

ÖZET

MODİFİYE EDİLMİŞ NÜKLEOSİDLERİ İÇEREN RNA VE KULLANIM YÖNTEMLERİ

5

Mevcut buluş, psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid ihtiva eden RNA, oligoribonükleotid ve poliribonükleotid moleküllerini, bunları içeren gen terapisi vektörlerini, bunları sentezleme yöntemlerini ve gen replasmanı, gen terapisi, gen transkripsiyon susturması ve molekülleri içeren terapötik proteinlerin in vivo dokuya verilmesi yöntemlerini sağlamaktadır. Mevcut buluş ayrıca RNA, oligoribonükleotid ve poliribonükleotid moleküllerinin immünojenikliğini azaltma yöntemleri sağlar.

10

İSTEMLER

1. Bir rekombinant protein üretmek amacıyla bir memeli hücrelerini indüklemek için bir terapötik olmayan yöntem olup, özelliği; yöntemin şunları kapsamaktadır: bahsedilen memeli hücrelerinin söz konusu rekombinant proteini kodlayan açık bir okuma çerçevesi içeren *in vitro*-sentezlenmiş mRNA ile temas ettirilmesi;
- burada *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın, Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin)'i içermesi; ve
- burada, bahsedilen temas ettirmeye yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarının, söz konusu memeli hücrelerinin Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin) içermeyen modifiye edilmemiş bir eşdeğer mRNA ile temas ettirilmesine yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in ilgili miktarından daha az olmasıdır.
2. İstem 1'in yöntemi olup, özelliği; burada bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın şunları içermesidir:
- A. bir poli-A kuyruğu;
- B. bir m^7GpppG başlığı;
- C. bir başlıktan bağımsız translasyonel arttırıcı; veya
- D. sitidin yerine modifiye edilmiş nükleosid 5-metilsitidin (m^5C).
3. İstem 1 veya 2'nin yöntemi olup, özelliği; burada bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA tarafından kodlanan bahsedilen proteinin şunlardan oluşan gruptan seçilmesidir: eritropoietin (EPO); ateşböceği lusiferazı, Renilla lusiferazı, bakteriyel beta-galaktosidaz (lacZ) ve yeşil floresan proteininden (GFP) seçilen bir tespit edilebilir enzim; MYC ve SRY veya MCOP'tan seçilen bir transkripsiyon faktörü; aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir büyüme faktörü veya sitokin: trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), Büyüme faktörü-beta1 (TGF-beta1), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), alfa-melanosit uyarıcı hormon (alfa-MSH); insülin

benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-I); IL-4; IL-13; ve IL-10; indüklenebilir nitrik oksit sentazı (İNOS); bir ısı şoku proteini; Kistik Fibroz Transmembran İletkenlik Düzenleyici (CFTR); katalaz, fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz-1 ve süperoksit dismutaz-2 arasından seçilen antioksidan aktiviteye sahip bir enzim; Bruton tirozin kinazı; adenosin deaminaz; ekto-nükleosit trifosfat difosfidrolaz; 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; AHHR; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS; BMPR2; CHRNA1; CM- CWTB; 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; UGT1 A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFHX1B; ACAA1; AGS1; AGTR1; AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTB; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP; CPO; CRV; CTNNB1; DEM; ETM1; FANCD2; FIH; FOXL2; GBE1; GLB1; 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; ASMD; BFHD; CNGA1;
 CRBM; DCK; DSPP; DTD2P2; ELONG; ENAM; ETFDH; EVC; F11; FABP2;
 FGA; FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC; GNPTA; GNRHR; GYP A; HCA; HCL2;
 5 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;
 10 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; SMA0; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFBI;
 ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB; BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1,
 15 COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1; ELOVL4; EPM2A; ESR1; EYA4; F13A1;
 FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR; GSE; HCR; HFE; HLA-A; HLA-DPB1;
 HLA-DRA; HPFH; ICS1; IDDM1; IFNGR1; IGAD1; IGF2R; ISCW; LAMA2;
 LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCS1; MUT; MYB; NEU1; NKS1; NYS2; OA3;
 ODDD; OFCO; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1;
 20 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; CHORDOMA; CLCN1; CMH6; CMT2D; COL1A2; CRS; CYMD; DFNA5;
 25 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; P0N1; PPP1R3A;
 PRSS1; PTC; PTPN12; RP10; RP9; SERPINE1; SGCE; SHFM1; SHH;
 SLC26A3; SLC26A4; SLOS; SMAD1; TBXAS1; TWIST; ZWS1; ACHM3;
 30 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;
 35 WRN; ABCA1; ABL1; ABO; ADAMTS13; AK1; ALAD; ALDH1A1; ALDOB; AMBP;

AMCD1; ASS; BDMF; BSCL; C5; CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1;
 CRAT; DBH; DNAIL1; 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;
 5 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;
 10 PTEN; RBP4; RDPA; RET; SFTPA1; SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1;
 TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8; ACAT1; ALX4; AMPD3; ANC; APOAL;
 APOA4; APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1; CD3E; CD3G;
 CD59; CDKNLC; CLN2; CNTF; CPT1 A; CTSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT;
 DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2; GIF;
 15 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;
 20 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; FPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMGA2; HMN2; HPD; IGF1; KCNA1;
 KERA; KRAS2; KRT1; KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRTHB6;
 25 LDHB; LYZ; MGCT; MPE; MVK; MYL2; OAP; PAH; PPKB; PRB3; PTPN11;
 PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1; SCA2; SCNN1A; SMAL; SPPM; SPSMA; TBX3;
 TBX5; TCF1; TPI1; TSC3; ULR; VDR; VWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1; CLN5;
 CPB2; ED2; EDNRB; ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2; GJB6; IPF1; MBS1;
 MCOR; NYS4; PCCA; RB1; RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2; SLC25A15;
 30 STARP1; ZNF198; ACHM1; ARVD1; BCH; CTAA1; DAD1; DFNB5; EML1;
 GALC; GCH1; IBGC1; IGH@; IGHC grubu; IGHG1; IGHM; IGHR; IV;
 LTBP2; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1;
 PSEN1; PYGL; RPGRIP1; SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7;
 SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1; TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USHLA; VP;
 35 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;
 5 CTH; CTM; CYBA; CYLD; DHS; DNASE1; 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;
 10 BHD; BLMH; BRCA1; CACD; CCA1; CCZS; CHRN1; CHRNE; CMT1A; COL1A1;
 CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR; GFAP; GH1; GH2;
 GP1 BA; 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;
 15 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;
 20 CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO; LAMA3; LCFS2; MADH4; MAFD1; MC2R;
 MCL; MYP2; NPC1; SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE;
 ATHS; BAX; BCKDHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1A; CCO; CEACAM5; COMP;
 CRX; DBA; DDU; DFNA4; DLL3; DM1; DMWD; E11S; ELA2; EPOR; ERCC2;
 ETFB; EXT3; EYCL1; FTL; FUT1; FUT2; FUT6; GAMT; GCDH; GPI; GUSM;
 25 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;
 30 GDF5; GNAS; GSS; HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1; PI3;
 PPCD; PPGB; PRNP; THBD; TOP1; AIRE; APP; CBS; COL6A1; COL6A2;
 CSTB; DCR; DSCR1; FPDMM; HLCS; HPE1; ITGB2; KCNE1; KNO; PRSS7;
 RUNX1; SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR; CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2;
 CSF2RB; CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR; DIA1; EWSR1; GGT1; MGCR;
 35 MN1; NAGA; NE2; OGS2; PDGFB; PPARA; PRODH; SCO2; SCZD4; SERPIND1;

SLC5A1; SOX10; TCN2; TIMP3; TST; VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2;
 AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2; AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1;
 ARSC2; ARSE; ARTS; ARX; ASAT; ASSP5; ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS;
 BGN; BTK; BZX; C1HR; CACNA1F; CALB3; CBBM; CCT; CDR1; CFNS; CGF1;
 5 CHM; CHR39c; CIDX; CLA2; CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1;
 COD2; COL4A5; COL4A6; CPX; CVD1; CYBB; DCX; DFN2; DFN4; DFN6;
 DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1; ELK1; EMD;
 EVR2; F8; F9; FCP1; FDP5L5; FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3;
 GATA1; GDI1; GDX; GJB1; GK; GLA; GPC3; GRPR; GTD; GUST; HMS1;
 10 HPRT1; HPT; HTC2; HTR2c; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2;
 JMS; KAL1; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2;
 MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGC1; MIC5; MIDI; 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;
 15 OFD1; OPA2; OPD1; OPEM; OPN1LW; OPN1 MW; 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;
 20 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; DJH1;
 25 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;
 30 MTTE; MTTG; MTTI; MTTK; MTTL1; MTTL2; MTTN; MTTT; MTTT1; NAMSD;
 OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PRO1; PROP1;
 RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM; ve TTD.

4. İstemler 1 - 3'ün herhangi birinin yöntemi olup, özelliği;
 burada bahsedilen memeli hücresinin, bir antijen sunan hücre,
 35 bir dendritik hücre, bir makrofaj, bir sinir hücresi, bir beyin

hücresi, bir astrosit, bir mikroglial hücre, ve bir nöron, bir
dalak hücresi, bir lenfoid hücresi, bir akciğer hücresi, bir
akciğer epitel hücresi, bir cilt hücresi, bir keratinosit, bir
endotel hücre, bir alveolar hücre, bir alveolar makrofaj, bir
5 alveolar pnömosit, bir vasküler endotel hücre, bir mezenkimal
hücre, bir epitel hücresi, bir kolonik epitel hücresi, bir
hematopoetik hücre, bir kemik iliği hücresi, bir Claudius
hücresi, bir Hensen hücresi, bir Merkel hücresi, bir Muller
hücresi, bir Paneth hücresi, bir Purkinje hücresi, bir Schwann
10 hücresi, bir Sertoli hücresi, bir asitofil hücre, bir asiner
hücre, bir adipoblast, bir adiposit, bir kahverengi veya beyaz
alfa hücresi, bir amakrin hücresi, bir beta hücresi, bir kapsuler
hücre, bir sementoosit, bir ana hücre, bir kondroblast, bir
kondrosit, bir kromaffin hücresi, bir kromofobik hücre, bir
15 kortikotrof, bir delta hücresi, bir Langerhans hücresi, bir
folliküler dendritik hücre, bir enterokromaffin hücresi, bir
ependimosit, bir epitel hücresi, bir bazal hücre, bir skuamoz
hücre, bir endotel hücre, bir geçişsel hücre, bir eritroblast,
bir alyuvar, bir fibroblast, bir fibrosit, bir foliküler hücre,
20 bir mikrop hücresi, bir gamet, bir ovum, bir spermatozoon, bir
oosit, bir birincil oosit, bir ikincil oosit, bir spermatid, bir
spermatosit, bir birincil spermatosit, bir ikincil spermatosit,
bir mikropinal epitelyum, bir dev hücre, bir glial hücre, bir
astroblast, bir astrosit, bir oligodendroblast, bir
25 oligodendrosit, bir glioblast, bir goblet hücre, bir gonadotrof,
bir granüloza hücresi, bir haemositoblast, bir kıl/tüy hücresi,
bir hepatoblast, bir hepatosit, bir hyalosit, bir interstisyel
hücre, bir jukstaglomeruler hücre, bir keratinosit, bir
keratosit, bir lemmal hücre, bir lökosit, bir granülosit, bir
30 basofil, bir eozinofil, bir nötrofil, bir Lenfoblast, bir B-
Lenfoblast, bir T-Lenfoblast, bir lenfosit, bir B-lenfosit, bir
T-lenfosit, bir yardımcı kaynaklı T-lenfosit, bir Th1 T-
lenfosit, bir Th2 T-lenfosit, doğal bir öldürücü hücre, bir
timosit, bir Kupffer hücresi, bir alveolar makrofaj, bir köpük
35 hücre, bir histiosit, bir luteal hücre, bir lenfositik kök

hücre, bir lenfoid hücre, bir lenfoid kök hücre, bir makroglial hücre, bir mammotrof, bir mast hücre, bir medulloblast, bir megakaryoblast, bir megakaryosit, bir melanoblast, bir melanosit, bir mezanjiyal hücre, bir mezotel hücre, bir metamiyelosit, bir monoblast, bir monosit, bir mukus boyun hücre, bir miyoblast, bir kas hücre, bir kardiyak kas hücre, bir iskelet kası hücre, bir düz kas hücre, bir miyelosit, bir miyeloid hücre, bir miyeloid kök hücre, bir miyoblast, bir miyoepitel hücre, bir miyofibroblast, bir nöroblast, bir nöroepitel hücre, bir nöron, bir odüzerineblast, bir osteoblast, bir osteoklast, bir osteosit, bir oksintik hücre, bir parafoliküler hücre, bir paraluteal hücre, bir peptik hücre, bir perisit, bir çevresel kan mononükleer hücre, bir faeokromosit, bir falanjeal hücre, bir pinalosit, bir pituisit, bir plazma hücre, bir trombosit, bir podosit, bir proeritroblast, bir promonosit, bir promiyeloblast, bir promiyelosit, bir pronormoblast, bir retikulosit, bir retinal pigment epitel hücre, bir retinoblast, bir küçük hücre, bir somatotrof, bir kök hücre, bir sustentaküler hücre, bir teloglial hücre ve bir zimojenik hücre olmasıdır.

5. Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin)'i ihtiva eden bir *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın kullanımı olup, özelliği; bir rekombinant protein üretmek amacıyla bir memeli hücre, bir indüklemek için gen terapisinde bir ilacın hazırlanmasına yönelik olmasıdır, burada bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın, söz konusu rekombinant proteini kodlayan bir açık okuma çerçevesi içermesidir; burada bahsedilen gen terapisinin, bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın bir kişiye tekrarlı uygulaması içermesi; ve burada bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarının, Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin) içermeyen bir modifiye edilmemiş muadil mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-

6, IFN- β veya IL-8'in ilgili miktarından daha az olmasıdır.

6. İstem 5'in kullanımı olup, özelliği; burada bahsedilen rekombinant proteinin, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilmesidir: eritropoietin (EPO); MYC ve SRY veya MCOP'den seçilen bir transkripsiyon faktörü; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), transformasyon büyüme faktörü-beta1 (TGF-beta1), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), alfa-melanosit uyarıcı hormondan (alfa-MSH) oluşan gruptan seçilen bir büyüme faktörü veya sitokin; insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-I); IL-4; IL-13; ve IL-10; uyarılabilir nitrik oksit sentazı (iNOS); bir ısı şoku proteini; Kistik Fibroz Transmembran İletkenlik Düzenleyici (CFTR); katalaz, fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz-1 ve süperoksit dismutaz-2 arasından seçilen antioksidan aktiviteye sahip bir enzim; Bruton tirozin kinazı; adenozin deaminaz; ekto- nükleosit trifosfat difosfidrolaz; ABCA4; ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; AP0A2; 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; AHHR; ALMS1; ALPP; ALS2; APOB; BDE; BDMR; BJS; BMPR2; CHRNA1; CMCWTD; CNGA3; COL3A1; COLAA3; COL4A4; COL6A3; CPS1; CRYGA; CRYGEP1; CYP1B1; CYP27A1; DBI; DES; DYSF; EDAR; EFEMP1; EIF2AK3; ERCC3; FSHR; GINGF; GLC1B; GPD2; GYPC; HADHA; HADHB; HOXD13; HPE2; IGKC; IHH; IRS1; ITGA6; KHK; KYNU; LOT; 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; UGT1 A@; UV24; WSS; XDH; ZAP70; ZFHX1B; ACAA1; AGS1; AGTR1;
 AHSG; AMT; ARMET; BBS3; BCHE; BCPM; BTD; CASR; CCR2; CCR5; CDL1;
 5 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;
 10 THRB; TKT; TM4SF1; TRH; LIMPS; 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; GYP A; HCA; HCL2;
 HD; HTN3; HVBS6; IDUA; IF; JPD; KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2;
 15 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;
 20 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; TGFBI;
 ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB; BF; C2; C4A; CDKN1A; COL10A1;
 COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1; ELOVL4; EPM2A; ESR1; EYA4; F13A1;
 25 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;
 30 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; CHORDOMA; CLCN1; CMH6; CMT2D; COL1A2; CRS; CYMD; DFNA5;
 DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1; FKBP6; GCK; GHRHR; GHS; GLI3; GPDS1;
 35 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;
 5 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;
 10 AMCD1; ASS; BDMF; BSCL; C5; CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1;
 CRAT; DBH; DNAIL1; 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;
 15 SPTLC1; STOM; TDFA; TEK; TMC1; TRIM32; TSC1; TYRP1; XPA; CACNB2;
 COL17A1; CUBN; CXCL12; CYP17; CYP2C19; CYP2C9; EGR2; EMX2;
 ERCC6; FGFR2; HK1; HPS1; IL2RA; LIG1; LIPA; MAT1A; MBL2; MKI67;
 MXI1; NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCBD; PEO1; PHYH; PNLIP; PSAP;
 PTEN; RBP4; RDPA; RET; SFTPA1; SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1;
 20 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;
 25 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;
 30 AAAS; ACADS; ACLS; ACVRL1; ALDH2; AMHR2; AOM; AQP2; ATD; ATP2A2;
 BDC; CIR; CD4; CDK4; CNA1; COL2A1; CYP27B1; DRPLA; ENUR2; FE0M1;
 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;
 35 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; POCA; RB1; RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2; SLC25A15;
 STARP1; ZNF198; ACHM1; ARVD1; BCH; CTAA1; DAD1; DFNB5; EML1;
 5 GALC; GCH1; IBGC1; IGH@; IGHC grubu; IGHG1; IGHM; IGHR; IV;
 LTBP2; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1;
 PSEN1; PYGL; RPGRIP1; SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7;
 SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1; TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USHLA; VP;
 ACCPN; AHO2; ANCR; B2M; BBS4; BLM; CAPN3; CDAN1; CDAN3; CLN6;
 10 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; DNASE1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS;
 15 GAN; HAGH; HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1; HBZ; HBZP; HP; HSD11B2; IL4R;
 LIPB; MC1R; MEFV; MHC2TA; MLYCD; MMVP1; PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS;
 PMM2; PXE; SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2; VDI;
 WT3; ABR; ACACA; ACADVL; ACE; ALDH3A2; APOH; ASPA; AXIN2; BCL5;
 BHD; BLMH; BRCA1; CACD; CCA1; CCZS; CHRN1B; CHRNE; CMT1A; COL1A1;
 20 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;
 25 PMP22; PRKAR1A; PRKCA; PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLAH; RARA; RCV1;
 RMSA1; RP17; RSS; SCN4A; SERPINF2; SGCA; SGSH; SHBG; SLC2A4;
 SLC4A1; SLC6A4; SMCR; SOST; SOX9; SSTR2; SYM1; SYNS1; TCF2; THRA;
 TIMP2; TOC; TOP2A; TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1; BCL2; CNSN; CORD1;
 CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO; LAMA3; LCFS2; MADH4; MAFD1; MC2R;
 30 MCL; MYP2; NPC1; SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE;
 ATHS; BAX; BCK- DHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1 A; 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;
 35 LHB; LIG1; LOH19CR1; LYL1; MAN2B1; MCOLN1; MDRV; MLLT1; NOTCH3;

NPHS1; OFC3; OPA3; PEPD; PRPF31; PRTN3; PRX; PSG1; PVR; RYR1;
 SLC5A5; SLC7A9; STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNI3; TYROBP; ADA; AHCY;
 AVP; CDAN2; CDPD1; CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEGV1;
 FTLL1; GDF5; GNAS; GSS; HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1;
 5 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; NE2; OGS2; PDGFB; PPARA; PRODH; SCO2; SCZD4;
 10 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;
 15 CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5; COL4A6; CPX; CVD1; CYBB; DCX;
 DFN2; DFN4; DFN6; DHOF; DIAPH2; DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP;
 ED1; ELK1; EMD; EVR2; F8; F9; FCP1; FDP5L5; FGD1; FGS1; FMR1;
 FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1; GDX; GJB1; GK; GLA; GPC3; GRPR;
 GTD; GUST; HMS1; HPRT1; HPT; HTC2; HTR2c; HYR; IDS; IHG1; IL2RG;
 20 INDX; IP1; IP2; JMS; KAL1; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA;
 MAOB; MCF2; MCS; MEAX; MECF2; MF4; MGC1; MIC5; MIDI; MLLT7; MLS;
 MRSD; MRX14; MRX1; MRX20; MRX2; MRX3; MRX40; MRXA; MSD; MTM1;
 MYCL2; MYP1; NDP; NHS; NPHL1; NROB1; NSX; NYS1; NYX; OA1; OASD;
 OCRL; ODT1; OFD1; OPA2; OPD1; OEM; OPN1LW; OPN1 MW; OTC; P3;
 25 PDHA1; PDR; PFC; PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2;
 PHP; PIGA; PLP1; POF1; POLA; POU3F4; PPMX; PRD; PRPS1; PRPS2;
 PRS; RCCP2; RENBP; RENS1; RP2; RP6; RPGR; RPS4X; RPS6KA3; RS1;
 S11; SDYS; SEDL; SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX;
 SRS; STS; SYN1; SYP; TAF1; TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC;
 30 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;
 35 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; 5 MTTN; MTPP; MTTs1; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PRO1; PROP1; RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM; ve TTD.

7. Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin) ihtiva eden bir *in vitro*-sentezlenmiş mRNA olup, özelliği; gen terapisinde bir yöntemde 10 kullanıma yönelik olmasıdır,

burada bahsedilen gen terapisinin, bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın bir kişiye tekrarlı uygulaması içermesi; ve burada bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , 15 RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarının, Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin) içermeyen bir modifiye edilmemiş muadil mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in ilgili miktarından daha az olmasıdır.

20 8. İstemler 5 veya 6'nın herhangi birinde olduğu gibi kullanım veya istem 7'deki gibi kullanılmak üzere *in vitro*-sentezlenmiş mRNA olup, özelliği; burada bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın ayrıca m^5C (5-metilsitidin) içermesidir.

TARİFNAME

MODİFİYE EDİLMİŞ NÜKLEOSİDLERİ İÇEREN RNA VE KULLANIM YÖNTEMLERİ

5

BULUŞUN ALANI

Mevcut buluş, Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin) içeren *in vitro* olarak sentezlenmiş mRNA'sı modifiye edilmiş rekombinant proteinler üretmek amacıyla memeli hücrelerini indüklemek için terapötik olmayan yöntemler sağlar. Mevcut buluş ayrıca, gen terapisinde böyle *in vitro* olarak sentezlenmiş, modifiye edilmiş mRNA'yı içeren tıbbi kullanımlar sağlar.

BULUŞUN GEÇMİŞİ

Tamamen doğal olarak oluşan RNA, dört bazik ribonükleotid ATP, CTP, UTP ve GTP'den sentezlenir, ancak dahil edilmiş nükleosidlerin bazıları, neredeyse tüm RNA tiplerinde post-transkripsiyonel olarak modifiye edilir. RNA'da yaklaşık yüz farklı nükleosid değişikliği tanımlanmıştır (Rozenski, J, Crain, P, ve McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999 güncellemesi. Nucl Acids Res 27: 196-197). Modifikasyonların kapsamı ve niteliği değişebilir ve RNA'nın türetildiği organizmanın evrimsel seviyesinin yanı sıra RNA tipine bağlıdır. Ribozomal RNA, hücrel RNA'nın majör bileşeni, memeli hücrelerinde bakterilerden anlamlı ölçüde daha fazla nükleosid modifikasyonu içerir. İnsan rRNA'sı, örneğin, bakteriyel rRNA'dan 10 kat daha fazla psödouridin (Ψ) ve 25 kat daha fazla 2'-O-metillenmiş nükleoside sahipken, rRNA mitokondrisi çok az modifikasyona sahiptir. Transfer RNA (tRNA), RNA'nın en ağır şekilde modifiye edilmiş alt grubudur. Memeli tRNA'sında, nükleosidlerin %25'e kadarı, modifiye edilmişken, prokaryotik tRNA anlamlı ölçüde daha az modifikasyon içerir. Bakteriyel mesajcı RNA (mRNA) herhangi bir nükleosid modifikasyonu içermezken, memeli mRNA'sı modifiye edilmiş nükleosidler, örneğin 5-metilsitidin (m^5C), N6-metiladenozin (m^6A), inozin ve 2'-O-metillenmiş nükleosidleri, ayrıca, 5'-terminal başlığının

bir parçası olan N7'e-metilgüanozin (m⁷G) içerir. Bununla birlikte, nükleosid modifikasyonlarının immünohistimülasyon potansiyel ve RNA'nın translasyon verimi üzerindeki rolü bilinmemektedir. K. Heilman et al. haberci RNA'ya 6-metiladeninin dahil edilmesinin in vitro translasyon verimliliğini arttırdığını açıklamaktadır (K. Heilman et al., "Internal 6-methyladenine residues increase the in vitro translation efficiency of dihydrofolate reductase messenger RNA", International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 1996; 28(7): 823-829).

