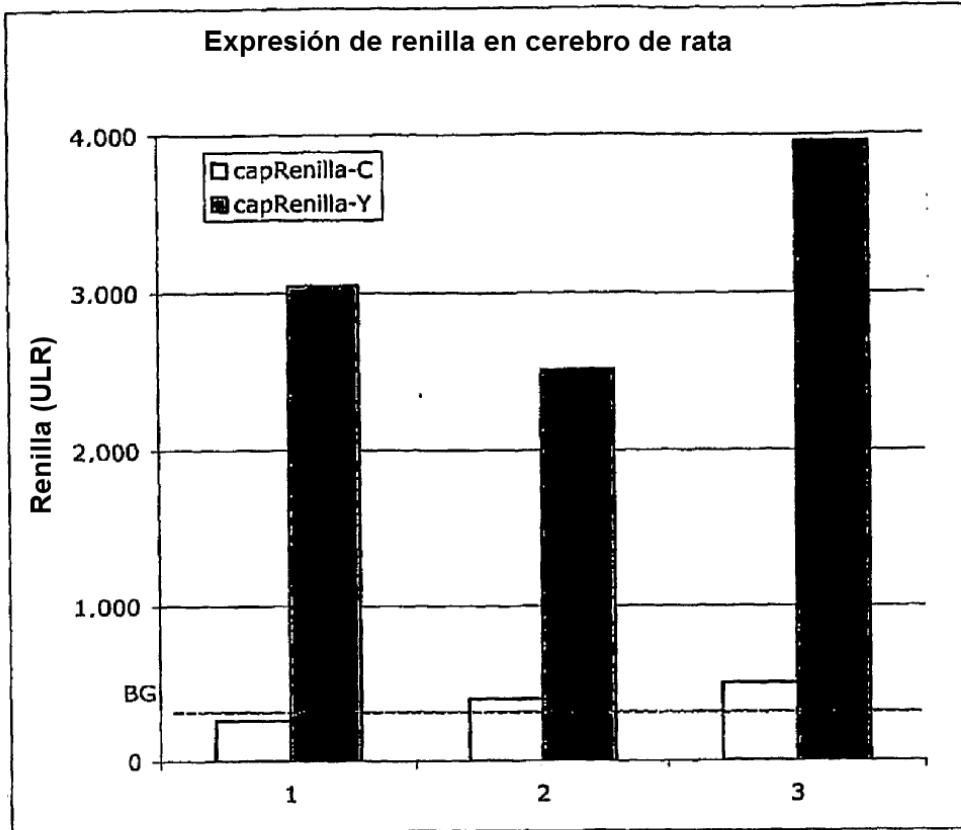


Figura 12A

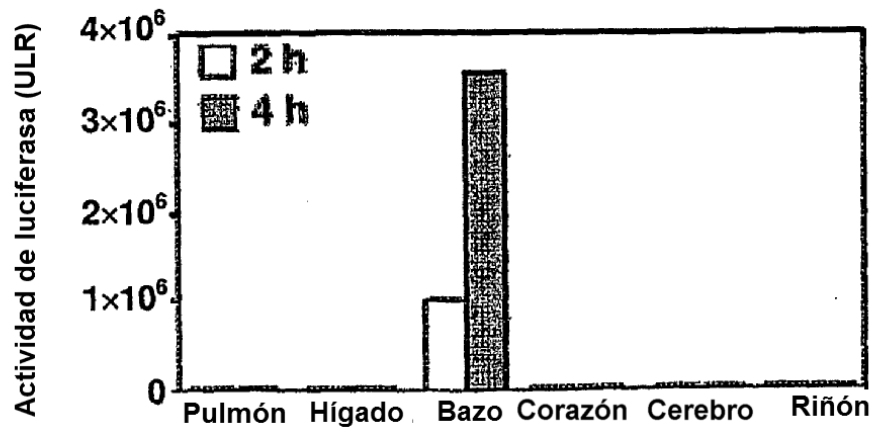