BULUŞUN ÖZETİ

Mevcut buluşun konusu, ekteki istemlerde ortaya konulduğu gibidir.

Mevcut buluş bir rekombinant protein üretmek için bir memeli hücrelerini indüklemek için terapötik olmayan bir yöntem sağlar, yöntem şunları kapsar: bahsedilen memeli hücrelerini bahsedilen rekombinant proteini kodlayan açık bir okuma çerçevesini ihtiva eden in vitro olarak sentezlenmiş mRNA ile temas ettirilmesini içerir; burada in vitro olarak sentezlenmiş mRNA, Ψ veya m¹Ψ (1-metilpsödouridin)'i içerir; ve burada söz konusu temasa yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN-α, TNF-α, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, IL-6, IFN-β veya IL-8'in miktarı, söz konusu memeli hücrelerinin, Ψ veya m¹Ψ (1-metilpsödouridin)'i içermeyen modifiye edilmemiş bir muadil mRNA ile temas ettirilmesine yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN-α, TNF-α, RANTES, MIP-1α, MIP-1 β, IL-6, IFN-β veya IL-8'in ilgili miktarından azdır.

Mevcut buluş ayrıca Ψ veya m¹Ψ (1-metilpsödouridin) ihtiva eden bir in vitro-sentezlenmiş mRNA'nın gen terapisinde bir rekombinant protein üretmek amacıyla bir memeli hücrelerini indüklemek için bir ilacın hazırlanmasında kullanımını sağlamaktadır, burada bahsedilen in vitro olarak sentezlenmiş mRNA söz konusu rekombinant proteini kodlayan açık bir okuma çerçevesini içerir; burada bahsedilen gen terapisi bahsedilen in vitro-sentezlenmiş mRNA'nın bir kişiye tekrarlı uygulamasını içerir; ve burada bahsedilen in vitro-sentezlenmiş mRNA'nın

uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarı, Ψ veya m¹ Ψ (1-metilpsödouridin) içermeyen bir modifiye edilmemiş muadil mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 a, MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in ilgili miktarından daha azdır.

Mevcut buluş ayrıca bir gen terapisi yönteminde kullanıma yönelik Ψ veya m¹ Ψ (1-metilpsödouridin) ihtiva eden bir *in vitro*-sentezlenmiş mRNA sağlamaktadır, burada bahsedilen gen terapisi bahsedilen *in vitro*-sentezli mRNA'nın bir kişiye tekrarlı uygulamasını içerir; ve burada bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1a, MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarı, Ψ veya m¹ Ψ (1-metilpsödouridin) içermeyen bir modifiye edilmemiş muadil mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarından daha azdır.

Mevcut başvuru bir psödouridin kalıntısı içeren bir mesajcı RNA'yı açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, ilgilenilen bir proteini kodlayan bir RNA molekülünü açıklamaktadır, bahsedilen RNA molekülü bir psödouridin kalıntısı içerir.

Mevcut başvuru, bir *in vitro* transkribe edilmiş RNA molekülünü açıklar, bu molekül, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içerir.

Mevcut başvuru, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid ihtiva eden bir *in vitro* olarak sentezlenmiş oligoribonükleotid açıklamaktadır, burada modifiye edilmiş nükleosid, m⁵C, m⁵U, m⁶A, s²U, Ψ veya 2'-O-metil-U'dur.

Mevcut başvuru, bir *in vitro* olarak sentezlenmiş poliribonükleotid molekülü ihtiva eden bir gen-terapi vektörü açıklamaktadır, burada poliribonükleotid molekülü, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içerir.

Mevcut başvuru, sekansının parçası olarak, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içeren ve ayrıca bir siRNA veya

shRNA ihtiva eden bir çift iplikçikli RNA (dsRNA) molekülünü açıklamaktadır. Bir başka açıklamada, dsRNA molekülü, 50 nükleotit uzunluğundan daha büyüktür. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

5 Mevcut başvuru, bir kişideki aneminin tedavi edilmesinin, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesini, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün eritropoietini kodlaması, böylece bir kişideki aneminin tedavi edilmesini içeren bir yöntemi açıklamaktadır.

10 Mevcut başvuru, bir kişideki bir vazospazmın tedavi edilmesinin, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesini, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün indüklenabilir nitrik oksit sentazı (iNOS) kodlaması, böylece bir kişideki bir vazopazmın
15 tedavi edilmesini içeren bir yöntemi açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, hücrenin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesini, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün bir ısı şok proteinini kodlaması, böylece bir kişideki hücrenin sağkalım oranının iyileştirilmesini içeren bir
20 kişideki hücrenin sağkalım oranının iyileştirilmesinin bir yöntemi açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, kan damarını genişleten prosedürü izleyerek, bir kan damarı hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesini, *in vitro* olarak sentezlenmiş
25 RNA molekülünün bir ısı şok proteinini kodlaması, böylece bir kişideki bir restenoz insidansının azaltılmasını içeren kan damarı restenozunun vaka sıklığının azaltılmasının bir yöntemi açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, bir saç derisi hücresinin bir *in vitro* olarak
30 sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün bir telomerazı veya bir immünosupresif proteini kodlaması, böylelikle saç folikülünden saç büyümesinin arttırılmasını içeren bir kişinin saç derisindeki saç kökünün saç uzamasının arttırılmasının bir
35 yöntemi açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, hücrenin, bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün enzimi kodlaması, böylece bir hücredeki antioksidan aktivitesine sahip bir enzim ekspresyonunun uyarılmasını içeren bir hücredeki antioksidan aktivitesine sahip bir enzim ekspresyonunun uyarılması yöntemini açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyicisini (CFTR) kodlaması, böylece bir kişideki kistik fibrozis tedavisi edilmesini içeren bir kişideki kistik fibrozis tedavisi edilmesinin bir yöntemini açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün bir Bruton tirozin kinazı ile temas ettirilmesi, böylece X bağlantılı bir agamaglobülineminin tedavisi edilmesini içeren bir kişideki X bağlantılı bir agamaglobülineminin tedavisi edilmesinin bir yöntemini açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün bir ADA'yı kodlaması, böylece ADA SCID'nin tedavisi edilmesini içeren bir kişideki bir adenoazin deaminaz şiddetli kombine immün yetmezliği (ADA SCID) tedavisi edilmesi için bir yöntem açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, bir *in vitro* olarak sentezlenmiş poliribonükleotidli bir *in vitro* translasyon aparatının, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içeren *in vitro* olarak sentezlenmiş poliribonükleotid ile temas ettirilmesi, böylece bir rekombinant proteinin üretilmesini içeren bir rekombinant proteinin üretilmesinin bir yöntemini açıklamaktadır.

Mevcut başvuru, modifiye edilmiş bir nükleotid içeren bir *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA molekülünün bir psödouridin ile modifiye edilmiş nükleosid ile sentezleme yöntemini

açıklamakta olup, yöntem, izole edilmiş bir polimerazın bir modifiye edilmemiş nükleotidler ve modifiye edilmiş nükleotid karışımı ile temas ettirilmesini içerir.

5 Mevcut başvuru bir *in vitro* transkripsiyon aparatı açıklamakta olup, şunları içerir: bir modifiye edilmemiş nükleotid, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içeren bir nükleotid ve bir polimeraz. Burada, bir *in vitro* transkripsiyon kiti tarif edilmekte olup, kit şunları içerir: bir modifiye edilmemiş nükleotid, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir
10 nükleosid içeren bir nükleotid ve bir polimeraz.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1. MDDC'ler tarafından transfekte edilmiş doğal RNA ile TNF- α üretimi, modifiye edilmemiş *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA ve bakteriyel ve mitokondril RNA'nın, oldukça immünojenik
15 iken, diğer memeli RNA'sının, zayıf immünojenikliğe sahip olduğunu göstermektedir. İnsan MDDC'leri tek başına Lipofectin® ile enkübe edilmiş veya R-848 (1 μ g/ml) veya RNA (5 μ g/ml) 293 hücreleri (toplam, nükleer ve sitoplazmik RNA'lar), fare kalbi (poliA+ mRNA), insan trombosit mitokondril RNA'sı, sığır
20 tRNA'sı, bakteriyel tRNA ve RNase sindirimi olan veya olmayan toplam RNA (*E. Coli*) ile kompleksleştirilmiştir. 8 saat sonra, üst fazlardaki TNF- α ELISA ile ölçülmüştür. Ortalama değerler $\pm$ SEM gösterilmiştir. Sonuçlar, 3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

25 Şekil 2. RNA tarafından TLR-bağımlı aktivasyon, m⁶A ve s²U modifikasyonunun, TLR3 sinyallemesini bloklarken, tüm modifikasyonların, TLR7 ve TLR8 sinyallemesini blokladığını ve daha az modifiye edilmiş bakteriyel RNA ve modifiye edilmemiş *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA'nın tüm üç TLR'yi aktive ettiğini gösterir. (A) m⁵C, m⁶A, Ψ , m⁵U veya s²U nükleosid
30 modifikasyonları olmaksızın (non) veya bu modifikasyonlara sahip olan *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA-1571 bölüntüleri (1 μ g), denatüre edici agaroz jeli üstünde analiz edilmiş, daha sonra etidyum bromür ile lekelenmiş ve UV ile aydınlatılmıştır.
35 (B) insan TLR3, TLR7, TLR8'i ekprese eden 293 hücreleri ve tek

başına Lipofectin®, Lipofectin®-R-848 (1 µg/ml) veya RNA (5 µg/ml) ile muamele edilmiş kontrol vektörleri. RNA-730 ve RNA-1571 içinde mevcut olan modifiye edilmiş nükleosidler kaydedilmiştir. 293-ELAM-luc hücresi, kontrol hücreleri olarak kullanılmıştır. (C) CpG ODN-2006 (5 µg/ml), LPS (1,0 µg/ml) ve RNA izolatları, sıçan karaciğeri, fare hücre hattı (TUBO) ve insan dalağı (toplam), insan trombosit mitokondril RNA'sı veya iki farklı *E. coli* kaynağından elde edilmiştir. 293-hTLR9 hücreleri kontrol görevi yapmıştır. 8 saat sonra, üst fazlardaki IL-8 ELISA ile ölçülmüştür. Ortalama değerler ± SEM gösterilmiştir. hTLR3-hedefli siRNA içeren hücre hatları asterisk ile gösterilmiştir. Sonuçlar, dört bağımsız deneyi göstermektedir.

Şekil 3. RNA ile transfekte edilmiş DC tarafından sitokin üretimi, tüm modifikasyonların sitokin üretilen DC'nin aktivasyonunu bloke ettiğini, sadece uridin modifikasyonlarının kandan türetilen DC aktivasyonunu bloke ettiğini göstermektedir. GM-CSF/IL-4 ile üretilen MDCC (A, C) veya GM-CSF/IFN-α MDCC'leri (B), ve birincil DC1 ve DC2 (D), 8 ila 16 saat boyunca tek başına Lipofectin®, Lipofectin®-R-848 (1 µg/ml) veya RNA (5 µg/ml) ile muamele edilmiştir. RNA-1571'deki modifiye edilmiş nükleosidler kaydedilir. Üst fazdaki TNF-α, IL-12(p70) ve IFN-α, ELISA tarafından ölçülmüştür. Ortalama değerler ± SEM gösterilmiştir. Sonuçlar, 10 (A ve C), 4 (B), ve 6 (D) bağımsız deneylerini temsil etmektedir. E. DC'nin RNA tarafından aktivasyonu. MDCC, 20 saat süreyle tek başına Lipofectin® ile muamele edilmiş veya pozitif kontroller olarak 1 µg/ml poli(1):(C) veya R-848 (üst panel) ile komplekşleştirilmiş veya Lipofectin® belirtilen RNA (5 µg/ml; alt panel) ile komplekşleştirilmiştir. RNA-1886'deki modifiye edilmiş nükleosidler kaydedilir. Üst fazlardaki TNF-α ELISA ile ölçülmüştür. CD83, CD80'in ekspresyonu ve HLA-DR akış sitometrisi tarafından belirlenmiştir.

Şekil 4. DC tarafından RNA'nın aktivasyonu, tüm modifikasyonların DC aktivasyonunu inhibe ettiğini gösterir. MDCC, 20 saat süreyle tek başına Lipofectin®, Lipofectin®-R-848

(1 µg/ml) veya RNA-1571 ile muamele edilmiş, gösterilen şekilde (5 µg/ml) modifiye edilmiştir. (A) CD83 ve HLA-DR boyaması. (B) Üst fazlardaki TNF-α düzeyleri ve RNA ile enkübasyona yanıt olarak ortalama CD80 ve CD86 floresansı. Ortamın hacmi, yıldız işaretiyle gösterildiği gibi akış sitometrisi için 30 kat artmıştır. Veriler, dört bağımsız deneyi temsil etmektedir.

Şekil 5. Farklı miktarlar içeren başlıklı RNA-1571 (modifiye edilmiş nükleosidin, karşılık gelen modifiye edilmemiş NTP'ye göre %0, 1, 10, 50, 90, 99 ve 100'ü) transkribe edilmiş ve sadece birkaç nükleosidin modifikasyonunun DC'nin aktivasyonunun bir inhibisyonu ile sonuçlandığı bulunmuştur. A. Tüm transkriptler, monofosfatlara sindirilmiş ve modifiye edilmiş nükleosid eklemesinin nispi miktarını belirlemek için ters-faz HPLC ile analiz edilmiştir. Belirtilen (T:U) oranlarında elde edilen temsili absorbans profilleri gösterilmiştir. psödouridin (Ψ), sitidin (C), guanozin (G), uridin (U), 7-metilguanozin ("m7G") ve adenozinin ("A") 3'- monofosfatları için elüsyon süreleri kaydedilir. (B) RNA-1571'in modifiye edilmiş nükleosid içeriği. m⁶A, Ψ veya m⁵C in RNA- 1571'in beklenen yüzdesi transkripsiyon tepkimesi ve RNA-1571'in nükleosid bileşimindeki (A: 505, U: 451, C: 273, G: 342) modifiye edilmiş NTP'nin nispi miktarı baz alınarak hesaplanmıştır. Modifiye edilmiş nükleosid içeriği için ölçülen değerler, HPLC kromatogramlarının kantitasyonu baz alınarak belirlenmiştir. Notlar: A: Sırasıyla, ATP UTP ve CTP'ye göre m⁶ATP, ΨTP ve m⁵CTP için değerler (%). B: tüm NMP'lere göre m⁶A, Ψ ve m⁵C monofosfatları için değerler. (C) MDCC, belirtilen miktarda m⁶A, Ψ veya m⁵C içeren Lipofectin® ile kompleksleştirilmiş başlıklı RNA-1571 (5 µg/ml) ile transfekte edilmiştir. 8 saatten sonra, üst fazlardaki TNF-α ölçülmüştür. TNF-α'nın nispi inhibisyonu olarak ifade edilen veriler. 3 bağımsız deneyde elde edilen ortalama değerler ± SEM gösterilmiştir.

Şekil 6. Oligoribonükleotid transfekteli DC'ler tarafından TNF-α ekspresyonu az sayıda modifiye edilmiş nükleosidin DC aktivasyonunu azalttığını göstermektedir. (A) Kimyasal olarak

sentezlenmiş (ORN1-4) veya *in vitro* transkribe edilmiş (ORN5-6) oligoribonükleotidlerin sekansları (ORN) gösterilmiştir. Modifiye edilmiş nükleosidler Um (2'-O-metiluridin), m⁵C ve Ψ'in konumlar vurgulanmıştır. İnsan MDDC'si, tek başına Lipofectin® (ortam), R-848 (1 µg/ml) veya RNA (5 µg/ml) ile kompleksleştirilmiş Lipofectin® ile transfekte edilmiştir. Belirtildiği yerlerde, hücreler 2,5 µg/ml sikloheksimid (CHX) ile muamele edilmiştir. (B). 8 saat enkübasyondan sonra, üst fazdaki TNF-α ölçülmüştür. (C) Hücrelerdeki RNA, Northern blot ile analiz edilmiştir. 3 bağımsız deneyin temsili ortalama değerleri ± SEM gösterilmiştir.

Şekil 7. A. ΨmRNA, *in vivo* olarak pro-enflamatuvar sitokin üretimini uyarmaz. Serum örnekleri (enjeksiyondan 6 saat sonra) ELISA ile analiz edilmiş ve 3 µg modifiye edilmemiş mRNA'nın 3 µg Ψ-modifiye edilmiş mRNA'nın yaptığından (P < 0,001) daha yüksek bir düzeyde IFN-α indüklediğini ortaya koymuştur. 3 µg Ψ-modifiye edilmiş mRNA tarafından indüklenen IFN-α düzeyleri, hayvanlara, kompleksleştirilmemiş lipofektin enjekte edildiğinde elde edilenlere benzer olmuştur. Değerler ortalama ± O.S.H. şeklinde ifade edilmiştir. (n = 3 veya 5 hayvan/grup). B. Benzer sonuçlar TNF-α ile gözlemlenmiştir.

Şekil 8. psödouridin (Ψ) içeren mRNA PKR'yi aktive etmez. Ψ: psödoüridin. Kontrol: modifiye edilmemiş RNA. m⁵C: m⁵C modifikasyonlu mRNA.

Şekil 9. Tavşan retikulosit lizatındaki psödouridin-içeren mRNA'dan yüksek lusiferaz ekspresyonu. Luc- Y: psödouridin modifikasyonlu mRNA; luc-C: modifiye edilmemiş RNA. Veriler, lusiferaz etkinliğinin modifiye edilmemiş lusiferaz RNA'ya normalleştirilmesiyle eksprese edilir.

Şekil 10. Hücrelerde kültürlenmiş psödouridin-içeren mRNA'dan renilla'nın artan ekspresyonu. A. 293 hücreleri. B. Mürin primer, kemik iliği türevli fare dendritik hücreleri. renilla- Y: psödouridin modifikasyonlu mRNA; renilla- C: modifiye edilmemiş RNA. RNA, m⁵C, m⁶A, ve m⁵U ile belirtilen şekilde modifiye edilmiştir.

Şekil 11. A. ΨmRNA'nın translasyon verimi üzerinde 3' ve 5' elemanlarının aditif etkisi. 293 hücreleri, konvansiyonel ateş böceği lusiferazı ve 5' başlığı (capLuc), 50 nt-uzun 3' poliA kuyruklu (TEVIucA50), bu elemanların (capTEVIucA50 ve Luc, sırasıyla) her ikisi veya ikisinden hiçbirine sahip olan ΨmRNA'lar ile transfekte edilmiştir. Hücreler 4 saat sonra lize edilmiş ve toplam lizatların bölüntülerinde (1 / 20'si) lusiferaz aktiviteleri ölçülmüştür. B. ΨmRNA, modifiye edilmemiş mRNA'dan daha kararlıdır. Modifiye edilmemiş veya Ψ-modifiye edilmiş nükleosidler içeren capTEVIucAn ile transfekte edilmiş 293 hücreleri, aşağıdaki belirtilen transfeksiyon sürelerinde lize edilmiştir. Lizatların bölüntüleri (1/20'nci) lusiferaz açısından test edilmiştir. Standart hatalar, hata çubuklarıyla görüntülenemeyecek kadar küçük olmuştur. C. β-galaktosidaz ekspresyonu, konvansiyonel mRNA ile karşılaştırıldığında ΨmRNA ile gelişmiştir. 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş 293 hücreleri bakteriyel β-galaktosidazı (lacZ) kodlayan lipofektin ile kompleksleştirilmiş mRNA'lar (0,25 µg/çukur) ile transfekte edilmiştir. Transkriptler, başlık ve ya 30 nt-uzunluklu (caplacZ) ya da -200 nt-uzunluklu (caplacZ-An) 3' poliA kuyruğuna sahip olmuştur. Konvansiyonel U veya Ψ nükleosidleri kullanılarak yapılan yapılar test edilmiştir. Hücreler sabitlenmiş ve transfeksiyondan 24 saat sonra X-gal ile boyanmıştır. Görüntüler, temsili gözlerden ters mikroskopi (40 ve 100X büyütme) ile alınmıştır.

Şekil 12. A. modifiye edilmiş veya modifiye edilmemiş kodlayan mRNA'nın intraserebral enjeksiyonundan sonra renilla'nın ekspresyonu. Sıçan beyin korteksi, 8 bölge/hayvana enjekte edilmiştir. Bir hemisfere başlıklı, psödouridin modifikasyonlu renilla-kodlayan RNA (capRenilla-Y) enjekte edilirken, karşılık gelen hemisfere nükleosid modifikasyonsuz başlıksız RNA (capRenilla-C) enjekte edilmiştir. 2 hayvandan (6 enjeksiyon bölgesi) veriler gösterilmektedir. BG; testin daha düşük tespit seviyesi. B. İntravenöz ΨmRNA dalakta eksprese edilir. Lipofektin ile kompleksleştirilmiş ΨmRNA (0,3 µg

capTEVIucAn/fare) kuyruk veni enjeksiyonu ile uygulanmıştır. Hayvanlar enjeksiyondan 2 ve 4 saat sonra sakrifiye edilmiş ve lusiferaz aktiviteleri lizis tamponunda homojenize edilmiş organların bölüntülerinde (1/10) ölçülmüştür. Değerler tüm organlardaki lusiferaz aktivitelerini temsil eder. mRNA'nın fare kuyruk venine i.v. enjeksiyonundan sonra renilla'nın ekspresyonu. Bağımsız olarak gerçekleştirilen iki deneyden elde edilen veriler sol ve sağ panellerde gösterilmektedir. Dalaklar hasat edilmiş ve homojenize edilmiş ve renilla etkinliği lizat bölüntülerinde ölçülmüştür. C. Ψ mRNA in vivo olarak daha fazla stabilite ve translasyon sergiler. Ψ modifikasyonlu veya olmaksızın lipofektin ile kompleksleştirilmiş capTEVIucAn (0,3 μ g/60 μ I/hayvan) i.v. olarak farelere aktarılmıştır. Hayvanlar enjeksiyondan 1, 4 ve 24 saat sonra feda edilmiş ve dalaklarının 1/2'si lusiferaz enzimi ölçümleri (sol panel) için işlenmiş ve diğer yarısı RNA analizleri (sağ panel) için işlenmiştir. Lusiferaz aktiviteleri, dalakların yarısından yapılmış homojenatın bölüntülerinde (1 /5'inci) ölçülmüştür. Çizilmiş değerler tam dalaklardaki lusiferaz aktivitelerini temsil eder ve ortalama $\pm$ O.S.H şeklinde ifade edilmiştir. (n = 3 veya 4/nokta). D. mRNA'nın intratrakeal enjeksiyonundan sonra ateşböceği lusiferazı ekspresyonu. capTEVIuc-Y: başlıklı, ateş böceği lusiferazını kodlayan psödouridin modifiyeli RNA. CapTEVIuc-C: nükleosid modifikasyonsuz başlıksız RNA.

Şekil 13. Protein üretimi, intravenöz olarak farelere aktarılan mRNA miktarı bağlıdır. Belirtilen miktarlarda lipofektin ile kompleksleştirilmiş nükleik asitler, mRNA Ψ bileşenli veya olmaksızın capTEVIucAn ve pCMVIuc plazmit DNA, 60 μ I/hayvanlık bir hacimde i.v. enjeksiyon ile farelere aktarılmıştır. mRNA veya plazmid DNA enjekte edilen hayvanlar, sırasıyla enjeksiyondan 6 veya 24 saat sonra sakrifiye edilmiş ve lusiferaz aktiviteleri, lizis tamponunda homojenize edilmiş dalakların bölüntülerinde (1/10) ölçülmüştür. Her hayvandan elde edilen değer gösterilir ve kısa yatay çizgiler ortalamayı belirtir; N.D., saptanamaz.

Şekil 14. Kodlayan mRNA'nın intratrakeal iletimi sonrasında ateşböceği lusiferazı ekspresyonu. mRNA, lipofektine kompleksleştirilmiş (veya PEI, belirtilen şekilde) ve hayvanlara Ψ modifikasyonu ile veya olmaksızın 0,3 μg ateş böceği lusiferazı-kodlayan mRNA enjekte edilmiştir, ardından hayvanlar 3 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Akciğerler hasat edilmiş ve homojenize edilmiş ve lusiferaz etkinliği lize edilmiş organ bölüntülerinde ölçülmüştür.

Şekil 15. Ψ mRNA, pulmoner aktarımdan sonra enflamatuvar araçları indüklemeyiz. Lusiferazı kodlayan mRNA veya Ψ mRNA'nın intratrakeal aktarımından sonra serumdaki TNF- α ve IFN- α 'nın indüklenmesi. TNF- α ve IFN- α 'nın serum düzeyleri mRNA aktarımından 24 saat sonra ELISA ile belirlenmiştir.

AYRINTILI AÇIKLAMA

Mevcut buluş bir rekombinant protein üretmek için bir memeli hücrelerini indüklemek için terapötik olmayan bir yöntem sağlar, yöntem şunları kapsar: bahsedilen memeli hücrelerini bahsedilen rekombinant proteini kodlayan açık bir okuma çerçevesini ihtiva eden *in vitro* olarak sentezlenmiş mRNA ile temas ettirilmesini içerir; burada *in vitro* olarak sentezlenmiş mRNA, Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin)'i içerir; ve burada söz konusu temasa yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1a, MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarı, söz konusu memeli hücrelerinin, Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin)'i içermeyen modifiye edilmemiş bir muadil mRNA ile temas ettirilmesine yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1a, MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in ilgili miktarından azdır.

Mevcut buluş ayrıca Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin) ihtiva eden bir *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın gen terapisinde bir rekombinant protein üretmek amacıyla bir memeli hücrelerini indüklemek için bir ilacın hazırlanmasında kullanımını sağlamaktadır, burada bahsedilen *in vitro* olarak sentezlenmiş mRNA söz konusu rekombinant proteini kodlayan açık bir okuma çerçevesini içerir; burada bahsedilen gen terapisi bahsedilen *in*

vitro-sentezlenmiş mRNA'nın bir kişiye tekrarlı uygulamasını içerir; ve burada bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarı, Ψ veya m¹ Ψ (1-metilpsödouridin) içermeyen bir modifiye edilmemiş muadil mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in ilgili miktarından daha azdır.

Mevcut buluş ayrıca bir gen terapisi yönteminde kullanıma yönelik Ψ veya m¹ Ψ (1-metilpsödouridin) ihtiva eden bir *in vitro*-sentezlenmiş mRNA sağlamaktadır, burada bahsedilen gen terapisi bahsedilen *in vitro*-sentezli mRNA'nın bir kişiye tekrarlı uygulamasını içerir; ve burada bahsedilen *in vitro*-sentezlenmiş mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarı, Ψ veya m¹ Ψ (1-metilpsödouridin) içermeyen bir modifiye edilmemiş muadil mRNA'nın uygulanmasına yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarından daha azdır.

Mevcut başvuru, bir psödouridin içeren *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA molekülünü açıklamaktadır.

Mevcut başvuru bir *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA molekülü açıklamakta olup, modifiye edilmiş bir nükleosid içerir.

Mevcut başvuru *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA molekülünü sentezlemek için yöntemler açıklamakta olup, bunlar psödouridin ve/veya modifiye edilmiş nükleosidler içerir.

Mevcut başvuru bir psödouridin kalıntısı içeren bir mesajcı RNA molekülünü açıklamaktadır

Bir uygulamada, mevcut buluşun bileşimleri ve yöntemlerinin bir *in vitro* olarak transkribe edilmiş mRNA molekülü, T7 faj RNA polimerazı ile sentezlenmiştir. Bir başka uygulamada, molekül, SP6 faj RNA polimerazı ile sentezlenmiştir. Bir başka uygulamada, molekül, T3 faj RNA polimerazı ile sentezlenmiştir.

Bir başka uygulamada, molekül, yukarıdaki polimerazlardan

seçilen bir polimeraz ile sentezlenmiştir.

Bir başka uygulamada, mevcut buluşa göre kullanım veya yenilikçi kullanıma yönelik *in vitro* olarak transkribe edilmiş mRNA molekülü, bir oligoribonükleotiddir. Bir başka uygulamada, *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA molekülü, bir poliribonükleotiddir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Mevcut başvuru, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid ihtiva eden bir *in vitro* olarak sentezlenmiş oligoribonükleotid açıklamaktadır, burada modifiye edilmiş nükleosid, m⁵C, m⁵U, m⁶A, s²U, Ψ veya 2'-O-metil-U'dur.

Mevcut başvuru bir *in vitro* olarak sentezlenmiş poliribonükleotid açıklamakta olup, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içerir, burada modifiye edilmiş nükleosid, m⁵C, m⁵U, m⁶A, s²U, Ψ veya 2'-O-metil-U'dur.

Bir başka açıklamada, *in vitro* olarak sentezlenmiş oligoribonükleotid veya poliribonükleotid, kısa bir toka (sh)RNA'sıdır. Bir başka açıklamada, *in vitro* olarak sentezlenmiş oligoribonükleotid, bir küçük engelleyici RNA'dır (siRNA). Bir başka açıklamada, *in vitro* olarak sentezlenmiş oligoribonükleotid, teknikte bilinen herhangi bir başka oligoribonükleotid tipidir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Mevcut buluşun yöntemleri ve kullanımının yenilikçi yönteminin, yenilikçi kullanımının veya mevcut buluşa göre kullanımının mesajcı RNA'sı işlevsel bir proteini kodlayan açık bir okuma çerçevesi içerir. Bir başka açıklamada, RNA molekülü veya oligoribonükleotid molekülü, bir RNzim, vb. olarak fonksiyonel bir proteini (örneğin transkripsiyonel susturmada) kodlamaksızın çalışır. Her bir olasılı mevcut başvurunun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın mesajcı RNA'sı bir poli-A kuyruğu da içerir. Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın mesajcı RNA'sı bir

poli-A kuyruğu içermez. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımı veya mevcut buluşa göre kullanımı mesajcı RNA'sı ayrıca bir m⁷GpppG başlığı içerir. Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımı veya mevcut buluşa göre kullanımı mesajcı RNA'sı bir m⁷GpppG başlığı içermez. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımı veya mevcut buluşa göre kullanımı mesajcı RNA'sı ayrıca bir başlıktan bağımsız translasyonel arttırıcı içerir. Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımı veya mevcut buluşa göre kullanımı mesajcı RNA'sı bir başlıktan bağımsız translasyonel arttırıcı içermez. Bir başka uygulamada, başlıktan bağımsız translasyonel arttırıcı, bir tütün etch virüsü (TEV) başlıktan bağımsız translasyonel arttırıcıdır. Bir başka uygulamada, başlıktan bağımsız translasyonel arttırıcı, teknikte bilinen herhangi bir başka başlıktan bağımsız translasyonel arttırıcıdır. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, bir *in vitro* olarak sentezlenmiş poliribonükleotid molekülü ihtiva eden bir gen-terapi vektörünü açıklamaktadır, burada poliribonükleotid molekülü, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içerir.

Yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımı veya mevcut buluşa göre kullanımı RNA molekülü, m¹Ψ (1-metilpsödouridin) veya ayrıca modifiye edilmemiş (başka bir deyişle Ψ) bir psödouridin parçası ihtiva eden bir *in vitro* sentezlenmiş mRNA'dır. Bir uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımı veya mevcut buluşa göre kullanımı bir mesajcı RNA'sı bir psödouridin içerir. Bir başka uygulamada, RNA molekülü veya oligoribonükleotid molekülü modifiye edilmiş bir nükleosid içerir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

"Psödouridin", bir başka uygulamada, $m^1acp^3\psi$ (1-metil-3-(3-amino-3-karboksipropil) psödouridin anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, $m^1\psi$ (1-metilpsödouridin) anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, ψm (2'-O-metilpsödouridin anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, m^5D (5-metildihidrouridin) anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, $m^3\psi$ (3-metilpsödouridin) anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, ayrıca modifiye edilmemiş bir psödouridin parçası anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, yukarıdaki psödouridinlerin herhangi birinin bir monofosfat, difosfat veya trifosfatı anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, teknikte bilinen herhangi bir başka psödouridin anlamına gelir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın bir mesajcı RNA'sı, bir terapötik oligoribonükleotiddir.

Mevcut başvuru bir rekombinant proteinin bir kişiye aktarılması için bir yöntem açıklamakta olup, yöntem şunları kapsar: kişi ile burada tarif edilen bir RNA, oligoribonükleotid, poliribonükleotid molekülü veya bir gen terapisi vektörünün temas ettirilmesi, böylece bir rekombinant proteinin bir kişiye iletilmesi adımı.

Mevcut başvuru, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid ihtiva eden ve ayrıca bir siRNA veya kısa tokalı RNA (shRNA) ihtiva eden bir çift iplikçikli RNA (dsRNA) molekülünü açıklamaktadır. Bir başka açıklamada, dsRNA molekülü, 50 nükleotit uzunluğundan daha büyüktür. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka açıklamada, psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid, siRNA sekansı içerisindedir. Bir başka açıklamada, psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid, siRNA sekansı dışındadır. Bir başka açıklamada, 1 veya daha fazla psödouridin ve/veya modifiye edilmiş bir nükleosid kalıntısı, siRNA sekansının hem içerisinde ve dışındadır. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka açıklamada, siRNA veya shRNA, dsRNA molekülünde içsel olarak yer alır. Bir başka açıklamada, siRNA veya shRNA, dsRNA molekülünün bir ucunda yer alır. Bir başka açıklamada, bir veya daha fazla siRNA veya shRNA, dsRNA molekülünün bir ucunda yer alırken, bir başka bir veya daha fazlası, içsel olarak bulunur. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın bir mesajcı RNA'sının (örneğin bir tek iplikçikli RNA'sının (ssRNA)) uzunluğu, 30 nükleotit uzunluğundan fazladır. Bir başka uygulamada, mesajcı RNA, 35 nükleotit uzunluğundan daha büyüktür. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 40 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 45 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 55 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 60 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 60 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 80 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 90 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 100 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 120 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 140 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 160 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 180 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 200 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 250 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 300 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 350 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 400 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 450 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 500 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 600 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 700 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 800 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 900 nükleotittir. Bir başka

uygulamada, uzunluk, en az 1000 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 1100 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 1200 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 1300 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 1400 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 1500 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 1600 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 1800 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 2000 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 2500 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 3000 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 4000 nükleotittir. Bir başka uygulamada, uzunluk, en az 5000 nükleotittir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

15 Bir başka açıklamada, bir dsRNA molekülü, *in vitro*-transkripsiyon ile üretilir.

In vitro-transkripsiyon T7 faj RNA polimerazını kullanabilir. *In vitro*-transkripsiyon SP6 faj RNA polimerazı kullanabilir. *In vitro*-transkripsiyon T3 faj RNA polimerazı kullanabilir. *In vitro*-transkripsiyon yukarıdaki polimerazlardan seçilen bir RNA polimerazı kullanabilir. *In vitro*-transkripsiyon herhangi bir başka teknikte bilinen RNA polimerazı kullanabilir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

20

Bir başka açıklamada, dsRNA molekülü, siRNA veya shRNA'yı elde etmek üzere hücresel enzim ile işlenebilir. Bir başka açıklamada, hücresel enzim, bir endonükleazdır. Bir başka açıklamada, hücresel enzim, bir Dicer'dir. Dicer, RNA enterferansını (RNAi) ve bu susturma yollarının özgüllüğünü belirleyen küçük RNA'ların üretilmesi ile ilgili olguları başlatan bir RNase III-familiyası nükleazıdır (Bernstein E, Caudy AA et al, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 2001;409(6818): 363-6). Bir başka açıklamada, hücresel enzim, teknikte bilinen bir dsRNA molekülünü ayırabilen herhangi bir başka hücresel enzimdir. Her

30

35 bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka açıklamada, dsRNA molekülü iki siRNA veya shRNA içerir. Bir başka açıklamada, dsRNA molekülü, üç siRNA veya shRNA içerir. dsRNA molekülü üçten fazla siRNA veya shRNA içerir. Bir başka açıklamada, siRNA ve/veya shRNA, dsRNA molekülünden bir hücreselel enzim ile serbest bırakılır. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru siRNA veya shRNA'yı bir hücreye uygulamak için mevcut başvurunun bir dsRNA molekülünün uygulanmasını içeren bir yöntem sağlamakta olup, burada hücre, siRNA veya shRNA'yı elde etmek üzer dsRNA molekülünü işler, böylece bir siRNA veya shRNA'yı bir hücreye uygular.

Yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın bir mesajcı RNA'sında modifiye edilmiş nükleosid, uridin (U)'dir. Bir başka uygulamada, modifiye edilmiş nükleosid, uridine ek olarak sitidindir (C). Mevcut beyanın bir başka örneğinde, modifiye edilmiş nükleosid, adenin (A)'dir. Mevcut beyanın bir başka örneğinde, modifiye edilmiş nükleosid, guanin (G)'dir.

Bir başka uygulamada, mevcut buluşun yöntemlerinin ve medikal kullanımlarının modifiye edilmiş nükleosidi, psödouridin veya 1-metilpsödouridin ve tercihe göre m⁵C (5-metilsitidin)'dir. Mevcut beyanın bir başka örneğinde, modifiye edilmiş nükleosid, m⁵U (5-metiluridin)'dir. Mevcut beyanın bir başka örneğinde, modifiye edilmiş nükleosid, m⁶A (N⁶-metiladenozin)'dir. Mevcut beyanın bir başka örneğinde, modifiye edilmiş nükleosid, s²U (2-tiouridin)'dir. Bir başka uygulamada, modifiye edilmiş nükleosid, Ψ (psödouridin)'dir. Mevcut beyanın bir başka örneğinde, modifiye edilmiş nükleosid, Um (2'-O-metiluridin)'dir.

Mevcut beyanın diğer örneklerinde, modifiye edilmiş nükleosid, m¹A (1-metiladenozin); m²A (2-metiladenozin); Am (2'-O-metiladenozin); ms²m⁶A (2-metiltiyo-N⁶-metiladenozin); i⁶A (N⁶-izopenteniladenozin); ms²i⁶A (2-metiltiyo-N⁶-izopenteniladenozin); io⁶A (N⁶-(cis-hidroksiizopentenil)adenozin); ms²io⁶A (2-metiltiyo-N⁶-(cis-

hidroksiizopentenil) adenozin); g^6A (N^6 -
 glisinilkarbamoiladenozin); t^6A (N^6 -treonilkarbamoiladenozin);
 ms^2t^6A (2-metiltiyo- N^6 -treonil karbamoiladenozin); m^6t^6A (N^6 -
 metil- N^6 -treonilkarbamoiladenozin); hn^6A (N^6 -
 5 hidroksinorvalilkarbamoiladenozin); ms^2hn^6A (2-metiltiyo- N^6 -
 hidroksinorvalil karbamoiladenozin); $Ar(p)$ (2'-O-
 ribosiladenozin (fosfat)); I (inozin); m^1l (1-metilinozin); m^1lm
 (1,2'-O-dimetilinozin); m^3C (3-metil- sitidin); Cm (2'-O-
 metilsitidin); s^2C (2-tiyositidin); ac^4C (N^4 -asetilsitidin); f^5C
 10 (5-formilsitidin); m^5Cm (5,2'-O- dimetilsitidin); ac^4Cm (N^4 -
 asetil-2'-O-metilsitidin); k^2C (lizidin); m^1G (1-metilguanozin);
 m^2G (N^2 -metil- guanozin); m^7G (7-metilguanozin); Gm (2'-O-
 metilguanozin); m^2_2G (N^2, N^2 -dimetilguanozin); m^2Gm ($N^2, 2'$ - O-
 dimetilguanozin); m^2_2Gm ($N^2, N^2, 2'$ -O-trimetilguanozin); $Gr(p)$ (2'-
 15 O-ribosilguanozin (fosfat)); yW (wibutozin); o_2yW
 (peroksiwibutozin); $OHyW$ (hidroksiwybutozin); $OHyW^*$ (az modifiye
 edilmiş hidroksiwibutozin); imG (wyozin); $mimG$ (metilwiozin); Q
 (keuzin); oQ (epoksikeuzin); $galQ$ (galaktosil-keuzin); $manQ$
 (mannosil-keuzin); $preQo$ (7-siyano-7-deazaguanozin); $preQ_1$ (7-
 20 aminometil-7-deazaguanozin); G^+ (arkaeozin); D (dihidrouridin);
 m^5Um (5,2'-O-dimetiluridin); s^4U (4-tiyouridin); m^5s^2U (5-metil-
 2-tiyouridin); s^2Um (2-tiyo-2'-O- metiluridin); acp^3U (3-(3-
 amino-3-karboksipropil)uridin); ho^5U (5-hidroksiuridin); mo^5U
 (5-metoksiuridin); cmo^5U (uridin 5-oksiasetik asit); $mcmo^5U$
 25 (uridin 5-oksiasetik asit metil ester); chm^5U (5-
 (karboksihidroksimetil)uridin)); $mchm^5U$ (5-
 (karboksihidroksimetil)uridin metil ester); mcm^5U (5-
 metoksikarbonilmetiluridin); mcm^5Um (5- metoksikarbonilmetil-2'-
 O-metiluridin); mcm^5s^2U (5-metoksikarbonilmetil-2-tiyouridin);
 30 nm^5s^2U (5-aminometil-2-tiyouridin); mnm^5U (5-
 metilaminometiluridin); mnm^5s^2U (5-metilaminometil-2-
 tiyouridin); mnm^5se^2U (5-metilaminometil-2-selenouridin); ncm^5U
 (5-karbamoilmetiluridin); ncm^5Um (5-karbamoilmetil-2'-O-
 metiluridin); $cmnm^5U$ (5-karboksimetilaminometiluridin); $cmnm^5Um$
 35 (5-karboksimetilaminometil-2'-O-metiluridin); $cmnm^5s^2U$ (5-

karboksimetilaminometil-2-tiouridin); m^6_2A (N^6, N^6 -dimetiladenozin); Im (2'-O-metilinozin); m^4C (N^4 -metilsitidin); m^4Cm ($N^4, 2'$ -O-dimetilsitidin); hm^5C (5-hidroksimetilsitidin); m^3U (3-metiluridin); cm^5U (5-karboksimetiluridin); m^6Am ($N^6, 2'$ -O-dimetiladenozin); m^6_2Am ($N^6, N^6, O-2'$ -trimetiladenozin); $m^{2,7}G$ ($N^2, 7$ -dimetilguanozin); $m^{2,2,7}G$ ($N^2, N^2, 7$ -trimetilguanozin); m^3Um (3,2'-O-dimetiluridin); m^5D (5-metildihidrouridin); f^5Cm (5-formil-2'-O-metilsitidin); m^1Gm (1,2'-O-dimetilguanozin); m^1Am (1,2'-O-dimetiladenozin); tm^5U (5-aurinometiluridin); $tm^{5s}2U$ (5-aurinometil-2-tiouridin)); $imG-14$ (4-demetilwyozin); $imG2$ (izowiozin); veya ac^6A (N^6 -asetiladenozin)'dir.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın bir mesajcı RNA'sı, istemlerde tanımlanan şekilde, yukarıdaki modifikasyonların 2 ya da daha fazlasının bir kombinasyonu içerir. Bir başka uygulamada, mesajcı RNA yukarıdaki modifikasyonların 3 ya da daha fazlasının bir kombinasyonunu içerir. Bir başka uygulamada, mesajcı RNA, yukarıda modifikasyonların 3'ten fazlasının bir kombinasyonunu içerir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın mesajcı RNA'sındaki kalıntıların %0,1 ve %100 arası, psödouridin varlığınca modifiye edilmiştir. Bir başka uygulamada, kalıntıların %0,1'i, modifiye edilir. Bir başka uygulamada, %0,2. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,3'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,4'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,5'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,6'dır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,8'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %1'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %1,5'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %2'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %2,5'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %3'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %4'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %5'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %6'dır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %8'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %10'dur. Bir başka uygulamada,

fraksiyon, %12'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %14'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %16'dır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %18'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %20'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %25'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %30'dur. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %35'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %40'tır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %45'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %50'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %60'tır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %70'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %80'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %90'dır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %100'dür.

Bir başka uygulamada, fraksiyon, %5'ten azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %3'ten azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %1'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %2'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %4'ten azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %6'dan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %8'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %10'dan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %12'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %15'ten azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %20'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %30'dan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %40'tan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %50'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %60'tan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %70'ten az.

Bir başka uygulamada, verilen bir nükleotidin %0,1'i kalıntısı (uridin, ve tercihe göre sitidin), modifiye edilmiştir. Bir başka uygulamada, nükleotid fraksiyonu, %0,2'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,3'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,4'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,5'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,6'dır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %0,8'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %1'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %1,5'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %2'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %2,5'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %3'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %4'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %5'tir. Bir

başka uygulamada, fraksiyon, %6'dır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %8'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %10'dur. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %12'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %14'tür. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %16'dır. 5 Bir başka uygulamada, fraksiyon, %18'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %20'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %25'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %30'dur. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %35'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %40'tır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %45'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %50'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %60'tır. 10 Bir başka uygulamada, fraksiyon, %70'tir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %80'dir. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %90'dır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %100'dür.

Bir başka uygulamada, verilen nükleotidin fraksiyonu, %8'den 15 azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %10'dan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %5'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %3'ten azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %1'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %2'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %4'ten azdır. Bir başka uygulamada, 20 fraksiyon, %6'dan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %12'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %15'ten azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %20'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %30'dan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %40'tan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, 25 %50'den azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %60'tan azdır. Bir başka uygulamada, fraksiyon, %70'ten az.