Figura 12B

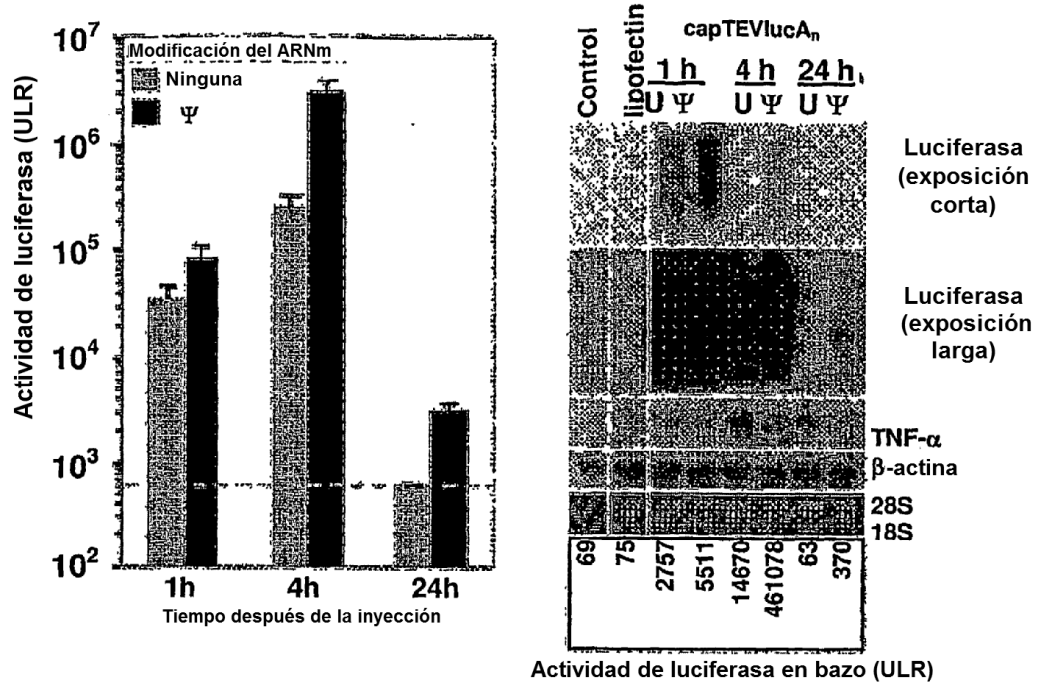


Figura 12C

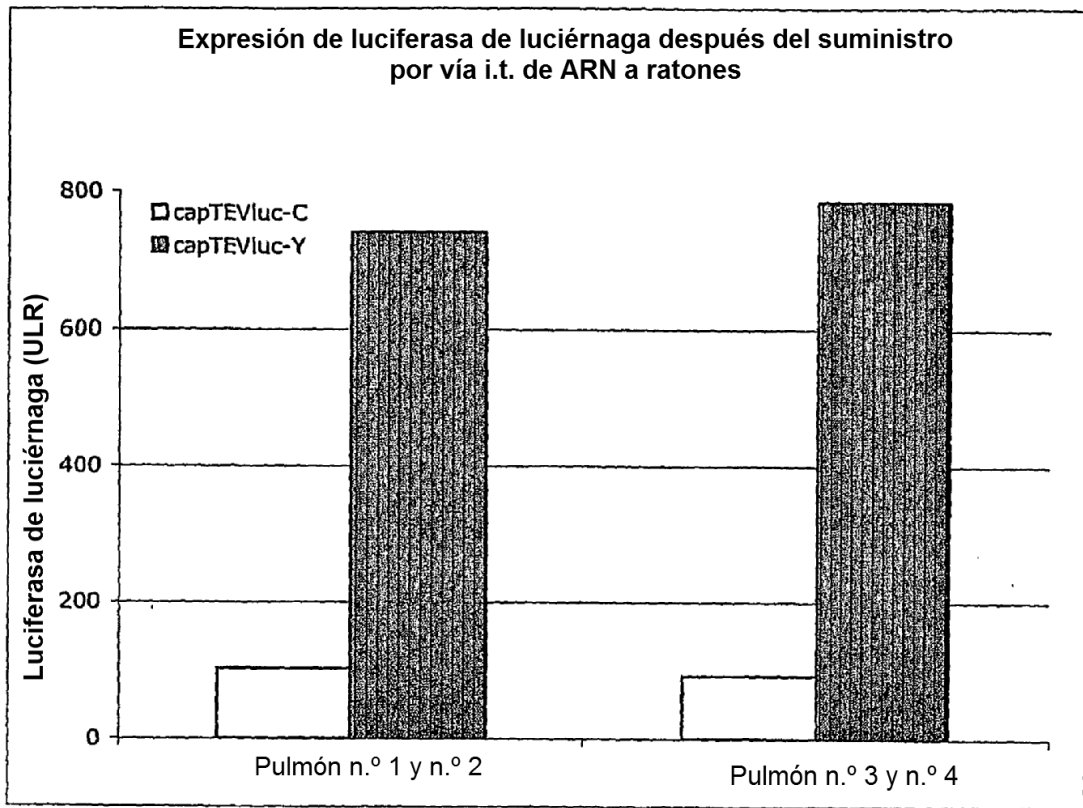