Bir başka uygulamada, "ribonükleotid," "oligoribonükleotid," ve "poliribonükleotid" terimleri, en az 2 baz-şeker-fosfat kombinasyonu dizisi anlamına gelir. Terim, bir başka uygulamada, 30 şeker kısmının riboz olduğu nükleotitleri içeren bileşiklerini içerir. Başka bir uygulamada, terim, omurganın değiştirildiği RNA ve RNA türevlerini içerir. "Nükleotitler", bir başka uygulamada, nükleik asit polimerlerinin monomerik birimlerini belirtir. Yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımı veya mevcut 35 buluşa göre kullanımı RNA'sı, bir mRNA (mesajcı RNA)

biçimindedir. siRNA ve miRNA tarif edilmiştir (Caudy AA et al, Genes & Devel 16: 2491-96 ve burada gösterilen referanslar). Ayrıca, bu RNA formları, tek, çift, üçlü veya dördümlü iplikçikli olabilir. Bu terim ayrıca bir başka uygulamada, yapay nükleik asitler diğer omurga tiplerini, ancak aynı bazları içerebilir. Bir başka uygulamada, yapay nükleik asit, bir PNA'dır (peptid nükleik asit). PNA, peptid omurgaları ve nükleotit bazları içerir ve bir başka uygulamada hem DNA hem de RNA moleküllerine bağlanabilir. Bir başka uygulamada, nükleotid, modifiye edilmiştir. Bir başka uygulamada, nükleotid, bir veya daha fazla fosfodiester bağının bir fosforotiyoat bağı ile değiştirilmesiyle modifiye edilir. Başka bir uygulamada yapay nükleik asit, teknikte bilinen doğal nükleik asitlerin fosfat omurgasının başka bir varyantını içerir. Fosforiyorat nükleik asitlerin ve PNA'nın kullanımı, teknikte uzman kişilerce bilinmektedir ve örneğin, Neilsen PE, Curr Opin Struct Biol 9:353-57; ve Raz NK et al Biochem Biophys Res Commun. 297:1075-84 referanslı yayında tarif edilmektedir. Nükleik asitlerin üretim ve kullanımı teknikte yetkin olanlarca bilinmekte ve şu yayınlarda tarif edilmektedir: örneğin, Molecular Cloning, (2001), Sambrook ve Russell, eds. ve Methods in Enzymology: Ökaryotik hücrelerdeki moleküler klonlama yöntemleri (2003) Purchio ve GC Fareed. Her bir nükleik asit türevidir, mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Mevcut beyanın başka bir örneğinde, "oligoribonükleotid" terimi, 25'ten az nükleotit (nt) içeren bir diziyi ifade eder. Bir başka uygulamada, "oligoribonükleotid", 24 nükleotitten daha az olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "oligoribonükleotid", 23 nükleotitten daha az olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "oligoribonükleotid", 22 nükleotitten daha az olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "oligoribonükleotid", 21 nükleotitten daha az olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "oligoribonükleotid", 20 nükleotitten daha az olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "oligoribonükleotid", 19

nükleotitten daha az olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "oligoribonükleotid", 18 nükleotitten daha az olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "oligoribonükleotid", 17 nükleotitten daha az olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "oligoribonükleotid", 16 nükleotitten daha az olan bir dizi anlamına gelir.

Bir başka uygulamada, "poliribonükleotid" terimi, 25'ten fazla nükleotit (nt) içeren bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "poliribonükleotid", 26 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "poliribonükleotid", 28 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 30 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 32 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 35 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 40 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 50 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 60 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 80 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 100 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 120 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 150 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 200 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 300 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 400 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 500 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 600 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 800 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 1000 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 1200 nükleotitten

fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 1400 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 1600 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 1800
5 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Bir başka uygulamada, "terim", 2000 nükleotitten fazla olan bir dizi anlamına gelir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir görünümde, mevcut buluş bir rekombinant protein üretmek
10 için bir memeli hücrelerini indüklemek için terapötik olmayan bir yöntem sağlar, yöntem şunları kapsar: bahsedilen memeli hücrelerini bahsedilen rekombinant proteini kodlayan açık bir okuma çerçevesini ihtiva eden *in vitro* olarak sentezlenmiş mRNA ile temas ettirilmesini içerir; burada *in vitro* olarak
15 sentezlenmiş mRNA, Ψ veya $m^1\Psi$ (1- metilpsödouridin)'i içerir; ve burada söz konusu temasa yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in miktarı, söz konusu memeli hücrelerinin, Ψ veya $m^1\Psi$ (1-metilpsödouridin)'i içermeyen modifiye edilmemiş bir muadil mRNA ile temas
20 ettirilmesine yanıt olarak salgılanan IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IFN- β veya IL-8'in ilgili miktarından azdır.

"Kodlayan" ifadesi, bir başka uygulamada, ilgilenilen proteini kodlayan bir gen içeren bir RNA molekülü anlamına gelir.
25 Yenilikçi yöntem ve yenilikçi kullanımın RNA molekülü, bir açık okuma çerçevesini kodlayan ilgilenilen proteini içerir. Bir başka uygulamada, 1 veya daha fazla başka protein de kodlanmıştır. Bir başka uygulamada, ilgi duyulan protein kodlanan tek proteindir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı
30 bir uygulamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın bir mesajcı RNA'sı, hücrede, aynı sekansa sahip değiştirilmemiş bir RNA molekülünden daha verimli bir şekilde transle edilir. Bir başka uygulamada,
35 yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre

kullanımın mesajcı RNA'sı, bir hedef hücre tarafından gelişmiş transle edilebilme kabiliyeti sergiler. Bir başka uygulamada, translasyon, modifiye edilmemiş muadiline göre 2 katlık bir faktörle gelişme gösterir. Bir başka uygulamada, translasyon, 3 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 5 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 7 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 10 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 15 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 20 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 50 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 100 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 200 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 500 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 1000 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, translasyon, 2000 katlık bir faktörle gelişir. Bir başka uygulamada, faktör, 10-1000 kattır. Bir başka uygulamada, faktör, 10-100 kattır. Bir başka uygulamada, faktör, 10-200 kattır. Bir başka uygulamada, faktör, 10-300 kattır. Bir başka uygulamada, faktör, 10-500 kattır. Bir başka uygulamada, faktör, 20-1000 kattır. Bir başka uygulamada, faktör, 30-1000 kattır. Bir başka uygulamada, faktör, 50-1000 kattır. Bir başka uygulamada, faktör, 100-1000 kattır. Bir başka uygulamada, faktör, 200-1000 kattır. Bir başka uygulamada, translasyon, herhangi başka önemli miktarda veya miktar aralığında arttırılmıştır. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Translasyon verimliliğini belirleme yöntemleri teknikte iyi bilinmekte olup, örneğin, kodlanmış bir raportör proteini (e.g luciferase veya renilla [Buradaki örnekler] veya yeşil flüoresan proteinin aktivitesinin ölçülmesini içerir [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]], veya transle edilmiş proteine dahil edilen radyoaktif etiketi ölçmeyi kapsar (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). Her bir yöntem mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Burada sunulan ekspresyon çalışmalarında, translasyon Lipofectin®'e kompleksleştirilen RNA'dan (Gibco BRL, Gaitersburg, MD, ABD) ölçülmüş ve farelerin kuyruk venine enjekte edilmiştir. Dalak lizatları, psödouridin ile modifiye edilmiş RNA, modifiye edilmemiş RNA'dan önemli ölçüde daha verimli bir şekilde transle edilmiştir (Şekil 12B). Burada kullanılan şartlar altında, mevcut buluşun transfeksiyon-bazlı yöntemlerinin verimliliği, transfeksiyon ayırıcının dokulara nüfuz edebilme kabiliyeti ile koreledir, bu, etkinin neden dalak hücrelerinde en vurgulu olduğunun anlaşılması için bir açıklama sağlamaktadır. Splenik kan akımı, kan içerikleri, lenfoid hücreleri de dahil olmak üzere kırmızı ve beyaz pulpa elemanlarına doğrudan temas eden açık bir sistemdir.

Bir başka deneyde, *in vitro* fosforilasyon testleri, rekombinant insan PKR'si ve substratı, elF2 α kullanılarak başlık ped, renilla-kodlayan mRNA (0,5 ve 0,05 ng/ μ I) varlığında gerçekleştirilmiştir. psödouridin (Ψ) içeren mRNA, hem PKR self-fosforilasyonu ve elF2 α fosforilasyonunun yokluğu ile tespit edilen şekilde PKR'yi aktive etmezken, nükleosid modifikasyonsuz RNA ve m5C modifikasyonlu mRNA PKR'yi aktifleştirmiştir. Fosforilize elF2 α 'nın mRNA translasyonunun başlamasını bloke ettiği bilinmektedir, bu yüzden fosforilasyon yokluğu, bir başka uygulamada, psödouridin (Ψ) içeren mRNA'nın gelişmiş translasyonunu sağlar.

Bir başka uygulamada, gelişmiş translasyon, bir hücrededir (aynı sekansa sahip değiştirilmemiş bir RNA molekülünün aynı hücreesindeki translasyona göre; Örnekler 10-11). Mevcut beyanın başka bir örneğinde, gelişmiş translasyon, *in vitro* şekildedir (örneğin bir *in vitro* translasyon karışımı veya bir retikulosit

lizatında; Örnekler 10-11. Bir başka uygulamada, gelişmiş translasyon, *in vivo*'dur (Örnek 13). Her bir durumda, gelişmiş translasyon, aynı koşullar altında, aynı sekansa sahip, değiştirilmemiş bir RNA molekülüne göredir. Her bir olasılık
5 mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın mesajcı RNA'sı, aynı sekansa sahip bir modifiye edilmemiş *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünden anlamlı ölçüde daha az immünojeniktir. Bir başka
10 uygulamada, modifiye edilmiş RNA molekülü, modifiye edilmemiş muadilinden 2 kat daha az immünojeniktir. Bir başka uygulamada, immünojeniklik 3 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada, immünojeniklik 5 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada, immünojeniklik 7 katlık bir faktör ile azalır.

15 Bir başka uygulamada, immünojeniklik 10 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada, immünojeniklik 15 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada, immünojeniklik 20 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada, immünojeniklik 50 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka
20 uygulamada, immünojeniklik 100 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada, immünojeniklik 200 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada, immünojeniklik 500 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada, immünojeniklik 1000 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada,
25 immünojeniklik 2000 katlık bir faktör ile azalır. Bir başka uygulamada, immünojeniklik başka bir kat farkı ile azalır.

Bir başka uygulamada, "anlamlı ölçüde daha az immünojenik" ifadesi, immünojeniklikte saptanabilir azalış anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, immünojeniklikteki bir kat azalışı
30 anlamına gelir (örneğin yukarıda sayılanların 1'i ile kat azalışı). Bir başka uygulamada, terim, böyle etkili bir miktardaki yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın mesajcı RNA'sının tespit edilebilir bir immün tepkisi tetiklemeden uygulanabileceği şekilde bir azalış
35 anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, yenilikçi yöntemin,

yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın mesajcı RNA'sının rekombinant proteinin ekspresyonunu saptanabilir bir şekilde azaltmak için yeterli bir immün yanıt açığa çıkarmadan tekrarlı olarak uygulanabileceği şekilde bir azalış anlamına gelir. Bir başka uygulamada, azalış, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın mesajcı RNA'sının saptanabilir rekombinant proteinin ekspresyonunu elimine etmek için yeterli bir immün yanıt açığa çıkarmadan tekrarlı olarak uygulanabileceği şekilde bir azalış anlamına gelir.

"Etkili miktardaki" yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın mesajcı RNA'sı, bir başka uygulamada, bir terapötik etki uygulamak için yeterli bir miktar anlamına gelir. Bir başka uygulamada, terim, saptanabilir bir miktarda rekombinant proteinin ekspresyonunu ortaya çıkarmak için yeterli bir miktar anlamına gelir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

RNA, oligoribonükleotit ve poliribonükleotit moleküllerinin immünojenikliğinin azaltılması, burada gösterilmiştir (Örnekler 1-8).

İmmünojenikliği belirleme yöntemleri teknikte iyi bilinmektedir, ve örneğin, sitokinlerin sekresyonunun (örneğin IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1 α veya β , IL-6, IFN- β veya IL-8; buradaki örnekler) ölçülmesini, DC aktivasyon markörlerinin ekspresyonunun ölçülmesini (örneğin CD83, HLA-DR, CD80 ve CD86; buradaki örnekler) veya adaptif bir immün yanıtı için bir yardımcı madde olarak işlev gösterme yeteneğinin ölçülmesini içerir.

Başka bir örnekte, modifiye nükleotidin ve bunun modifiye edilmemiş muadilinin immünojenikliği, modifiye edilmemiş nükleotidin belirli bir miktarı ile aynı derecede yukarıdaki tepkilerden birini ortaya çıkarmak için gerekli olan modifiye nükleotit miktarının saptanmasıyla belirlenir. Örneğin, iki kat daha fazla modifiye edilmiş nükleotid, aynı yanıtı açığa çıkarmak için gerekli oluyorsa, modifiye edilmiş nükleotid

modifiye edilmemiş nükleotidden iki kat daha az immünojeniktir.

Modifiye edilmiş nükleotid ve modifiye edilmemiş muadilinin nispi immünojenikliği, aynı miktarda modifiye edilmemiş nükleotid göre modifiye edilmiş nükleotid uygulanmasına yanıt

5 olarak salgılanan sitokin (örneğin IL-12, IFN- α , TNF- α , RANTES, MIP-1a veya β , IL-6, IFN- β veya IL-8) niceliğini saptayarak belirlenir. Örneğin, sitokinin yarısı kadar salgılandığında, modifiye edilmiş nükleotitten daha fazla değiştirilmemiş nükleotitten iki kat daha az immünojeniktir.

10 Başka bir örnekte, yukarıdaki yöntemlerde immünojeniklik hesaplanmadan önce zemin stimülasyon seviyeleri çıkarılır.

Bir başka uygulamada, mevcut buluşun bir yöntemi ayrıca temas ettirme adımından önce mesajcı RNA'nın bir transfeksiyon ayıracı ile karıştırılmasını içerir. Bir başka uygulamada, mevcut

15 buluşun bir yöntemi ayrıca, mesajcı RNA'nın transfeksiyon ayıracı ile birlikte uygulanmasını içerir. Bir başka uygulamada, transfeksiyon ayıracı, bir katyonik lipid ayıracıdır (Örnek 3).

Bir başka uygulamada, transfeksiyon ayıracı, bir lipid-bazlı transfeksiyon ayıracıdır. Bir başka uygulamada, transfeksiyon ayıracı, bir protein-bazlı transfeksiyon ayıracıdır. Bir başka uygulamada, transfeksiyon ayıracı, bir polietilenimin bazlı transfeksiyon ayıracıdır. Bir başka uygulamada, transfeksiyon ayıracı, kalsiyum fosfattır. Bir başka uygulamada, transfeksiyon ayıracı, Lipofectin® veya Lipofectamin®'dir. Bir başka

25 uygulamada, transfeksiyon ayıracı, teknikte bilinen herhangi bir başka transfeksiyon ayıracıdır.

Bir başka uygulamada, transfeksiyon ayıracı bir lipozom oluşturur. Başka bir uygulamada lipozomlar, hücre içi stabiliteyi arttırır, alım verimliliğini arttırır ve biyolojik

30 aktiviteyi iyileştirir. Bir başka uygulamada, lipozomlar, hücre zarını oluşturan lipidlerle benzer bir tarzda düzenlenmiş lipidlerden oluşan boş küresel veziküllerdir. Bunlar, bir başka uygulamada, suda çözünür bileşikleri yakalamak için bir iç sulu alana sahiptir ve 0,05 ila birkaç mikron çapı boyutu aralığında

35 değişmektedir. Başka bir uygulamada lipozomlar, RNA'ya biyolojik

olarak aktif formdaki hücrelere iletebilir.

- Bir başka uygulamada, mevcut buluşun yöntemlerinin hedef hücresi, bir antijen sunan hücredir. Bir başka uygulamada, hücre, bir hayvan hücresidir. Bir başka uygulamada, hücre, bir dendritik hücredir (Örnek 11). Bir başka uygulamada, hücre, bir sinir hücresidir. Bir başka uygulamada, hücre, bir beyin hücresidir (Örnek 13). Bir başka uygulamada, hücre, bir dalak hücresidir. Bir başka uygulamada, hücre, bir lenfoid hücresidir. Bir başka uygulamada, hücre, bir akciğer hücresidir (Örnek 13). Bir başka uygulamada, hücre, bir cilt hücresidir. Bir başka uygulamada, hücre, bir keratinositir. Bir başka uygulamada, hücre, bir endotel hücresidir. Bir başka uygulamada, hücre, bir astrosit, bir mikrogliyal hücre veya bir nöronudur (Örnek 13). Bir başka uygulamada, hücre, bir alveolar hücredir (Örnek 13). Bir başka uygulamada, hücre, bir yüzey alveolar hücredir (Örnek 13). Bir başka uygulamada, hücre, bir alveolar makrofajdır. Bir başka uygulamada, hücre, bir alveolar pnömosittir. Bir başka uygulamada, hücre, bir vasküler endotel hücredir. Bir başka uygulamada, hücre, bir mezenkimal hücredir. Bir başka uygulamada, hücre, bir epitel hücresidir. Bir başka uygulamada, hücre, bir hematopoetik hücredir. Bir başka uygulamada, hücre, kolonik epitelyum hücresidir. Bir başka uygulamada, hücre, bir akciğer epitelyum hücresidir. Bir başka uygulamada, hücre, bir kemik iliği hücresidir.
- Başka uygulamalarda, hedef hücre, bir Claudius' hücresi, Hensen hücresi, Merkel hücresi, Muller hücresi, Paneth hücresi, Purkinje hücresi, Schwann hücresi, Sertoli hücresi, asitofil hücresi, asiner hücre, adipoblast, adiposit, kahverengi veya beyaz alfa hücresi, amakrin hücresi, beta hücresi, kapsuler hücresi, sementosit, ana hücre, kondroblast, kondrosit, kromaffin hücre, kromofobik hücre, kortikotrof, delta hücresi, Langerhans hücresi, folliküler dendritik hücre, enterokromaffin hücresi, ependymosit, epitel hücresi, bazal hücre, skuamoz hücre, endotel hücre, geçişsel hücre, eritroblast, alyuvar, fibroblast, fibrosit, folliküler hücre, mikrop hücresi, gamet,

ovum, spermatozoon, oosit, birincil oosit, ikincil oosit, spermatid, spermatosit, birincil spermatosit, ikincil spermatosit, mikropinal epitelyum, dev hücre, glial hücre, astroblast, astrosit, oligodendroblast, oligodendrosit, glioblast, goblet hücre, gonadotroph, granülosa hücresi, haemositoblast, kıl/tüy hücresi, hepatoblast, hepatosit, hyalosit, interstisyel hücre, jukstaglomeruler hücre, keratinosit, keratosit, lemmal hücre, lökosit, granülosit, bazofil, eozinofil, neutrofil, lenfoblast, B-lenfoblast, T-lenfoblast, lenfosit, B-lenfosit, T-lenfosit, yardımcı kaynaklı T-lenfosit, Th1 T-lenfosit, Th2 T-lenfosit, doğal öldürücü hücre, timosit, makrofaj, Kupffer hücresi, alveolar makrofaj, köpük hücresi, histiosit, luteal hücre, lenfositik kök hücresi, lenfoid hücresi, lenfoid kök hücresi, makroglial hücre, mammotrof, mast hücresi, medulloblast, megakaryoblast, megakaryosit, melanoblast, melanosit, mezanjiyal hücre, mezotel hücre, metamiyelosit, monoblast, monosit, mukus boyun hücresi, kas hücresi, kardiyak kas hücresi, iskelet kası hücresi, düz kas hücresi, miyelosit, miyeloid hücre, miyeloid kök hücresi, miyoblast, miyoepitel hücre, miyofibroblast, nöroblast, nöroepitel hücre, nöron, odontoblast, osteoblast, osteoklast, osteosit, oksintik hücre, parafoliküler hücre, paraluteal hücre, peptik hücre, perisit, çevresel kan mononükleer hücresi, faeokromosit, falanjeal hücre, pinalosit, pituisit, plazma hücresi, trombosit, podosit, proeritroblast, promonosit, promiyeloblast, promiyelosit, pronormoblast, retikulosit, retinal pigment epitel hücresi, retinoblast, küçük hücre, somatotrof, kök hücre, sustentaküler hücre, teloglial hücre veya zimogenik hücredir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Mevcut buluşa uygun kullanım için kullanımlar ve mRNA kullanılarak, örneğin, *inter alia*, monojenik bozukluklar, bulaşıcı hastalıklar, edinilmiş bozukluklar, kanser ve benzerleri gibi çok çeşitli bozukluklar tedavi edilebilir. Örnek monogenik bozukluklar arasında ADA eksikliği, kistik fibroz,

ailesel hiperkolesterolemi, hemofili, kronik ganulomatoz hastalığı, Duchenne kas distrofisi, Fanconi anemisi, orak hücreli anemi, Gaucher's hastalığı, Hunter sendromu, X bağlantılı SCID ve benzerleri bulunur. Bir başka uygulamada, tedavi edilen bozukluk aşağıda sayılan proteinlerin birini içerir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, mevcut buluşun yöntemleri ve kullanımları ve mevcut buluşa uygun kullanım için bir mesajcı RNA tarafından kodlanan rekombinant protein ekto-nükleosid trifosfat difosfohidrolazdır.

Bir başka uygulamada, rekombinant protein, eritropoietindir (EPO).

Başka uygulamalarda, kodlanan rekombinant protein, 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; LOT; 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; ZFHx1B; 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;
 5 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;
 10 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;
 15 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;
 20 SLC6A3; SM1; SMA@; SMN1; SMN2; SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFBI;
 ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB; BF; C2; C4A; CDKN1 A; 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;
 25 LAP; LCA5; LPA; MCDR1; MOCS1; MUT; MYB; NEU1; NKS1; NYS2; OA3;
 ODDD; OFC1; PARK2; PBCA; PBCRA1; PDB1; PEX3; PEX6; PEX7; PKHD1;
 PLA2G7; PLG; POLH; PPAC; PSORS1; PUJO; RCD1; RDS; RHAG; RP14;
 RUNX2; RWS; SCA1; SCZD3; SIASD; SOD2; ST8; TAP1; TAP2; TFAP2B;
 TNDM; TNF; TPBG; TPMT; TULP1; WISP3; AASS; ABCB1; ABCB4; ACHE;
 30 AQP1; ASL; ASNS; AUTS1; BPGM; BRAF; C7orf2; CACNA2D1; CCM1; CD36;
 CFTR; CHORDOMA; 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;
 35 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;
 5 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; CHAO; CLA1; CMD1B; COL5A1;
 CRAT; DBH; DNAIL1; DYS; DYT1; ENG; FANCC; FBP1; FCMD; FRDA; GALT;
 10 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;
 15 ERCC6; FGFR2; HK1; HPS1; IL2RA; LGI1; LIPA; MAT1A; MBL2; MKI67;
 MXI1; NODAL; OAT; OATL3; PAX2; PCBD; PEO1; PHYH; PNLIP; PSAP;
 PTEN; RBP4; RDPA; RET; SFTPA1; SFTPD; SHFM3; SIAL; THC2; TLX1;
 TNFRSF6; UFS; UROS; AA; ABCC8; ACAT1; ALX4; AMPD3; ANC; APOA1;
 APOA4; APOC3; ATM; BSCL2; BWS; CALCA; CAT; CCND1; CD3E; CD3G;
 20 CD59; CDKN1C; CLN2; CNTF; CPT1A; CTSC; DDB1; DDB2; DHCR7; DLAT;
 DRD4; ECB2; ED4; EVR1; EXT2; F2; FSHB; FTH1; G6PT1; G6PT2; GIF;
 HBB; HBBP1; HBD; HBE1; HBG1; HBG2; HMBS; HND; HOMG2; HRAS; HVBS1;
 IDDM2; IGER; INS; JBS; KCNJ11; KCNJ1; KCNQ1; LDHA; LRP5; MEN1;
 MLL; MYBPC3; MYO7A; NNO1; OPPG; OPTB1; PAX6; PC; PDX1; PGL2;
 25 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; VRN1; WT1; WT2; ZNF145; A2M;
 AAAS; ACADS; ACLS; ACVRL1; ALDH2; AMHR2; AOM; AQP2; ATD; ATP2A2;
 BDC; C1R; CD4; CDK4; CNA1; COL2A1; CYP27B1; DRPLA; ENUR2; FEOM1;
 30 FGF23; FPF; GNB3; GNS; HAL; HBP1; HMGA2; HMN2; HPD; IGF1; KCNA1;
 KERA; KRAS2; KRT1; KRT2A; KRT3; KRT4; KRT5; KRT6A; KRT6B; KRTHB6;
 LDHB; LYZ; MGCT; MPE; MVK; MYL2; OAP; PAH; PPKB; PRB3; PTPN11;
 PXR1; RLS; RSN; SAS; SAX1; SCA2; SCNN1A; SMAL; SPPM; SPSMA; TBX3;
 TBX5; TCF1; TPI1; TSC3; ULR; VDR; VWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1; CLN5;
 35 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; IGH0; IGHC grubu; IGHG1; IGHM; IGHR; IV;
 LTBP2; MCOP; MJD; MNG1; MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP; NPC2;
 5 PABPN1; PSEN1; PYGL; RPGRIP1; SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6;
 SLC7A7; SPG3A; SPTB; TCL1A; TGM1; TITF1; TMIP; TRA0; TSHR; USH1A;
 VP; ACCPN; AHO2; ANCR; B2M; BBS4; BLM; CAPN3; CDAN1; CDAN3; CLN6;
 CMH3; CYP19; CYP1A1; CYP1A2; DYX1; EPB42; ETF A; EYCL3; FAH; FBN1;
 FES; HCVS; HEXA; IVD; LCS1; LIPC; MYO5A; OCA2; OTSC1; PWCR;
 10 RLBP1; SLC12A1; SPG6; TPM1; UBE3A; WMS; ABCC6; ALDOA; APRT;
 ATP2A1; BBS2; CARD15; CATM; CDH1; CETP; CHST6; CLN3; CREBBP;
 CTH; CTM; CYBA; CYLD; DHS; DNASE1; 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;
 15 PMM2; PXE; SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2; VDI;
 WT3; ABR; ACACA; ACADVL; ACE; ALDH3A2; APOH; ASPA; AXIN2; BCL5;
 BHD; BLMH; BRCA1; CACD; CCA1; CCZS; CHRN1B; CHRNE; CMT1A; COL1A1;
 CORD5; CTNS; EPX; ERBB2; G6PC; GAA; GALK1; GCGR; GFAP; GH1; GH2;
 GP1BA; GPSC; GUCY2D; ITGA2B; ITGB3; ITGB4; KRT10; KRT12; KRT13;
 20 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;
 25 SLC4A1; SLC6A4; SMCR; SOST; SOX9; SSTR2; SYM1; SYNS1; TCF2; THRA;
 TIMP2; TOC; TOP2A; TP53; TRIM37; VBCH; ATP8B1; BCL2; CNSN; CORD1;
 CYB5; DCC; F5F8D; FECH; FEO; LAMA3; LCFS2; MADH4; MAFD1; MC2R;
 MCL; MYP2; NPC1; SPPK; TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE;
 ATHS; BAX; BCKDHA; BCL3; BFIC; C3; CACNA1 A; CCO; CEACAM5; COMP;
 30 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;
 35 SLC7A9; STK11; TBXA2R; TGFB1; TNNT3; 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;
 5 RUNX1; SOD1; TAM; ADSL; ARSA; BCR; CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2;
 CSF2RB; CTHM; CYP2D6; CYP2D7P1; DGCR; DIA1; EWSR1; GGT1; MGCR;
 MN1; NAGA; NF2; OGS2; PDGFB; PPARA; PRODH; SCO2; SCZD4; SERPIND1;
 SLC5A1; SOX10; TCN2; TIMP3; TST; VCF; ABCD1; ACTL1; ADFN; AGMX2;
 AHDS; AIC; AIED; AIH3; ALAS2; AMCD; AMELX; ANOP1; AR; ARAF1;
 10 ARSC2; ARSE; ARTS; ARX; ASAT; ASSP5; ATP7A; ATRX; AVPR2; BFLS;
 BGN; BTK; BZX; C1 HR; 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;
 15 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; KFSD; L1CAM; LAMP2; MAA; MAFD2; MAOA; MAOB; MCF2;
 MCS; MEAX; MECP2; MF4; MGC1; MIC5; MIDI; MLLT7; MLS; MRSD; MRX14;
 20 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;
 25 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;
 30 DAZ; GCY; RPS4Y; SMCY; SRY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1;
 ASD1; ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3; CLN4; CSF2RA; CTS1; DF;
 DIH1; DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EEF1A1L14; EYCL2; FANCB; GCSH;
 GCSL; GIP; GTS; HHG; HMI; HOAC; HOKPP2; HRPT1; HSD3B3; HTC1;
 HV1S; ICHQ; ICR1; ICR5; IL3RA; KAL2; KMS; KRT18; KSS; LCAT; LHON;
 35 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; MTP; MTT1; NAMSD; OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PRO1; PROP1; RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM;

5 veya TTD'dir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru bir kişideki aneminin tedavi edilmesinin, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesini, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün eritropoietini kodlaması, böylece bir kişideki aneminin tedavi edilmesini içeren bir yöntemi açıklamaktadır. Bir başka açıklamada, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ayrıca bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içerir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder. Bir başka açıklamada, hücre, bir subkütan doku hücresidir. Bir başka açıklamada, hücre, bir akciğer hücresidir. Bir başka açıklamada, hücre, bir fibroblasttır. Bir başka açıklamada, hücre, bir lenfositir. Bir başka açıklamada, hücre, bir düz kas hücresidir. Bir başka açıklamada, hücre, teknikte bilinen herhangi bir başka hücredir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru bir kişideki bir vazospazminin tedavi edilmesinin, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesini, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün indüklenabilir nitrik oksit sentazı (iNOS) kodlaması, böylece bir kişideki bir vazopazminin tedavi edilmesini içeren bir yöntemi açıklamaktadır.

Bir başka bir açıklamada, mevcut başvuru, hücrenin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesini, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün bir ısı şok proteinini kodlaması, böylece bir kişideki hücrenin sağkalım oranının iyileştirilmesini içeren bir kişideki hücrenin sağkalım oranının iyileştirilmesinin bir yöntemi açıklamaktadır.

Bir başka açıklamada, sağkalım oranı gelişmiş olan hücre, bir iskemik hücredir. Bir başka açıklamada, hücre, iskemik değildir.

Bir başka açıklamada, hücre bir iskemik ortama maruz bırakılmıştır. Bir başka açıklamada, hücre bir çevresel strese maruz bırakılmıştır. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

5 Başka bir açıklamada, mevcut başvuru, kan damarını genişleten prosedürü izleyerek, bir kan damarı hücrelerinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesini, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün bir ısı şok proteinini kodlaması, böylece bir kişideki bir restenoz insidansının
10 azaltılmasını içeren kan damarı restenozunun vaka sıklığının azaltılmasının bir yöntemini açıklamaktadır.

Bir başka açıklamada, prosedür, bir anjioplastidir. Bir başka açıklamada, prosedür, kan damarını genişleten teknikte bilinen herhangi bir başka prosedürdür. Her bir olasılık mevcut buluşun
15 ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka bir açıklamada, mevcut başvuru, bir saç derisi hücrelerinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün bir telomerazı veya bir immünosupresif proteini kodlaması,
20 böylelikle saç folikülünden saç büyümesinin arttırılmasını içeren bir kişinin saç derisindeki saç kökünün saç uzamasının arttırılmasının bir yöntemini açıklamaktadır.

Bir başka açıklamada, immünosupresif protein, α -melanosit-uyarıcı hormondur (α -MSH). Bir başka açıklamada, immünosupresif protein, dönüştürücü büyüme faktörü- β 1'dir (TGF- β 1). Bir başka
25 açıklamada, immünosupresif protein, insülin benzeri büyüme faktörü-1'dir (IGF-1). Bir başka açıklamada, immünosupresif protein, teknikte bilinen herhangi bir başka immünosupresif proteindir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir
30 açıklamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, mevcut buluş, hücrenin, bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün enzimi kodlaması, böylece bir hücredeki antioksidan aktivitesine sahip bir enzim
35 ekspresyonunun uyarılmasını içeren bir hücredeki antioksidan

aktivitesine sahip bir enzim ekspresyonunun uyarılması yöntemini sağlamaktadır.

Bir başka uygulamada, enzim, katalazdır. Bir başka uygulamada, enzim, glutatyon peroksidazdır. Bir başka uygulamada, enzim, fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidazdır. Bir başka uygulamada, enzim, süperoksit dismutaz-1'dir. Bir başka uygulamada, enzim, süperoksit dismutaz-2'dir. Bir başka uygulamada, enzim, teknikte bilinen antioksidan etkinliği olan herhangi bir başka enzimdir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir başka bir açıklamada, mevcut başvuru, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyicisini (CFTR) kodlaması, böylece bir kişideki kistik fibrozun tedavi edilmesini içeren bir kişideki kistik fibrozun tedavi edilmesinin bir yöntemini açıklamaktadır.

Bir başka bir açıklamada, mevcut başvuru, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün bir Bruton tirozin kinazı ile temas ettirilmesi, böylece X bağlantılı bir agamaglobülineminin tedavi edilmesini içeren bir kişideki X bağlantılı bir agamaglobülineminin tedavi edilmesinin bir yöntemini açıklamaktadır.

Bir başka bir açıklamada, mevcut başvuru, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülünün bir ADA'yı kodlaması, böylece ADA SCID'nin tedavi edilmesini içeren bir kişideki bir adenoazin deaminaz şiddetli kombine immün yetmezliği (ADA SCID) tedavi edilmesi için bir yöntem açıklamaktadır.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, cildin immün yanıt vericiliğini azaltmak ve cilt patolojisini geliştirmek için bir yöntem açıklamakta olup, yöntem, kişinin bir hücresinin bir *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülü, bir ekto-nükleosit

trifosfat difosfohidrolazı kodlayan *in vitro* olarak sentezlenmiş RNA molekülüne temas ettirilmesini, böylelikle, cildin immün yanıt vericiliğini azaltmayı ve cilt patolojisini geliştirmeyi içerir.

5 Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın bir mRNA molekülü, bir nanoparçacık içinde enkapsüle edilmiştir. Nanoparçacık paketleme yöntemleri, teknikte iyi bilinmektedir ve örneğin, Bose S, et al (Role of Nucleolin in Human Parainfluenza Virus Type 3 Infection
10 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
15 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
20 update. Expert Opin Drug Deliv 2:707. 2005); and 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) referanslı yayında tarif edilmiştir.

25 Yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın bileşiklerinin dozaj aralıklarının çeşitli uygulamaları, yenilikçi yöntemde, yenilikçi kullanımda veya mevcut buluşa göre kullanıma yönelik olarak kullanılabilir. Bir uygulamada, dozaj, 1-10 µg/gün aralığındadır. Bir başka
30 uygulamada, dozaj, 2-10 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 3-10 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-10 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 2-20 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 3-20 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-20 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 10-20 µg/gündür. Bir
35 başka uygulamada, dozaj, 3-40 µg/gündür. Bir başka uygulamada,

dozaj, 5-40 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 10-40 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 20-40 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-50 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 10-50 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 20-50 µg/gündür. Bir uygulamada, dozaj, 1-100 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 2-100 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 3-100 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-100 µg/gündür. Bir başka uygulamada dozaj, 10-100 µg/gündür. Bir başka uygulamada dozaj, 20-100 µg/gündür. Bir başka uygulamada dozaj, 40-100 µg/gündür. Bir başka uygulamada dozaj, 60-100 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 0,1 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 0,2 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 0,3 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 0,5 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 1 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 2 mg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 3 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 5 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 10 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 15 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 20 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 30 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 40 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 60 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 80 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 100 µg/gündür. Bir başka uygulamada, dozaj, 10 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 20 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 30 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 40 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 60 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 80 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 100 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 150 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 200 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 300 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 400 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 600 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 800 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 1000 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 1,5 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 2 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 3 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 5 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 10 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 15 mg/dozdur.

Bir başka uygulamada, dozaj, 20 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 30 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 50 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 80 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 100 mg/dozdur.

- 5 Bir başka uygulamada, dozaj, 10-20 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 20-30 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 20-40 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 30-60 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 40-80 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 50-100 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 50-150 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 100-200 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 200-300 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 300-400 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 400-600 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 500-800 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 800-1000 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 1000-1500 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 1500-2000 µg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 2-3 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 2-5 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 2-10 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 2-20 mg/dozdur.
- 10
- 15
- 20 Bir başka uygulamada, dozaj, 2-30 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 2-50 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 2-80 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 2-100 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 3-10 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 3-20 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 3-30 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 3-50 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 3-80 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 3-100 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-10 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-20 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-30 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-50 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-80 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 5-100 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 10-20 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 10-30 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 10-50 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 10-80 mg/dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, 10-100 mg/dozdur.
- 25
- 30
- 35

Bir başka uygulamada, dozaj, bir günlük dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, bir haftalık dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, bir aylık dozdur. Bir başka uygulamada, dozaj, bir yıllık dozdur. Başka bir uygulamada doz, çeşitli tanımlı sayıda dozdan oluşun bir dozdur. Bir başka uygulamada, doz, bir tek seferlik dozdur. Aşağıda tarif edilen şekilde, bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre RNA, oligoribonükleotid veya poliribonükleotid moleküllerinin kullanımın bir avantajı, bunların daha büyük potansa sahip olması, dolayısıyla daha küçük dozlarda kullanımlarına imkan vermesidir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, bir *in vitro* olarak sentezlenmiş oligoribonükleotidli bir *in vitro* translasyon aparatının, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içeren *in vitro* olarak sentezlenmiş oligoribonükleotid ile temas ettirilmesi, böylece bir rekombinant proteinin üretilmesini içeren bir rekombinant proteinin üretilmesinin bir yöntemini açıklamaktadır.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, burada tarif edilen bir *in vitro* olarak transkribe edilmiş bir RNA molekülü bir *in vitro* translasyon aparatının, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içeren *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesi, böylece bir rekombinant proteinin üretilmesini içeren bir rekombinant proteinin üretilmesinin bir yöntemini açıklamaktadır.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru bir *in vitro* transkripsiyon aparatı açıklamakta olup, şunları içerir: bir modifiye edilmemiş nükleotid, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içeren bir nükleotid, ve bir polimeraz. Burada, bir *in vitro* transkripsiyon kiti tarif edilmekte olup, şunları içerir: bir modifiye edilmemiş nükleotid, bir psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid içeren bir nükleotid, ve bir polimeraz. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka açıklamada, *in vitro* translasyon aparatı bir

retikulosit lizati içerir. Bir başka açıklamada, retikulosit lizati, bir tavşan retikulosit lizatıdır.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru bir oligoribonükleotit molekülünün veya RNA molekülünün bir immünojenikliğinin azaltılması yöntemini açıklamaktadır, yöntem, oligoribonükleotid molekülü veya RNA molekülünün bir nükleotidinin, bir modifiye edilmiş nükleosid veya bir psödouridin içeren bir modifiye edilmiş nükleosid ile değiştirilmesi, böylelikle bir oligoribonükleotit molekülünün veya RNA molekülünün bir immünojenikliğin azaltılması adımını içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, bir poliribonükleotid molekülü veya RNA molekülü içeren bir gen terapi vektörünün immünojenikliğinin azaltılmasının bir yöntemini açıklamaktadır, yöntem, poliribonükleotit molekülünün veya RNA molekülünün bir nükleotidinin, bir modifiye edilmiş nükleosid veya bir psödouridin içeren bir modifiye edilmiş nükleosid ile değiştirilmesi, böylelikle bir gen terapisi vektörünün bir immünojenikliğin azaltılması adımını içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru bir oligoribonükleotit molekülü veya RNA molekülünden *in vitro* translasyonun arttırılmasının bir yöntemini açıklamaktadır, yöntem, oligoribonükleotid molekülü veya RNA molekülünün bir nükleotidinin, bir modifiye edilmiş nükleosid veya bir psödouridin içeren bir modifiye edilmiş nükleosid ile değiştirilmesi, böylelikle bir oligoribonükleotit molekülü veya RNA molekülünden *in vivo* translasyonun arttırılması adımını içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, bir poliribonükleotid molekülü veya RNA molekülü içeren bir gen terapi vektöründen *in vivo* translasyonun arttırılmasının bir yöntemini açıklamaktadır, yöntem, poliribonükleotit molekülünün veya RNA molekülünün bir nükleotidinin, bir modifiye edilmiş nükleosid veya bir psödouridin içeren bir modifiye edilmiş nükleosid ile değiştirilmesi, böylelikle bir gen terapisi vektöründen *in vivo*

translasyonun arttırılması adımıını içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, bir poliribonükleotid molekülü veya RNA molekülü içeren bir gen terapisi vektörü tarafından bir rekombinant proteinin iletim veriminin arttırılmasının bir yöntemini açıklamaktadır, yöntem, poliribonükleotit molekülünün veya RNA molekülünün bir nükleotidinin, bir modifiye edilmiş nükleosid veya bir psödouridin içeren bir modifiye edilmiş nükleosid ile değiştirilmesi, böylelikle bir gen terapisi vektörü ile rekombinant bir proteinin veriminin arttırılması adımıını içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, bir poliribonükleotid molekülü veya RNA molekülü içeren bir gen terapi vektörününün *in vivo* stabilitesinin arttırılmasının bir yöntemini açıklamaktadır, yöntem, poliribonükleotit molekülünün veya RNA molekülünün bir nükleotidinin, bir modifiye edilmiş nükleosid veya bir psödouridin içeren bir modifiye edilmiş nükleosid ile değiştirilmesi, böylelikle bir gen terapisi vektörününün *in vivo* stabilitesinin arttırılması adımıını içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, bir psödouridin nükleosidi ihtiva eden bir *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA molekülünün, izole edilmiş bir polimerazın bir modifiye edilmemiş nükleotid ve modifiye edilmiş nükleotid karışımı (Örnekler 2 ve 7) ile temas ettirilmesini içeren sentezleme yöntemini açıklamaktadır.

Bir başka açıklamada, mevcut başvurunun *in vitro* transkripsiyon yöntemleri bir hayvan hücresinden elde edilen bir ekstraktı kullanır. Bir başka açıklamada, ekstrakt, *in vitro* transkripsiyonun benzer etkinliğine sahip bir retikülosit veya hücreden elde edilir. Bir başka açıklamada, ekstrakt, teknikte bilinen herhangi bir başka hücre tipindendir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, bir antijene bir immün yanıtın arttırılmasının bir yöntemini açıklamakta olup, yöntem, antijenin mitokondril (mt) RNA ile kombinasyon halinde uygulanmasını içermektedir (Örnekler 1 ve 5).

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, RNA molekülünün bir nükleosidinin mevcut buluşun bir yöntemi tarafından modifiye edilmesini içeren bir RNA molekülünün bir dendritik hücreyi (DC) indüklemeye kabiliyetinin azaltılması yöntemini (Örnekler)

5 açıklamaktadır.

Bir başka açıklamada, DC, bir DC1 hücresidir. Bir başka açıklamada, DC, bir DC2 hücresidir. Bir başka açıklamada, DC, bir DC1 hücresi veya DC2 hücresinin bir alt tipidir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

10 Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, RNA molekülünün bir nükleosidinin mevcut başvurunun bir yöntemi tarafından modifiye edilmesini içeren bir RNA molekülünün TLR3 tarafından sinyallemeyi indüklemeye kabiliyetinin azaltılması yöntemini açıklamaktadır. Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, RNA
15 molekülünün bir nükleosidinin mevcut başvurunun bir yöntemi tarafından modifiye edilmesini içeren bir RNA molekülünün TLR7 tarafından sinyallemeyi indüklemeye kabiliyetinin azaltılması yöntemini açıklamaktadır. Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, RNA molekülünün bir nükleosidinin mevcut başvurunun bir yöntemi
20 tarafından modifiye edilmesini içeren bir RNA molekülünün TLR8 tarafından sinyallemeyi indüklemeye kabiliyetinin azaltılması yöntemini açıklamaktadır. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın
25 veya mevcut buluşa göre kullanımın mesajcı RNA'sındaki tüm inter-nükleotid bağlantılar, fosfodiesterlerdir. Bir başka uygulamada, inter-nükleotid bağlantıları, ağırlıklı olarak fosfodiesterlerdir. Bir başka uygulamada, nükleotid bağlantılarının çoğu, fosforotiyoattır. Bir başka uygulamada, inter-nükleotid
30 bağlantılarının çoğu, fosfodiesterlerdir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir başka uygulamada, fosfodiester olan nükleotid bağlantılarının yüzdesi, %50'nin üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %10'un üzerindedir. Bir başka uygulamada,
35 yüzde, %15'in üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %20'nin

5 üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %25'in üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %30'un üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %35'in üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %40'ın üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %45'in
10 üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %55'in üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %60'ın üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %65'in üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %70'in üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %75'in üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %80'in üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %85'in üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %90'ın üzerindedir. Bir başka uygulamada, yüzde, %95'in üzerindedir.

Bir başka uygulamada, mevcut buluşun bir yöntemi, immünojenikliği azaltmak veya translasyonun etkinliğini artırmak
15 amacıyla mesajcı RNA molekülündeki değiştirilmiş nükleosidlerin sayısının, yüzdesinin veya sıklığının arttırılmasını içerir. Mesajcı RNA, en az psödouridin veya 1-metilpsödouridin içerir. Burada belirtildiği gibi, bir mRNA'daki modifiye edilmiş kalıntıların sayısı, bir başka uygulamada, mevcut buluşta
20 gözlemlenen etkilerin büyüklüğünü belirler.

Bir başka uygulamada, mevcut buluş, mevcut buluşa göre kullanım için bir kişinin bir hücrelerine bir rekombinant proteinin dahil edilmesi amaçlı bir kullanım veya bir mRNA sunmakta olup, bu kullanım, kişinin rekombinant proteini kodlayan bir *in vitro*
25 olarak transkribe edilmiş RNA molekülü ile temas ettirilmesini, *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA molekülü ayrıca mevcut buluşa göre belirtilen şekilde modifiye edilmiş bir nükleosid içerir, böylelikle bir rekombinant proteinin bir kişinin bir hücrelerine dahil edilmesini kapsar.

30 Bir başka açıklamada, mevcut başvuru bir kişideki bir gen terapisi vektörüne yanıt olarak TNF- α üretiminin azaltılması için bir yöntem açıklamakta olup, yöntem, vektörün bir psödouridin veya değiştirilmiş bir nükleosit bazı içerecek şekilde geliştirilmesi, bir kişideki böylelikle bir gen terapisi
35 vektörüne yanıt olarak TNF- α üretiminin azaltılması adımını

içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru bir kişideki bir gen terapisi vektörüne yanıt olarak IL-12 üretiminin azaltılması için bir yöntem açıklamakta olup, yöntem, vektörün bir psödouridin veya değiştirilmiş bir nükleosit bazı içerecek şekilde geliştirilmesi, bir kişideki böylelikle bir gen terapisi vektörüne yanıt olarak IL-12 üretiminin azaltılması adımını içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru gen tedavisi vektörünün immünojenikliğin azaltılmasının bir yöntemini açıklamakta olup, yöntem, modifiye edilmiş bir nükleosidin bahsedilen gen terapisi vektörüne dahil edilmesi, böylece bir gen terapisi vektörünün immünojenikliğin azaltılmasını içerir.

Burada sağlanan şekilde, mevcut buluşun bulguları, birincil DC'nin m5C- ve m6A-modifiye edilmiş RNA'yı tanıyan ilave bir RNA sinyalleme varlığına sahip olduğunu ve sinyallemesinin, U kalıntılarının modifikasyonu ile inhibe edildiğini göstermektedir.