Figura 12D

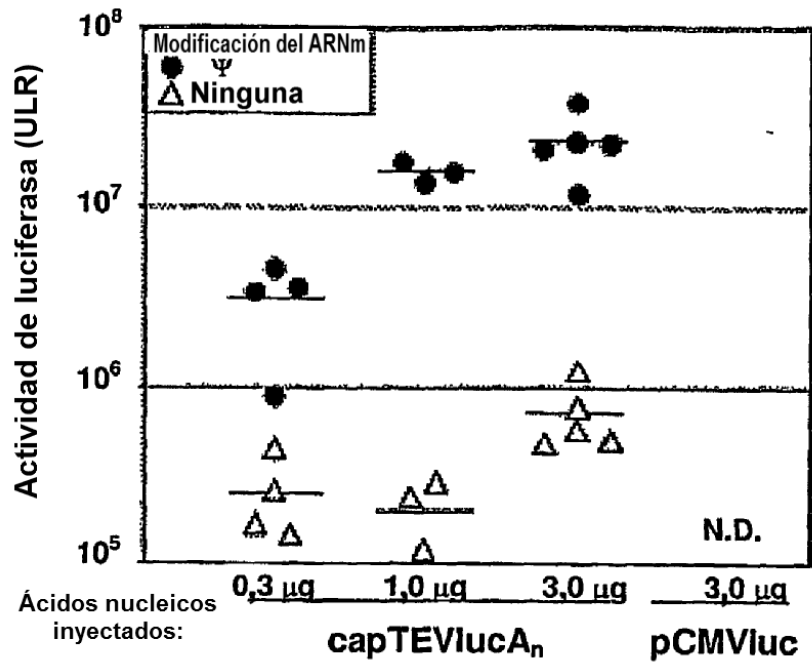


Figura 13