Bir başka uygulamada, yenilikçi yöntemin, yenilikçi kullanımın veya mevcut buluşa göre kullanımın bir mesajcı RNA'sının bir avantajı, RNA'nın genoma dahil olmamasıdır (DNA bazlı vektörlerin tersine). Başka bir uygulamada bir avantaj, RNA'nın translasyonunun ve dolayısıyla kodlanmış ürünün görünümünün anlık olmasıdır. Başka bir uygulamada, bir avantaj mRNA'dan üretilen protein miktarının az çok RNA verilmesi ile düzenlenebilmesidir. Bir başka uygulamada, bir avantaj, modifiye edilmemiş RNA'nın tekrar tekrar verilmesi otoimmün reaksiyonlara neden olabilmesidir.

Bir avantaj, immünojenikliğin yokluğu olup, enflamatuvar sitokinler oluşmadan tekrarlanan iletimin sağlanmasıdır.

Bir başka uygulamada, mRNA'nın stabilitesi, sirkülarizasyon ile artar, bu, ekzonükleazların bozunmasını azaltır.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru öz-RNA molekülüne karşı bir bağışıklık yanıtı içeren bir hastalık taşıyan bir kişinin tedavisine yönelik bir yöntem açıklamakta olup, yöntem, kişiye

bir TLR-3 molekülü antagonistinin uygulanmasını, böylece bir öz-RNA molekülüne karşı bir bağışıklık yanıtı içeren bir hastalık taşıyan bir kişinin tedavi edilmesini içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru öz-RNA molekülüne karşı bir bağışıklık yanıtı içeren bir hastalık taşıyan bir kişinin tedavisine yönelik bir yöntem açıklamakta olup, yöntem, kişiye bir TLR-7 molekülü antagonistinin uygulanmasını, böylece bir öz-RNA molekülüne karşı bir bağışıklık yanıtı içeren bir hastalık taşıyan bir kişinin tedavi edilmesini içerir.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru öz-RNA molekülüne karşı bir bağışıklık yanıtı içeren bir hastalık taşıyan bir kişinin tedavisine yönelik bir yöntem açıklamakta olup, yöntem, kişiye bir TLR-8 molekülü antagonistinin uygulanmasını, böylece bir öz-RNA molekülüne karşı bir bağışıklık yanıtı içeren bir hastalık taşıyan bir kişinin tedavi edilmesini içerir.

Bir başka açıklamada, bir öz-RNA molekülüne karşı bir bağışıklık yanıtı içeren bir hastalık, bir otoimmün hastalıktır. Bir başka açıklamada, hastalık, sistemik lupus eritematozudur (SLE). Bir başka açıklamada, hastalık, bir öz-RNA molekülüne karşı bir bağışıklık yanıtı içerdiği teknikte bilinen bir başka hastalıktır. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir açıklamasını temsil eder.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru mevcut buluşun bir yönteminin gerçekleştirilmesinde kullanılan bir ayıraç ihtiva eden bir kit açıklamaktadır. Bir başka açıklamada, mevcut başvuru, mevcut beyanın bir bileşimi, aleti veya cihazı, aygıtını ihtiva eden bir kit açıklamaktadır.

Bir başka açıklamada, mevcut başvuru bir TLR3, TLR7 ve TLR8 reseptörü tarafından sinyallemeyi, Örnek 4'te örneklenen şekilde ölçmek veya çalışmak için bir kit açıklamaktadır.

Bir başka uygulamada, mevcut buluşun bir tedavi protokolü, terapötiktir. Bir başka uygulamada, protokol, profilaktiktir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Bir uygulamada, "bir hücreyi temas ettirmek" veya "bir

popölasyonu temas ettirmek" ifadesi, doğrudan veya dolaylı olabilen bir maruz bırakma yöntemini ifade eder. Bir yöntemde bu temas, hücrenin, mikroenjeksiyon gibi, teknikte iyi bilinen herhangi bir yoldan doğrudan enjeksiyonunu içerir. Başka bir uygulamada, hücreye malzeme sağlama, örneğin hücreyi saran bir kültür ortamındaki tedarik yoluyla veya bir deneğe uygulama yoluyla veya teknikte bilinen herhangi bir yolla dolaylı olarak gerçekleşir. Bir başka uygulamada, "temas ettirme" terimi, mevcut buluşun molekülünün, tedavi gören bir deneğe verildiğini ve molekülün in vivo olarak hücre ile temas etmesine imkan sağlandığı anlamına gelir. Her bir olasılık mevcut buluşun ayrı bir uygulamasını temsil eder.

Retikölösit frekansının ölçölmesi ve EPO biyolojik aktivitesinin ölçölmesi için yöntemler teknikte iyi bilinmektedir ve örneğin Ramos, AS et al yayınında tarif edilmiştir (Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. Braz J Med Biol Res 36:1561).

Mevcut buluşun bileşimleri, bir başka uygulamada, bir deneğe teknikte yetkin bir kişi tarafından bilinen herhangi bir yöntemle, örneğin parenteral olarak, parakanseral olarak, transmukozal olarak, transdermal olarak, intramüsküler olarak, intravenöz olarak, intra-dermal olarak, subkutanöz olarak, intra-peritoneal olarak, intra-ventriküler olarak, intrakraniyal olarak, intra-vajinal olarak veya intratümörel olarak uygulanabilir.

Mevcut buluşun yöntemleri ve bileşimlerinin bir başka uygulamasında, bileşimler oral olarak verilir ve bu nedenle oral uygulama için uygun bir formda yani katı veya sıvı bir preparat halinde formüle edilirler. Uygun katı oral formölasyonlar arasında tabletler, kapsüller, haplar, granüller, peletler ve benzerleri bulunur. Uygun oral sıvı formölasyonlar arasında çözeltiiler, süspansiyonlar, dispersiyonlar, emölsiyonlar, yağlar ve benzerleri bulunur. Mevcut buluşun bir başka uygulamasında, etken madde bir kapsöl halinde formüle edilir. Bu

uygulamaya göre, bu buluşun bileşimleri, aktif bileşiğe ve etkisiz taşıyıcıya veya seyrelticiye ek olarak, sert bir jelatin kapsül içerir.

5 Başka uygulamalarda, farmasötik bileşimler, bir sıvının preparasyonunun intravenöz, intra-arteriyel veya intramüsküler enjeksiyonu ile uygulanır. Uygun sıvı formülasyonlar arasında çözelti-
10 çözeltiler, süspansiyonlar, dispersiyonlar, emülsiyonlar, yağlar ve benzerleri bulunur. Bir başka uygulamada, farmasötik bileşimler intravenöz olarak verilir ve bu yüzden intravenöz uygulama için uygun bir formda formüle edilirler. Bir başka
15 uygulamada, farmasötik bileşimler intra-arteriyel olarak verilir ve bu yüzden intra-arteriyel uygulama için uygun bir formda formüle edilirler. Bir başka uygulamada, farmasötik bileşimler intra-müsküler olarak verilir ve bu yüzden intra-müsküler uygulama için uygun bir formda formüle edilirler.

Bir başka uygulamada, farmasötik bileşimler vücut yüzeylerine topikal olarak verilir ve bu yüzden topikal uygulama için uygun bir formda formüle edilirler. Uygun topikal formülasyonlar arasında jeller, merhemler, kremler, losyonlar, damlalar ve
20 benzerleri bulunur. Topikal uygulama için, bileşimler veya fizyolojik olarak tolere edilen türevleri, çözelti-
süspansiyonlar veya farmasötik bir taşıyıcıyla veya farmasötik taşıyıcı olmadan fizyolojik olarak kabul edilebilir bir seyrelticideki emülsiyonlar olarak hazırlanır ve uygulanır.

25 Bir başka uygulamada, bileşim bir supozituar, örneğin bir rektal supozituar veya bir üretral supozituar olarak verilir. Bir başka uygulamada, farmasötik bileşim bir peletin subkütan implantasyonu ile verilir. Bir başka uygulamada, pelet, bir süre boyunca maddenin kontrollü salımını sağlar.

30 Bir başka uygulamada, etken bileşik, örneğin bir lipozom, bir vezikül içinde verilir (bakınız Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez- Berestein ve Fidler (eds.), Liss, New York, sf. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., sf. 317-327;
35 genel olarak aynı yazıyı inceleyiniz).

Burada kullanıldığı şekilde "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar veya seyrelticiler" teknikte yetkin olanlarca iyi bilinmektedir. Taşıyıcı veya seyreltici, çeşitli uygulamalarda, katı formülasyonlar için bir katı taşıyıcı veya seyreltici, sıvı formülasyonlar için bir sıvı taşıyıcı veya seyreltici, veya bunların karışımları olabilir.

Bir başka uygulamada, katı taşıyıcılar/seyrelticiler arasında, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, bir sakız, bir nişasta (örneğin mısır nişastası, prejeletanize nişasta), bir şeker (örneğin, laktoz, mannitol, sükroz, dekstroz), bir selülozik malzeme (örneğin mikrokristal selüloz), bir akrilat (örneğin polimetilakrilat), kalsiyum karbonat, magnezyum oksit, talk, veya bunların karışımları bulunur.

Başka uygulamalarda, sıvı formülasyon için farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, sulu veya sulu olmayan çözeltiler, süspansiyonlar, emülsiyonlar veya yağlar olabilir. Susuz çözücü örnekleri arasında, propilen glikol, polietilen glikol, ve enjekte edilebilir organik esterler örneğin etil oleat bulunur. Sulu taşıyıcılar arasında, su, alkolik/sulu çözeltiler, emülsiyonlar veya süspansiyonlar, örneğin salin ve tamponlu ortamlar bulunur. Yağlara örnekler arasında, petrol, hayvan, sebze veya sentetik orijinli yağlar, örneğin, fıstık yağı, soya fasülyesi yağı, mineral yağ, zeytinyağı, ayçiçeği yağı ve balık-karaciğer yağı bulunur.

Parenteral araçlar (subkütan, intravenöz, intraarteriyel veya intramüsküler enjeksiyon için) arasında, sodyum klorür çözeltisi, Ringer dekstrozu, dekstroz ve sodyum klorür, laktize Ringer ve sabit yağlar bulunur. İntravenöz araçlar arasında sıvı ve besin tazeleyiciler, elektrolit tazeleyicileri, örneğin Ringer dekstrozunu baz alanlar ve benzerleri bulunur. Örnekler, steril sıvılar, örneğin, bir sürfaktan ve diğer farmasötik olarak kabul edilebilir adjuvan ilaveli veya olmaksızın su ve yağlardır. Genel olarak, su, salin, sulu dekstroz ve ilgili şeker çözeltileri ve glikoller örneğin propilen glikoller veya polietilen glikol, özellikle enjekte edilebilir çözeltiler için

tercih edilen sıvı taşıyıcılardır. Yağlara örnekler arasında, petrol, hayvan, sebze veya sentetik orijinli yağlar, örneğin, fıstık yağı, soya fasülyesi yağı, mineral yağ, zeytinyağı, ayçiçeği yağı ve balık-karaciğer yağı bulunur.

- 5 Bir başka uygulamada, bileşimler ayrıca şunları içerir: bağlayıcılar (örneğin akasya, mısır nişastası, jelatin, karbomer, etil selüloz, guar sakızı, hidroksipropil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, povidon), dağılma maddeleri (örneğin mısır nişastası, patates nişastası, alginik asit, 10 silikon dioksit, kroskarmeloz sodyum, krospovidon, guar sakızı, sodyum nişasta glikolat), çeşitli pH ve iyonik kuvvetlerdeki tampon maddeleri (örneğin, Tris-HCl, asetat, fosfat), yüzeylere emilimini önlemek için albümin veya jelatin gibi katkı maddeleri, deterjanlar (örneğin, Tween 20, Tween 80, Pluronic 15 F68, safra asidi tuzları), proteaz inhibitörleri, sürfaktanlar (örneğin sodyum lauril sülfat), geçirim arttırıcılar, çözücü maddeler (örneğin, gliserol, polietilen gliserol), antioksidanlar (örneğin, askorbik asit, sodyum metabisülfat, butilize hidroksianizol), dengeleyiciler (örneğin 20 hidroksipropil selüloz, hidroksipropilmetil selüloz), viskozite arttırma maddeler (örneğin karbomer, koloidal silikon dioksit, etil selüloz, guar sakızı), tatlandırıcılar (örneğin aspartam, sitrik asit), koruyucular (örneğin, timerosal, benzil alkol, parabenler), kayganlaştırıcılar (örneğin stearik asit, magnezyum 25 stearat, polietilen glikol, sodyum lauril sülfat), akış yardımcıları (örneğin koloidal silikon dioksit), plastikleştiriciler (örneğin dietil ftalat, trietil sitrat), emülsifierler (örneğin karbomer, hidroksipropil selüloz, sodyum lauril sülfat), polimer kaplamalar (örneğin, poloksamerler veya 30 poloksaminler), kaplama ve film oluşturuucu maddeler (örneğin etil selüloz, akrilatlar, polimetakrilatlar) ve/veya adjuvanlar.

- Bir başka uygulamada, burada sağlanan farmasötik bileşimler, kontrollü-salım bileşimleri, başka bir deyişle bileşiğin tatbik edildikten bir süre sonra serbest bırakıldığı bileşimlerdir. 35 Kontrollü- veya sürekli salımlı bileşimler lipofilik depolar

(örneğin yağ asitleri, mumlar, yağlar) halinde formülasyonu kapsar. Bir başka uygulamada, bileşim, ani salımlı bir bileşimdir, başka bir deyişle uygulamadan hemen sonra tüm bileşiğin salındığı bir bileşimdir.

5 Bir başka uygulamada, mevcut buluşun yöntemleri ve medikal kullanımlarında kullanmak için moleküller, suda çözünür polimerlerin, örneğin polietilen glikol, polietilen glikol ve polipropilen glikol, karboksimetil selüloz, dekstran, polivinil alkol, polivinilpirrolidon veya poliprolin kopolimerlerinin
10 kovalent eklenmesi ile modifiye edilir. Modifiye edilmiş bileşiklerin, intravenöz enjeksiyonun ardından kanda, karşılık gelen değiştirilmemiş bileşiklerden daha büyük ölçüde daha uzun yarı ömür sergilediği bilinmektedir (Abuchowski et al., 1981; Newmarket al., 1982; ve Katre et al., 1987). Böyle
15 modifikasyonlar ayrıca, bir başka uygulamada, bileşiklerin sulu çözelti içindeki çözünürlüğünü arttırır, agregasyonu azaltır, bileşiğin fiziksel ve kimyasal stabilitesini arttırır ve bileşiğin immünojeniklik ve reaktivitesini büyük ölçüde azaltır. Sonuç olarak, arzu edilen *in vivo* biyolojik aktivite böyle
20 polimer- bileşik eklerinin modifiye edilmemiş bileşiklerle olandan daha az sıklıkta veya daha düşük dozlarda uygulanmasıyla elde edilebilir.

Bir aktif bileşen, bir başka örnekte, bileşim halinde nötrleştirilmiş farmasötik olarak kabul edilebilir tuz formları
25 halinde formüle edilir. Farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar, inorganik asitlerle, örneğin, hidroklorik veya fosforik asitlerle veya organik asitler, örneğin asetik, oksalik, tartarik, mandelik ve benzerleri ile oluşan asit eklenti tuzlarını (polipeptid veya antikor molekülünün serbest amino
30 grupları ile oluşturulmuştur) içerir. Serbest karboksil gruplarından oluşan tuzlar, organik bazlar, örneğin, sodyum, potasyum, amonyum, kalsiyum veya ferrik hidroksitler ve organik bazlar örneğin, izopropilamin, trimetilamin, 2-etilamino etanol, histidin, prokain ve benzerlerinden de elde edilebilir.

DENEYSEL AYRINTILAR BÖLÜMÜ

ÖRNEK 1: DOĞAL OLARAK OLUŞAN RNA MOLEKÜLLERİ DENDRİTİK HÜCRELERİ ETKİNLEŞTİRME KONUSUNDA FARKLI KABİLİYETLER SERGİLEMEKTEDİR **MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER**

5 Plazmidler ve Ayıraçlar

pT7T3D-MART-1 VE pUNO-hTLR3 plazmidleri, sırasıyla, ATCC (Manassas, VA) ve InvivoGen'den (San Diego, CA), temin edilmiştir. pTEVIuc, Dr Daniel Gallie'den (UC Riverside) temin edilmiş olup, pT7-TEV (tütün asitli viral genomik RNA'nın lider dizisi)-lusuferaz-A50'yi içerir ve Gallie, DR et al, 1995 referanslı yayında tarif edilmiştir. Tütün etch viral 5 'lideri ve poli (A) kuyruğu, işlevsel olarak sinerjistik translasyon düzenleyicileridir. Gene 165:233) pSVren p2luc'dan (Grentzmann G, Ingram JA, et al, A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. RNA 1998;4(4): 479-86) ateşböceği lusuferaz kodlama dizisinin BamHI ve NotI sindirimleri ile çıkarılması, uç doldurma ve yeniden bağlanma yoluyla üretilmiştir.

İnsan TLR3-spesifik siRNA, pTLR3-sh, insan TLR3'e 20-nt uzunluklu homolojiye (nt 703-722, erişim: NM_003265) sahip olan shRNA'yı kodlayan sentetik ODN'nin, pSilencer 4.1-CMV-neo plazmidine (Ambion, Austin, TX) dahil edilmesiyle oluşturulmuştur. pCMV-hTLR3, öncelikle hTLR3-spesifikPCR ürününün (nt 80-2887; erişim: NM_003265) pCRII-TOPO'ya klonlanması (Invitrogen, Carlsbad, CA), daha sonra Nhe I-Hind III kesimi ve pCDNA3.1'in karşılık gelen bölgelerine alt klonlama (Invitrogen) ile elde edilmiştir. LPS (E. coli 055:B5) Sigma Chemical Co., St. Louis, MO'dan alınmıştır. CpG ODN- 2006 ve R-848 InvivoGen'den alınmıştır.

30 Hücreler ve hücre kültürü

İnsan embriyonik böbrek 293 hücreleri (ATCC) glutamin (Invitrogen) ve %10 FCS (Hyclone, Ogden, UT) (tam ortam) takviyeli DMEM içine yayılmıştır. Buradaki tüm durumlarda, "293 hücreleri" insan embriyonik böbrek (HEK) 293 hücreleri anlamına gelir. 293-hTLR3 hücre hatları, 293 hücrelerinin pUNO-hTLR3 ile

dönüştürülmesiyle üretilmiştir. 293- hTLR7, 293-hTLR8 ve 293-hTLR9 hücre hatları (InvivoGen), blastisitinin (10 µg/ml) (Invivogen) takviyeli tam ortamda büyütülmüştür. 293-ELAM-luc ve TLR7-293 hücre hatları (M. Lamphier, Eisai Research Institute, Andover MA), ve TLR3-293 hücreleri tarif edilen şekilde kültürlenmiştir (Kariko et al, 2004, mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. J Biol Chem 279: 12542-12550). 293, 293-hTLR7 ve 293-hTLR8 hücre hatları pTLR3-sh ile stabil şekilde transfekte edilmiş ve G-418 (400 µg/ml) (Invitrogen) ile seçilmiştir. Neo-dirençli koloniler taramış ve sadece poli(1):(C)'ye cevaben IL-8 salgısının olmayışı açısından belirlenen TLR3'ü eksprese etmeyenler, ilave çalışmalarda kullanılmıştır. Lökoferaz örnekleri, HIV bulaşmamış gönüllülerden IRB onaylı bir protokolle elde edilmiştir.

15 **Mürin DC üretimi**

Mürin DC'si, 6-8-haftalık C57BL/6 farelerinin tibia ve femurlarından kemik iliği hücreleri toplanarak üretilmiş ve kırmızı kan hücreleri lize edilmiştir. Hücreler, 6 kuyucuklu plakalara 2 ml DMEM + %10 FCS ve 20 ng/ml muGM-CSF (R & D Systems) içinde 10^6 hücre/kuyu olarak ekilmiştir. 3'üncü günde, muGM-CSF'li 2 ml taze ortam ilave edilmiştir. 6'ıncı günde, 2 ml ortam/kuyu toplanmış ve hücreler topaklanmış ve taze ortamda muGM-CSF ile yeniden süspanse edilmiştir. Kültürün 7'nci gününde, muDC hasat edilmiş, yıkanmıştır.

25 **Doğal RNA**

Mitokondri, bir fraksiyonasyon lizisi prosedürü kullanılarak Pennsylvania Üniversitesi Kan Bankası'ndan elde edilen trombositlerden izole edilmiştir (Mitochondria izolasyon kiti; Pierce, Rockford, IL). RNA, arıtılmış mitokondri, sitoplazmik ve 293 hücreleri, fraksiyone edilmemiş 293 hücreleri, sıçan karaciğeri, fare hücre hattı TUBO'nun nükleer fraksiyonları ve *E. coli* Master Blaster® (BioRad, Hercules, CA) DH5alfa suşundan izole edilmiştir. Sığır tRNA'sı, buğday tRNA'sı, maya tRNA'sı, *E. coli* tRNA'sı, fare kalbinden poli(A)+ mRNA ve poli(1):(C), Sigma'den satın alınmıştır, insan dalağından toplam RNA ve *E.*

coli RNA'sı Ambion'dan satın alınmıştır. Oligoribonükleotid-5'-monofosfatlar kimyasal olarak sentezlenmiştir (Dharmacon, Lafayette, CO).

RNA örneklerinin bölüntüleri, Benzonaz nükleazı varlığında enkübe edilmiştir (5 µI RNA başına 1 U, başına mikrolitre µg/µI başına 1 mikrogram) 1 saat süreyle) (Novagen, Madison, WI). RNA-730 bölüntüleri alkalın fosfataz ile sindirilmiştir (New England Biolabs). RNA örnekleri, kalite kontrol için agaroz veya poliakrilamid jel elektroforeziyle denatüre edilerek analiz edilmiştir. Limulus Amebocyte Lysate jeli pıhtı testi kullanılarak RNA preparasyonlarındaki LPS için testler, mililitre (pg/ml) başına 3 pikogram duyarlılığında negatif çıkmıştır (University of Pennsylvania, Core Facility).

HPLC analizi

Nükleosid monofosfatlar ayrılmış ve HPLC yoluyla görselleştirilmiştir. Serbest nükleosid 3'-mono- fosfatlarını salımlamak için, 5 µg'lik RNA bölüntüleri 10 µL 50 mM NaOAc ve 2 mM EDTA tamponu (pH 4.5) içinde 0,1 U RNase T2 (Invitrogen) ile gece boyunca sindirilmiş, ardından örnekler Waters Symmetry C18 kolonu (Waters, Milford, MA) kullanılarak bir Agilent 1100 HPLC'ye enjekte edilmiştir. 1 mL/dk'lık bir akış hızında, %100 tampon A (30 mM KH₂PO₄ ve 10 mM tetraetilamonyum fosfat [Pica ayırıcı, Waters], pH 6.0) ila %30 tampon B (asetonitril) arasındaki bir gradyan 60 dakika boyunca çalıştırılmıştır. Nükleotitler, 254 nm'de bir fotodiyot dizisi kullanılarak tespit edilmiştir. Özdeşlikler, alıkonma zamanları ve spektrumları ile doğrulanmıştır.

Dendritik hücre testleri

96 kuyucuklu plakalardaki dendritik hücreler (yaklaşık 1,1 x 10⁵ hücre/kuyu) R-848, Lipofectin® veya Lipofectin®-RNA ile 1 saat süreyle muamele edilmiş, ardından ortam değiştirilmiştir. 8 saatin sonunda (aksi belirtilmedikçe), hücreler ya RNA izolasyonu ya da akış sitometrisi için hasat edilirken, toplanan kültür ortamı sitokin ELISA'ya tabi tutulmuştur. IL-12 (p70) düzeyleri (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), IFN-α,

TNF- α ve IL-8 (Biosource International, Camarillo, CA) üst fazlarda sandviç ELISA ile ölçülmüştür. Kültürler, üçlü veya dörtlü olarak gerçekleştirilmiş ve iki kopya halinde ölçülmüştür.

5 **Northern blot analizi**

RNA, yukarıda tarif edildiği gibi muameleyi takiben 8 saatlik bir enkübasyondan sonra MDDC'lerden izole edilmiştir. Belirtilindiği yerlerde, hücreler 2,5 pg/ml sikloheksimit (Sigma) ile, stimülasyondan 30 dakika önce ve enkübasyon süresi boyunca muamele edilmiştir. RNA örnekleri işlenmiş ve açıklanan şekilde (Kariko et al, 2004, ibid) ATCC'den elde edilen plazmitlerden (sırasıyla pE4 ve pHcGAP) türetilmiş insan TNF- α ve GAPDH problemleri kullanılarak Northern blotlar üzerinde analiz edilmiştir.

15 **SONUÇLAR**

Farklı hücresel RNA alt tiplerinin immüno-stimülatör potansiyelini belirlemek için, RNA, farklı hücre içi kompartmanlardan başka bir deyişle sitoplazma, çekirdek ve mitokondriden izole edilmiştir. Tüm memeli kaynaklarından bu RNA fraksiyonları ile toplam RNA, tRNA ve poliA kuyruğu ile seçilmiş mRNA, Lipofectin®'e kompleksleştirilmiş ve MDDC'ye ilave edilmiştir. Memeli toplamı, nükleer ve sitoplazmik RNA'nın tümü, saptanabilir TNF- α salgılaması ile kanıtlandığı gibi MDDC'yi uyarırken, TNF- α düzeyleri, *in vitro*-sentezlenmiş mRNA tarafından indüklenenlerden çok daha düşük olmuştur (Şekil 1). Ayrıca, memeli tRNA'sı herhangi bir saptanabilir düzeyde TNF- α indüklemeyen mitokondril (mt) RNA, diğer memeli RNA alt tiplerinden çok daha fazla TNF- α indüklemiştir. Bakteriyel toplam RNA MDDC'nin ayrı bir güçlü aktivatörü olmuştur; aksine, bakteriyel tRNA, sadece düşük bir düzeyde TNF- α indüklemiştir. Diğer kaynaklardan (maya, buğday mikrop, sığır) tRNA stimüle edici olmamıştır. Diğer memeli kaynaklarından gelen RNA test edildiğinde benzer sonuçlar gözlenmiştir. RNA örnekleri Benzonaz ile sindirildiğinde, bu, ssRNA ve dsRNA'yı ayırır, RNA sinyalleme MDDC içinde ortadan kalkmış, bu, TNF- α

sekresyonunun müstahzarlardaki RNA sebebiyle olduğunu doğrulamıştır. Test edilen RNA türlerinin aktivasyon potansiyelleri, nükleosid modifikasyonunun derecesi ile bir ters korelasyon sergilemiştir. Her iki sitokin ile oluşturulmuş DC tipi için bu Örnekte açıklanan deneylerde benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bu bulgular RNA'nın immünojenikliğinin, immünojenikliği azaltma eğiliminde olan daha büyük bir modifikasyon derecesine sahip olan nükleosid modifikasyonunun derecesi tarafından etkilendiğini göstermektedir.

ÖRNEK 2: MODİFİYE NÜKLEOSİDLERİN RNA MOLEKÜLLERİNİN İN VITRO SENTEZİ

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

İn vitro olarak transkribe edilmiş RNA

In vitro transkripsiyon testleri (MessageMachine ve MegaScript kitleri; Ambion,) kullanılarak takip eden uzun RNA'lar T7 RNA polimerazı (RNAP) ile tarif edilen şekilde üretilmiştir (Kariko et al, 1998, Phosphate-enhanced transfection of cationic lipid-complexed mRNA and plasmid DNA. Biochim Biophys Acta 1369, 320-334) (Not: Şablonların isimleri parantez içinde belirtilmiştir; RNA'nın adındaki sayı uzunluğu belirtir): RNA-1866 (Nde 1-düzleştirilmiş pTEVIuc) ateş böceği lusiferazını ve bir 50 nt uzunluklu poliA- kuyruğunu kodlar. RNA-1571 (Ssp 1-linearize pSVren) Renilla lusiferazını kodlar. RNA-730 (Hind III-linearize pT7T3D-MART-1) insan melanom antijeni MART-1'i kodlar. MART-1, RNA-497'nin antisens sekansına (Bgl II-linearize pCMV- hTLR3) karşılık gelen RNA-713 (ECOR 1-linearize pT7T3D-MART-1) hTLR3'ün kısmi 5' fragmanını kodlar. RNA moleküllerinin sekansları aşağıdaki gibidir:

[illegible][illegible]

gcaugguuugaacuucuaauuuaccaaagaagaucauuuuugucggccaugauuggggugcuuguuuggcauuucauu
auagcuauagagcaucaagauaagaucaaaagcaauaguucacgcugaaauguauguagugauugaaucauagggaugaa
uggccugauauugaagaagauauugcgugaucaaaucugaagaaggagaaaaaugguuuugggagaauaacuucucg
uggaaaccaugugccaucaaaaaucaugagaaaguuagaaccagaagaauuugcagcauaucuugaaccauucaaagaga
aaggugaaguucgucguccaacauuaucauaggccucgugaaaucccguaaguuuuagguguaaacugacguuguacaa
auuguuagggaauuaaauugcuuauuacugugcaagugaugauuuacaaaaaugguuuauugaaucggaccaggauuc
uuuccaauugcuauuuguaaggugccaaagaaguuccuaauacugaaauuugucaaaagguuucuuuuucgcaa
gaagauagcaccugaugaaaugggaaaaauaaucaaaucguucguugagcgaguucuaaaaaugaacaaauugcgcggg
ggcccuaggaauuuuuuagggaagaucuggccuuccuacaagggaaggccagggaauuuucucagagcagaccagagc
caacagccccaccagaagagagcuucaggucugggguagagacaacaacuccccucagaagcaggagccgauagacaagg
aacuguauccuuuaacuuccucagauacucuuuuggaacgacccucgucacaauaaagauaggggggcaacuaaagg
aucggccgcuucgagcagacaugauaagauacauugaugauuuuggacaaaccacaacuagaauagcagugaaaaaauugc
uuuuuugugaaaauuugugaugcuauuugcuuuuuuuuaaccuuuaaagcugcauaaacaaguuacaacaacaauugc
auucauuuuuauuuuucagguucagggggaggugugggaggguuuuuuuuagcaaguuuuuaccuacaaauguguaaaa
ucgauaaguuuuaacagauccagguggcacuuuucggggaaaugugcgcggaaccccuauuuuuuuuuuucuaaa
cauucaaaauauguaucgcucaugagacaauaaccugauaaaugcucauaau (SEQ ID No: 2).

RNA-730:

gggaauuuggccucgaggccaagaauucggcacgaggcacgcggccagccagcagacagaggacucuaauaaggaaagg
uguccugugccucgaccuacaagaugccaaagagaagauugcucacuucuaugguuaccccaagaaggggcacggccac
ucuuacaccacggcugaagagggcgugggauccggaucugacagugauccugggagucuuacugcucaucggcuguu
gguaauuguaagacgaaauggauacagagccuugauggaauaaaagucuucauguuggcacuaugugccuaaacaaga
agaugcccacaagaaggguuugaucaucgggacagcaagugucucuucagagaaaaacugugaaccugugguucccaa
ugcuccaccugcuuauagagaaacucucugcagaacagucaccaccaccuuauuaccuuuagagccagcgagacaccugag
acaugcugaaaauuuuucucacacuuuugcuugaauuuuauacagacaucaauugucuccuuuuggaauuguguagg
aaaaaugcaagccaucucuaauaauaagucaguguuuuuuuuuaguuagguccgcuagcaguacuaaucaugugaggaaa
ugaugagaaauuuuuuugggaaaacuccaucauuuuuuuuuugcaaugcaugauaaaaaaaaaaaaaaaaaacugcgg
ccgca (SEQ ID No: 3).

RNA-713

gggaauaagcuugcgccgcaguuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuaucaugcauugcaacauuuuuga

Modifiye edilmiş RNA'yı elde etmek üzere, transkripsiyon tepkimesi, bir (veya iki) bazik NTP'nin, modifiye edilmiş
5 nükleotid 5-metilsitidin, 5-metiluridin, 2-tiyouridin, N⁶-

metiladenozin veya psödouridinin (TriLink, San Diego, CA) karşılık gelen trifosfat türevi/türevleri ile değiştirilmesiyle bir araya getirilmiştir. Her bir transkripsiyon tepkimesi, tüm 4 nükleotidi veya türevleri 7,5 millimolar (mM) konsantrasyonda mevcut olmuştur. Seçilmiş deneylerde, gösterildiği gibi, 6 mM m7GpppG başlık analoğu (New England BioLabs, Beverly, MA) başlıklı RNA'yı elde etmek üzere ayrıca yer almıştır. ORN5 ve ORN6, DNA oligodeoksinükleotid şablonları ve T7 RNAP kullanılarak üretilmiştir (Silencer® siRNA oluşturma kiti, Ambion).

SONUÇLAR

Nükleosid modifikasyonlarının immünojeniklik üzerindeki etkisini ayrıca test etmek için, bir *in vitro* sistem, psödouridin veya modifiye edilmiş nükleosidlere sahip olan RNA moleküllerini üretmek için geliştirilmiştir. *in vitro* transkripsiyon tepkimeleri gerçekleştirilmiş, burada 4 nükleotid trifosfatının (NTP) 1 veya 2'si, karşılık gelen bir nükleosidi modifiye edilmiş NTP ile ikame edilmiştir. Uzunluğu 0,7-1,9 kb arasında değişen farklı birincil sekanslara sahip ve modifiye edilmiş nükleosidlerin hiçbirisi, 1 veya 2 tipinin birini içeren birkaç RNA seti transkribe edilmiştir. Modifiye edilmiş RNA'lar, modifiye edilmemiş muadillerinden jel elektrofezisini denatüre etmedeki mobiliteleri konusunda ayırt edilemez olmuştur, bu, onların intakt ve başkaca şekilde modifiye edilmemiş olduğunu göstermiştir (Şekil 2A). Bu prosedür T7, SP6 ve T3 faj polimerazlarının herhangi biri ile etkili şekilde çalışmış ve bu yüzden, çok çeşitli RNA polimerazlarına teşmil edilebilir.

Bu bulgular, modifiye edilmiş nükleosidli RNA moleküllerinin üretimi için yeni bir *in vitro* sistem sağlar.

ÖRNEK 3: İN VİTRO OLARAK TRANSKRİBE EDİLMİŞ RNA İNSAN TLR3'ÜNÜ UYARIR VE RNA'NIN İMMÜNOJENİKLİĞİNİ AZALTAN NÜKLEOSİD MODİFİKASYONLARI

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

ugagaguuuucccauuuuauuuuucucacauuuuccucacauuuuaguacugcuagcggaccuacuaaaaauuuuuacac
 ugacuuuuuuuuuagagagauggcuuugcauuuuuccuacaccuuuccaaaggagaaacuuuagaugucuguuuuuuuucaaagca
 aaagugugagagaaaauuuuuucagcaugucucagguugucucgcuggcucuuuaggugaaauaaggugggugugacuguuuc
 ugcagagaguuucucuuuagcagguuggagcauuugggaaccacagguucacaguuuuucucuugaagagacacuuugcug
 ucccgaugaucaaaaccuucuuugugggcaucuuucuuuuuuaaggcacaauugagugccaacaugaagacuuuuuauccaucaa
 ggucucuguauccauuuucgucuuucuaacuuuacaaacagccgaugagcaguuuagacucccaggaucacugucaggaugccga
 ucccagcggccucuuucagccgugguuuuagagugggccgugcccccuuuugggguaaccuuuagauagaagugagcaucuuuc
 uuuuggcaucuuuguagggucagggcacaggacaccuuccuuuauuagagaguccucugucugcugggcugggccgcugccuc
 gugccgaauu (SEQ ID No: 4).

RNA-497-

[illegible]

Tümü TLR3-spesifik siRNA'yı eksprese eden ana 293,293-hTLR7 ve 293-hTLR8 hücreleri ve 293-hTLR9, TLR3-293, 96 kuyucuklu plakalara (5×10^4 hücre/kuyu) ekilmiş ve antibiyotikler olmaksızın kültürlenmiştir. Ertesi gün, hücreler, tarif edilen şekilde R-848'e veya Lipofectin® ile komplekslenmiş RNA'ya maruz bırakılmıştır (Invitrogen) (Kariko et al, 1998, ibid). RNA, bir saat (h) sonra çıkarılmış ve hücreler, ayrıca 7 saat boyunca tam ortamda enkübe edilmiştir. Üst fazlar IL-8 ölçümü için toplanmıştır.

SONUÇLAR

Nükleosidlerin modifikasyonunun TLR'lerin RNA aracılı aktivasyonunu etkileyip etkilemediğini belirlemek için, insan embriyonik böbrek 293 hücreleri, insan TLR3'ü eksprese etmek üzere stabil şekilde dönüştürülmüştür. Hücre hatları Lipofectin® ile kompleksleştirilmiş RNA ile muamele edilmiş ve TLR aktivasyonu interlökin (IL)-8 salımı ile gösterilen şekilde

izlenmiştir. Birkaç farklı RNA molekülü test edilmiştir. modifiye edilmemiş, *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA yüksek bir IL-8 salgılama düzeyi ortaya koymuştur. m⁶A ors²U nükleosid modifikasyonları içeren RNA, tersine, saptanabilir IL-8 salgılamasını indüklememiştir (Şekil 2B). Test edilen diğer nükleosid modifikasyonları (başka bir deyişle m⁵C, m⁵U, Ψ, ve m⁵C/Ψ), TLR3 stimülasyonu üstünde daha küçük bir baskılama etkisine sahip olmuştur (Şekil 2B). "Ψ" psödouridin anlamına gelir.

Bu yüzden, nükleosid modifikasyonları örneğin m⁶As²U, m⁵C, m⁵U, Ψ, TLR3 sinyalleme tarafından aracılık edilen RNA'nın immünojenikliğini azaltır.

ÖRNEK 4: İN VİTRO OLARAK TRANSKRİBE EDİLMİŞ RNA İNSAN TLR7 ve TLR8'i UYARIR VE RNA'NIN İMMÜNOJENİKLİĞİNİ AZALTAN NÜKLEOSİD MODİFİKASYONLARI

293'ün, RNA'nın spesifik TLR reseptörleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesine müdahale eden endojen TLR3'ü eksprese etme olasılığını test etmek için, endojen TLR3'ün ekspresyonu, 293-TLR8 hücre hattından, hücrelerin TLR3-spesifik kısa tokalı (sh)RNA'yı (siRNA olarak da bilinir) eksprese eden bir plazmit ile stabil şekilde transfekte edilmesiyle elimine edilmiştir. Bu hücre hatları çalışma için de kullanılmıştır, çünkü bu, poli(1):(C), LPS, ve CpG-içeren oligodeoksinükleotidlere (ODN'ler) yanıt vermemiştir, bu da, TLR3, TLR4 ve TLR9'un yokluğunu, ancak insan TLR8'in eşgüdüm ligandı olan R-848'e yanıt verdiğini göstermiştir (Şekil 2B). TLR3-hedefli shRNA'yı (293-hTLR8 shRNA-TLR3 hücreleri) eksprese eden 293-hTLR8 hücreleri *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA ile transfekte edilmiş, bunlar, çok miktarda IL-8 salgılamıştır. Tersine, nükleosid modifikasyonlarının çoğunu (m⁵C, m⁵U, Ψ, ve m⁵C/Ψ, s²U) içeren RNA, stimülasyonu ortadan kaldırmıştır (negatif kontrolden, başka bir deyişle boş vektörden daha fazla IL-8 üretimi). m⁶A modifikasyonu, değişken bir etkiye, bazı durumlarda IL-8 salımını ortadan kaldırma ve diğer durumlarda azaltma etkisine sahip olmuştur (Şekil 2B).

Bu Örneğin ve önceki Örneğin sonuçları, (a) doğal fosfodiester internükleotid bağlantılara sahip olan RNA'nın (örneğin *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA) insan TLR3, TLR7 ve TLR8'i stimüle ettiğini; ve (b) nükleosid modifikasyonlarının, örneğin m6A, m5C, m5U, s2U ve Ψ'in, tek başına ve kombinasyon halinde, TLR3, TLR7 ve TLR8 sinyalleme tarafından aracılık edilen RNA'nın immünojenikliğini azalttığını göstermektedir. Ayrıca, bu sonuçlar, spesifik TLR reseptörleri tarafından sinyalizasyonu çalışmak için yeni bir sistem sağlar.

ÖRNEK 5: NÜKLEOSİD MODİFİKASYONLARI TLR7 ve TLR8 SİNYALLEMESİ İLE ARACILANAN ŞEKİLDE RNA'NIN İMMÜNOJENİKLİĞİNİ AZALTIR

Bir sonraki deney grubu, doğal kaynaklardan izole edilen RNA'nın, TLR3, TLR7 ve TLR8'i uyarma kabiliyetini test etmiştir. Farklı memeli türlerinden alınan RNA, TLR3, TLR7 ve TLR8'i ekprese eden 293 hücre hatlarına önceki örnekte tarif edilen şekilde transfekte edilmiştir. Memeli RNA örneklerinden hiçbirisi, negatif kontrol seviyesinin üzerinde IL-8 salgılamasını tetiklememiştir. Aksine, iki farklı *E. coli* kaynağından elde edilen bakteriyel toplam RNA TLR3, TLR7 ve TLR8 ile transfekte edilmiş hücrelerde güçlü IL-8 salgılamasını indüklemiş, ama TLR9 ile indüklememiştir (Şekil 2C). Ne LPS ne de metillenmemiş DNA (CpG ODN) (bakteriyel RNA izolatlardaki potansiyel kontaminantlar) test edilen TLR3, TLR7 veya TLR8'i aktiveleştirmemiştir. İnsan trombositlerinden izole edilen mitokondriyal RNA, insan TLR8'i uyarır, ama TLR3 veya TLR7'yi uyarmaz.

Bu sonuçlar, modifiye edilmemiş *in vitro* olarak transkribe edilmiş ve bakteriyel RNA'nın, TLR3, TLR7 ve TLR8'in aktivatörleri olduğunu ve mitokondril RNA'nın TLR8'i uyardığını göstermektedir. Ayrıca, bu sonuçlar, RNA'nın nükleosid modifikasyonunun TLR3, TLR7 ve TLR8'i uyarma kabiliyetini azalttığı bulgusunu doğrulamaktadır.

ÖRNEK 6: NÜKLEOSİD MODİFİKASYONLARI, RNA'NIN SİTOKİN SEKRESYONUNU VE DC TARAFINDAN AKTİVASYON MARKÖRÜNÜ İNDÜKLEME KABİLİYETİNİ AZALTIR

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

DC stimölasyon testleri

RNA ile enkübasyondan 20 saat sonra, DC'ler CD83-fikoeritrin mAb (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ), HLA-DR-Cy5PE, ve CD80 veya CD86-floresein izotiyosiyanat mAb ile boyanmış ve CellQuest® yazılımı (BD Biosciences) kullanılarak bir FACScalibur® akış sitometresi üstünde analiz edilmiştir. Hücre kültürü üst fazları bir 20 saatlik enkübasyondan sonra hasat edilmiş ve sitokin ELISA'ya tabi tutulmuştur. IL-12 (p70) düzeyleri (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), IFN-α, ve TNF-α (Biosource International, Camarillo, CA) üst fazlarda ELISA ile ölçülmüştür. Kùltürler, üçlü veya dörütlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir örnek, iki kopya halinde ölçülmüştür.

SONUÇLAR

Sonraki deneyler, modifiye edilmiş veya modifiye edilmemiş nükleosidler içeren RNA'nın sitokin ile üretilen MDDC'yi stimüle etme kabiliyetini test etmiştir. Nükleosid modifikasyonları RNA'nın hem GM-CSF/IL-4 ile üretilen MDDC hem de (GM-CSF)/IFN-α ile üretilen MDDC tarafından TNF-α ve IL-12 salgılamasını indükleme kabiliyetini, çoğu durumda, negatif kontrolden daha büyük olmayan seviyelere tekrar üretilebilir bir şekilde azaltmıştır (Şekiller 3A ve B). Sonuçlar aynı baz modifikasyonlu diğer RNA setleri ile benzer olmuş, ancak, farklı birincil sekanslar ve uzunlukları test edilmiştir veya RNA bir 5' başlık yapısı ve/veya 3' ucu poliA kuyruğu eklenmesi ile veya 5' trifosfat parçasının çıkarılması ile ayrıca modifiye edilmiştir. Farklı uzunluk ve sekanstaki RNA'lar, DC'den çeşitli miktarlarda TNF-α indüklemiştir, tipik olarak iki kat farktan azdır (Şekil 3C).

Ardından, test, birincil DC1 ve DC2 üzerinde gerçekleştirilmiştir. Primer monositoid (DC1, BDCA1⁺) ve plazmasitoid (DC2, BDCA4⁺) DC, periferik kandan saflaştırılmıştır. Her iki hücre türü R-848'ya maruz bırakıldığında TNF-α üretmiştir, ama sadece DC1 poli(1):(C)'ye,

çok düşük bir düzeyde yanıt vermiş, bu da, bir DC2'de TLR3 etkinliğinin yokluğunu göstermiştir. *In vitro* transkriptlerin transfeksiyonu, hem DC1 hem de DC2'de TNF- α salgılamasını indüklerken, m5U, Ψ veya s2U ile modifiye edilmiş transkriptler 5 stimüle edici olmamıştır (Şekil 3D). Sitokin ile üretilen DC'nin tersine, RNA'nın m5C ve m6A modifikasyonu, birincil DC1 ve DC2'de stimüle edici kapasitesini azaltmamıştır. m6A/ Ψ çift modifikasyonlu transkriptler stimüle edici olmazken, RNA molekülleri ile tek tipli modifikasyonun (m6A+ Ψ) bir karışımı 10 güçlü bir sitokin indükleyici olmuştur. Bu yüzden, uridin modifikasyonu, primer DC içerisinde bir RNA molekülü üzerinde dominant bir *in cis* baskılayıcı etki uygulamıştır. Bu sonuçlar test edilen tüm donörler arasında tutarlı olmuştur.

Bu bulgular, *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA'nın, DC 15 tarafından sitokin üretimini uyardığını göstermiştir. Ayrıca, DC2, TLR3 veya TLR8'i eksprese etmediğinden ve RNA'nın m5C ve m6A modifikasyonunun TLR7'yi stimüle etme kapasitesini azaltmış olduğundan, bu bulgular, birincil DC'nin m5C- ve m6A-modifiye edilmiş RNA'yı tanıyan ilave bir RNA sinyalleme varlığına 20 sahip olduğunu ve sinyallemesinin, U kalıntılarının modifikasyonu ile inhibe edildiğini göstermektedir.

İlave immünojeniklik göstergeleri olarak, CD80, CD83, CD86 ve MHC sınıf II moleküllerinin hücre yüzeyi ekspresyonu ve TNF- α 'nın salgılanması, RNA-1571 ve modifiye edilmiş versiyonları 25 ile muamele edilmiş MDDC'nin FACS analizi tarafından ölçülmüştür. Psödouridin ve modifiye edilmiş nükleosidli RNA'nın (m5C, m6A, s2U ve m6A/ Ψ) modifikasyonu, bu markörleri (Şekil 4) azaltmış, bu da, önceki bulguları doğrulamıştır.

Özetle, RNA'ların DC'leri olgunlaşmaya ve sitokin salgılamaya indüklemeye kapasitesi, DC'nin alt tipinin yanı sıra RNA'da bulunan nükleosid modifikasyonunun özelliklerine bağlıdır. Artan miktarda değişiklik, RNA'nın immünojenikliğini azaltır.