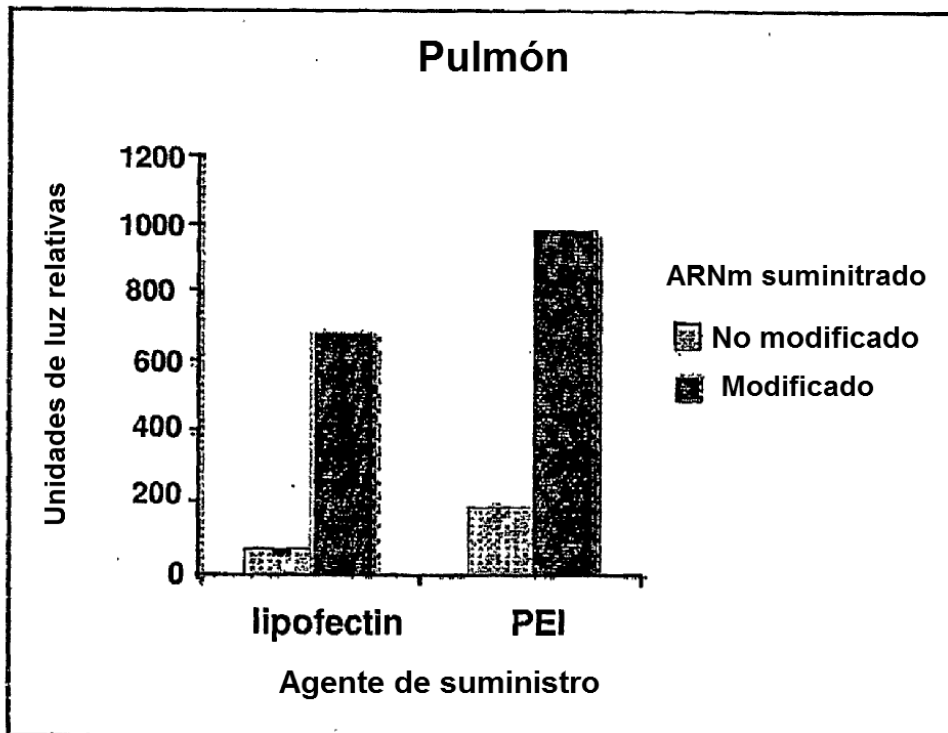


Figura 14

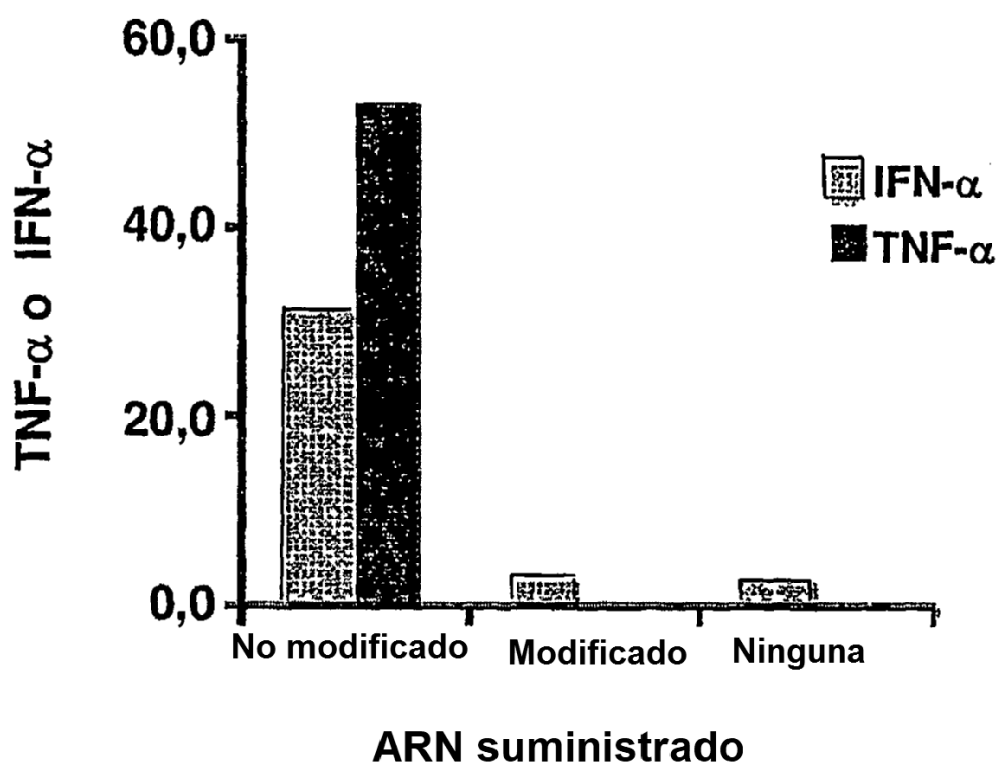


Figura 15