ÖRNEK 7: RNA ARACILI İMMÜN UYARIMININ BASKILANMASI, RNA'DA 35 BULUNAN MODİFİYE EDİLMİŞ NÜKLEOSİDLERİN SAYISINA ORANTILIDIR

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

İnsan DC'si

Sitokin ile üretilen DC için, monositler kesintili Percoll gradyan santrifüjleme ile PBMC'den saflaştırılmıştır. Düşük yoğunluklu fraksiyonunun (monosit zenginleştirilmiş), CD2, CD16, CD19, ve CD56 için spesifik olan manyetik boncuklar (Dynal, Lake Success, NY) kullanılarak B, T, ve, NK hücreleri tüketilmesi, anti-CD14 (>%95) veya anti-CD11c (>%98) mAb kullanılarak akış sitometrisi tarafından belirlenen şekilde oldukça arıtılmış monositler üretmiştir.

Olgunlaşmamış DC'yi üretmek için, saflaştırılmış monositler, tarif edilen şekilde (Weissman, D et al, 2000. J Immunol 165:4710-4717) monosit türevli DC (MDDC) üretimi için AIM V ortamındaki (Invitrogen) GM-CSF (50 ng/ml) +IL-4 (100 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN) ile takviye edilmiş AIM V serumsuz ortamda (Life Technologies) kültürlenmiştir. DC'ler ayrıca, IFN- α MDDC'yi elde etmek üzere GM-CSF (50 ng/ml) + IFN- α (1,000 U/ml) (R & D Systems) ile muamele yoluyla üretilmiştir (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).

Birincil miyeloid ve plazmasitoid DC'ler, (DC1 ve DC2), sırasıyla BDCA-1 ve BDCA-4 hücresi izolasyon kitleri (Miltenyi Biotec Auburn, CA) kullanılarak periferik kandan elde edilmiştir.

SONUÇLAR

Bu zaman kadar kullanılan nükleosidlerinin çoğu modifiye edilmiş RNA, RNA'daki toplam nükleotidlerin (örneğin tüm uridin bazları) yaklaşık %25'inde meydana gelen bir tip modifikasyonunu içermiştir. Burada kullanılan koşullar altında immünojenikliği azaltmak için yeterli olan belirli modifiye nükleosidlerin minimum frekansını tanımlamak için, sınırlı sayıda değiştirilmiş nükleosid içeren RNA molekülleri üretilmiştir. Birinci deney setinde, RNA, m6A, Ψ veya m5C'nin karşılık gelen modifiye edilmemiş NTP'lere çeşitli oranlarının varlığında *in vitro*

transkribe edilmiştir. Modifiye nükleosit fosfatların RNA'ya dahil edilme miktarının, transkripsiyon reaksiyonunda bulunan oranla orantılı olması beklenmiştir, zira T7 RNAP ile elde edilen RNA verimleri, enzimin, m6A, Ψ veya m5C'nin NTP'lerinin neredeyse temel NTP'ler kadar verimli olduğunu göstermiştir. Bu beklentiyi doğrulamak için, bir 50:50 oranında IITP:Ψ ile transkribe edilmiş RNA sindirilmiş ve neredeyse bir 50:50 oranında UMP ve Ψ içerdiği bulunmuştur (Şekil 5A).

MDDC'ye transfekte edilmiş, artan modifiye edilmiş nükleosid içerikli RNA molekülleri ve TNF-α salgılaması değerlendirilmiştir. Her bir modifikasyon (m6A, Ψ ve m5C), değiştirilmiş bazların oranı ile orantılı olarak TNF-α salgılamasını inhibe etmiştir. En küçük miktarlarda test edilen modifiye edilmiş bazlar dahi (%0,2-0,4, 1571 nt'lik molekül başına 3-6 modifiye edilmiş nükleoside karşılık gelen), sitokin sekresyonunu ölçülebilir şekilde inhibe etmek için yeterli olmuştur (Şekil 5B). %1,7-3,2 modifiye edilmiş nükleosid düzeylerine sahip olan RNA (14-29 modifikasyonlar başına molekül) TNF-α ekspresyonu indüklenmesinde %50'lik bir azalma sergilemiştir. TLR'yi eksprese eden 293 hücrelerinde, daha yüksek bir yüzde (%2,5) modifiye edilmiş nükleosid içeriği RNA- aracılı sinyalleme olaylarını inhibe etmek için gerekli olmuştur.

Bu yüzden, psödouridin ve modifiye edilmiş nükleosidler, kalıntıların küçük bir kısmı olarak mevcut olsa bile RNA moleküllerinin immünojenikliğini azaltır.

İlave deneylerde, fosfodiester inter-nükleotid bağlantılı 21-mer oligoribonükleotidleri (ORN) sentezlenmiştir, burada modifiye edilmiş nükleosidler (m5C, Ψ veya 2'-O-metil-U [Um]) özel bir pozisyonda ikame edilmiştir (Şekil 6A). Modifiye edilmemiş ORN, TNF-α salgılamasını indüklerken, bu etki, tek bir nükleosid modifikasyonunun varlığına ortadan kaldırılmıştır (Şekil 6B). TLR3-hedefli siRNA'yı eksprese eden TLR-7 ve TLR-8 ile dönüştürülmüş 293 hücreleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Yukarıdaki sonuçlar, MDDC içindeki TNF- α mRNA düzeylerinin, Northern Blot testiyle, yukarıdaki hem 21-mer ORN (ORN1) hem de 31-mer *in vitro* olarak sentezlenmiş transkriptleri kullanılarak (ORN5 ve ORN6) ölçülmesiyle doğrulanmıştır. Sinyali yükseltmek için, seçilen mRNA'ların bozulmasını engelleyen sikloheksimid, Şekilde gösterildiği gibi bazı örneklerle eklenmiştir. Modifiye edilmemiş ODN, TNF- α mRNA düzeylerini arttırırken, tek bir modifiye edilmiş nükleosid içeren ORN'ler, anlamlı ölçüde daha az stimüle edici olmuştur; ORN2-Um, TNF- α üretiminde en büyük düşüşü sergilemiştir (Şekil 6C).

Benzer sonuçlar, fare makrofaj benzeri RAW hücrelerinde ve insan DC'sinde gözlenmiştir.

Özetle, modifikasyonların her biri (m6A, m5C, m5U, s2U, Ψ ve 2'-O-metil) kalıntıların küçük bir kısmı olarak mevcut olsa bile, RNA aracılı immün uyarımı bastırmıştır. Modifiye nükleosidlerin oranı arttığında, ilave baskılama gözlemlenmiştir.

ÖRNEK 8: RNA'NIN PSÖDOURİDİN MODİFİKASYONU, İMMÜNOJENİKLİĞİNİ İN VİVO AZALTIR

RNA'nın *in vivo* immünojenikliği üzerinde psödouridin modifikasyonunun etkisini belirlemek için, 0,25 μ g RNA, Lipofectin®'e kompleksleştirilmiş ve farelere intra-trakeal olarak enjekte edilmiş, fareler, 24 saat sonra kanatılmış ve dolaşımdaki TNF- α ve IFN- α düzeyleri serum örneklerinden test edilmiştir. Başlıklı, psödouridin ile modifiye edilmiş mRNA, modifiye edilmemiş mRNA tarafından açığa çıkarıldan anlamlı ölçüde daha az TNF- α ve IFN- α mRNA indüklemiştir (Şekil 7A-B).

Bu sonuçlar, ayrıca psödouridin ile modifiye edilmiş mRNA, modifiye edilmemiş RNA'dan anlamlı şekilde daha az immünojeniktir.

ÖRNEK 9: PSÖDOURİDİN İÇEREN RNA, PRK'YI DÜŞÜK AKTİVE ETME KABİLİYETİ SERGİLER

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

PKR fosforilasyon testleri

Aktif PKR agaroz bölüntüleri (Upstate) magnezyum/ATP kokteyli

(Upstate), kinaz tamponu ve [γ - ^{32} P]ATP karışımı ve RNA molekülleri varlığında 30 dakika süreyle 30 °C'de enkübe edilmiştir. Modifiye edilmemiş RNA ve nükleosid modifikasyonlu RNA (m⁵C, psödouridin, m⁶A, m⁵U) ve dsRNA test edilmiştir. İnsan rekombinant eIF2 α (BioSource) ilave edilmiş ve örnekler ayrıca 5 dakika süreyle, 30 °C'de enkübe edilmiştir. Tepkimeler, NuPage LDS örnek tamponuna indirgeme ayırıcının (Invitrogen) eklenmesi ile durdurulmuş, 10 dakika süreyle, 70 °C denatüre edilmiş, ve %10 PAGE üstünde analiz edilmiştir. Jeller kurutulmuş ve filme maruz bırakılmıştır. Heparin (1 U/ μ I), bir PKR aktivatörü, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

SONUÇLAR

Psödouridin içeren mRNA'nın dsRNA-bağımlı protein kinazını (PKR) aktive edip etmediğini belirlemek için, rekombinant insan PKR ve substratı, eIF2 α kullanılarak (ökaryotik başlatma faktörü 2 alfa) başlıklı, renilla-kodlayan mRNA (0,5 ve 0,05 ng/ μ I) varlığında *in vitro* fosforilasyon testleri gerçekleştirilmiştir. psödouridin (Ψ) içeren mRNA, hem PKR self-fosforilasyonu hem de eIF2 α fosforilasyonunun yokluğu ile tespit edilen şekilde PKR'yı aktive etmezken, nükleosid modifikasyonsuz RNA ve m⁵C modifikasyonlu mRNA, PKR'yi aktive etmiştir (Şekil 8). Bu yüzden, psödouridin modifikasyonu RNA immünojenikliğini azaltır.

ÖRNEK 10: PSÖDOURIDIN VE m⁵C İÇEREN RNA'DAN PROTEİNLERİN GELİŞMİŞ İN VITRO TRANSLASYONU

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

Tavşan retikülosit lizatındaki mRNA'nın in vitro translasyonu

In vitro-translasyon tavşan retikülosit lizatında yapılmıştır (Promega, Madison WI). Bir 9- μ I lizat bölüntüsü 1 μ I (1 μ g) mRNA ile takviye edilmiş ve 60 dakika süreyle 30 °C'de enkübe edilmiştir. Bir μ I'lik bölüntü ateş böceği ve renilla test sistemleri (Promega, Madison WI) ve bir 10 sn'lik ölçme süresiyle bir LUMAT LB 950 luminometre (Berthold/EG&G Wallac, Gaithersburg, MD) kullanılarak analiz için çıkarılmıştır.

SONUÇLAR

Psödouridin modifikasyonunun *in vitro* RNA translasyon verimi

üstündeki etkisini belirlemek için ateş böceği lusiferazını kodlayan psödouridin ile modifiye edilmiş başlıksız mRNA (0,1 µg/µl) tavşan retikülosit lizatında 30°C'de 1 saat süreyle enkübe edilmiş ve lusiferaz etkinliği belirlenmiştir.

5 Psödouridin içeren mRNA, tavşan retikülosit lizatlarındaki psödouridinsiz RNA'dan 2 kat daha verimli şekilde transle edilmiş, ama buğday ekstraktı veya *E coli* lizatında edilmemiştir (Şekil 9), bu, psödouridin modifikasyonunun RNA translasyon verimini arttırdığını göstermektedir. Benzer sonuçlar, m⁵C-
10 modifiye edilmiş RNA ile elde edilmiştir. Bir poliA kuyruğu psödoouridin içeren mRNA'ya eklendiğinde, translasyon veriminde ilave bir 10 kat artış gözlemlenmiştir. (Örnek 10).

Bu yüzden, psödouridin ve m⁵C modifikasyonu, RNA translasyon verimini arttırır ve bir poliA kuyruğunun psödouridin-içeren
15 mRNA'ya ilavesi de translasyon verimini arttırır.

ÖRNEK 11: KÜLTÜRLENEN HÜCRELERDEKİ PSÖDOURİDİN İÇEREN RNA'DAN PROTEİNLERİN GELİŞMİŞ TRANSLASYONU

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

Hücrelerdeki translasyon deneyleri

20 Plakalara transfeksiyondan 1 gün önce, kuyu başına 96 kuyuya 5 x 10⁴ hücre ekilmiştir. Lipofectin®-mRNA kompleksleri monte edilmiş ve kültür ortamını (0,2 pg mRNA- 0.8 µg lipofektin, kuyu başına 50 µl içinde) çıkardıktan sonra direkt olarak hücre monokatmanlarına ilave edilmiştir. Hücreler transfeksiyon
25 karışımı ile 37°C'de 1 saat süreyle, %5 CO₂ enkübatöründe enkübe edilmiş, ardından karışım, %10 FCS içeren taze, önceden ısıtılmış ortam ile değiştirilmiş, ardından hücreler önceki örnekte tarif edilen şekilde analiz edilmiştir.

SONUÇLAR

30 Psödouridin modifikasyonunun kültürlenen hücrelerdeki RNA translasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için, 293 hücreleri, in vitro olarak transkribe edilmiş, nükleosidi modifiye edilmiş, raportör protein renillayı kodlayan başlıklı mRNA ile transfekte edilmiştir. Hücreler transfeksiyonun başlamasından 3 saat sonra
35 eritilmiş ve renilla seviyeleri enzimatik analizlerle

ölçülmüştür. 293 hücrelerinde, psödouridin- ve m5C-modifiye edilmiş DNA, modifiye edilmemiş mRNA'dan sırasıyla yaklaşık 10 kat ve 4 kat daha verimli bir şekilde transle edilmiştir (Şekil 10A).

Ardından, deney, primer, kemik iliği kaynaklı fare DC ile yapılmış, bu durumda transfeksiyondan 3 saat ve 8 saat sonra hücreler lize edilmiştir. RNA içeren psödouridin modifikasyonu, değiştirilmemiş RNA'dan 15-30 kat daha verimli bir şekilde transle edilmiştir (Şekil 10B).

Benzer ekspresyon sonuçları insan DC'si ve diğer birincil hücreler ve, CHO ve fare makrofaj benzeri RAW hücreleri dahil olmak üzere yerleşmiş hücre hatları kullanılarak elde edilmiştir. Tüm hücre türlerinde, psödouridin modifikasyonu test edilen modifikasyonların en büyük gelişimini sağlamıştır.

Dolayısıyla, psödouridin modifikasyonu, RNA translasyon verimini, farklı tiplerde hem profesyonel antijen sunan hücreler hem de profesyonel olmayan antijen sunan hücreler dahil olmak üzere test edilen tüm hücre türlerinde arttırmıştır, bu, psödouridin modifikasyonunun RNA translasyonu verimini arttırdığının ilave bir kanıtıdır.

ÖRNEK 12: 5' VE 3' ELEMANLARI, MEMELİ HÜCRELERİNDEKİ ΨmRNA'NIN TRANSLASYONUNU DAHA DA GELİŞTİRİR

Psödouridin modifikasyonu tarafından translasyonun geliştirilmesi üzerindeki ilave RNA yapısal elemanlarının etkisini test etmek amacıyla, bir dizi ateş böceği lusiferazı kodlayan ΨmRNA, aşağıdaki modifikasyonların kombinasyonunu içerecek şekilde sentezlenmiştir: 1) bir benzersiz 5' transle edilmemiş sekans (TEV, bir başlık bağımsız translasyonel arttırıcı), 2) başlık ve 3) poliA kuyruğu. Bu modifikasyonların TmRNA'nın veya geleneksel mRNA'nın translasyonunu arttırma kabiliyeti değerlendirilmiştir (Şekil 11 A). Bu yapısal elemanlar, konvansiyonel ve TmRNA'nın translasyonel verimliliğini aditif olarak arttırmış, TmRNA, tüm yapılardan daha fazla protein üretimi sergilemiştir.

En etkili ateş böceği lusiferazı TmRNA yapısı, capTEVIucA50

(TEV, başlık ve bir genişletilmiş poli(A) kuyruğunun içeren) protein ekspresyonu kabiliyeti, daha sonra 24 saat boyunca 293 hücrelerinde incelenmiştir (Şekil 11B). Ψ mRNA, test edilen her bir zaman noktasında daha fazla protein üretmiştir ve eşdeğer geleneksel mRNA yapılarından daha kalıcı lusiferaz ekspresyonu sağlamıştır, bu, Ψ -modifikasyonlarının mRNA'yı stabilize ettiğini göstermiştir.

mRNA'nın Ψ -modifikasyonu, memeli hücrelerinde *in situ* translasyon verimini arttırır, uzatılmış poliA kuyruklu veya kuyruksuz (A_n) ve β -galaktosidazı (lacZ) kodlayan caplacZ- Ψ mRNA yapıları üretilmiş ve 293 hücrelerini transfekte etmek için kullanılmıştır. mRNA aktarımından 24 saat sonra, karşılık gelen kontrol (konvansiyonel) transkriptlerine kıyasla β -galaktosidaz düzeylerinde X-gal görselleştirme ile, hem caplacZ hem de caplacZ- A_n 'de anlamlı artışlar saptanmıştır (Şekil 11C). Bu trend, ya tespit edilebilir seviyelerde β -galaktosidaz eksprese eden hücre sayısı ya da münferit hücrelerdeki sinyal büyüklüğü analiz edildiğinde gözlemlenmiştir.

ÖRNEK 13: PSÖDOURİDİN İÇEREN RNA'DAN İN VİVO PROTEİNLERİN İN VİVO GELİŞMİŞ TRANSLASYONU

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

Intraserebral RNA enjeksiyonları

Tüm hayvan çalışmaları, Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için NIH Kılavuzuna uygundur ve Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kumitesi tarafından onaylanır. Erkek Wistar fareleri (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), intraperitoneal sodyum pentobarbital enjeksiyonu (60 mg/kg vücut ağırlığı) ile anesteziyenmiştir. Başlar stereotaksik bir çerçeveye yerleştirildi ve eşit aralıklarla konumlandırılan sekiz adet 1,5 mm çaplı çapak delikleri bilateral olarak yapılmıştır [bregmaya göre koordinatları: anterior/posterior +3, 0, -3, -6 mm; lateral $\pm 2,5$ mm] dura intakt kalmıştır. İntra-serebral enjeksiyonlar, bir 30 dereceli, 1 inçlik steril iğneli (Beckton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) büyük bir prob tutucu ve stereotaktik koluna sabitlenmiş bir 25 μ l enjektör (Hamilton,

Reno, NV) kullanılarak yapılmıştır. Şırıngadaki hava boşluğunu önlemek için, iğne takılmadan önce iğne göbeği 55 µI kompleksi ile doldurulmuş ve numunenin geri kalanı iğne yoluyla çekilmiştir. Enjeksiyon derinliği (2 mm) dura yüzeyine göre belirlenmiş ve 4 µI kompleks (32 ng mRNA) tek, hızlı bir bolus infüzyonu olarak uygulanmıştır. 3 saat (h) sonra, sıçanlar halotan ile ötenazi edilmiş ve beyinler soğutulmuş fosfat tamponlu salin içerisine alınmıştır.

RNA'nın fare kuyruk venine enjeksiyonu

Dişi BALB/c farelerinin kuyruk damarlarına (Charles River Laboratories) 60 µI Lipofectin® ile kompleksleştirilmiş RNA (0,26 µg) ile (bolus) enjekte edilmiştir. Organlar alınmış ve bir havan kullanılarak mikrosantrifüj tüplerindeki lusiferaz veya Renilla lizis tamponunda homojenleştirilmiştir. Homojenatlar santrifüjlenmiş ve üst fazlar aktivite açısından analiz edilmiştir.

RNA'nın akciğere iletimi

Dişi BALB/c fareleri, ketamin (100 mg/kg) ve ksilasın (20 mg/kg) kullanılarak anesteziyenmiştir. Trakeanın bitişiğindeki deride küçük insizyonlar yapılmıştır. Trakea ortaya çıktığında, 50 µI Lipofectin® ile kompleksleştirilmiş RNA (0,2 µg) akciğere doğru trakea içine dahil edilmiştir. İnsizyonlar kapatılmış ve hayvanların iyileşmesine izin verilmiştir. RNA verilmesinden 3 saat sonra, fareler servikal dislokasyon ile öldürülmüş ve akciğerler çıkarılmış, lusiferaz veya Renilla lizis tamponunda (250 µI) homojenize edilmiş ve aktivite açısından test edilmiştir. Farklı bir hayvan grubunda kuyruk damarlarından kan örnekleri (100 µI/hayvan) toplanmış, pıhtılaşmış ve santrifüjlenmiştir. Serum fraksiyonları, fareye özgü antikörler kullanılarak, yukarıdaki Örneklerde tarif edildiği gibi ELISA ile TNF ve IFNα seviyelerini belirlemek için kullanılmıştır.

SONUÇLAR

Psödouridin modifikasyonunun etkisini belirlemek için RNA translasyonu üzerinde *in vivo* etkisini belirlemek için sıçan beyni kortekslerinin her bir hemisferine, ya başlıklı, renilla-

psödouridin modifiyeli RNA'yı kodlayan veya modifiye edilmemiş RNA enjekte edilmiş ve RNA translasyonu ölçülmüştür. Psödouridin ile modifiye edilmiş RNA, modifiye edilmemiş RNA'dan önemli ölçüde daha verimli bir şekilde transle edilmiştir (Şekil 12A).

5 Ardından, farelerde ekspresyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ateş böceği lusiferazı kodlayan mRNA'lar, çünkü hiçbir endojen memeli enzimi, tespitine müdahale etmez. Transkriptler (modifiye edilmemiş ve ΨmRNA) başlık, TEV (capTEVA₅₀) ile ve genişletilmiş (-200 nt) poli(A) kuyrukları ile
10 oluşturulmuştur. Lipofectin® ile kompleksleştirilmiş 0,25 µg RNA, farelere enjekte edilmiştir (intravenöz (i.v.) kuyruk veni). Optimum ölçüm alanını belirlemek için lusiferaz aktivitesi için çeşitli organlar araştırılmıştır. 0,3 µg capTEVIucAn ΨmRNA'nın uygulanması, dalakta, yüksek lusiferaz
15 ekspresyonu ve kemik iliğinde orta dereceli ekspresyonunu indüklemiş, ama akciğer, karaciğer, kalp, böbrek veya beyinde az ekspresyon indüklemiştir (Şekil 12B). Sonraki çalışmalarda, dalaklar çalışılmıştır.

Geleneksel ve TmRNA'nın translasyon verimliliği (0,015 mg/kg;
20 0,3 µg/hayvan, intravenöz olarak verilen) daha sonra zaman serisi deneylerinde karşılaştırılmıştır. Lusiferaz aktivitesi 1 saatte kolayca tespit edilmiş, 4 saatte pik yapmış ve konvansiyonel veya TmRNA'nın uygulanmasının ardından 24 saat itibariyle azalmış ancak her zaman TmRNA verilen hayvanlarda
25 büyük ölçüde daha büyük olmuştur (Şekil 12C, sol panel). 24 saat itibariyle, sadece TmRNA enjekte edilmiş hayvanlar saptanabilir splenik lusiferaz etkinliği (zemindeğerin 4 kat yukarısında) sergilemiştir. Benzer bir görelî ekspresyon biçimi (modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş mRNA arasında), *Renilla*
30 lusiferazını kodlayan mRNA'lar (Ψ modifikasyonlu veya modifikasyonsuz capRen) ateşböceği lusiferazı yerine hayvanlara enjekte edildiğinde veya izole edilmiş fare splenositleri kültürde mRNA'ya maruz kaldığında elde edilmiştir.

Bir sonraki deneyde, 0,25 µg mRNA- Lipofectin® fare
35 akciğerlerine intra-trakeal enjeksiyonla uygulanmıştır.

Başlıklı, psödouridin-modifiye edilmiş RNA, psödouridin modifikasyonsuz başlıklı RNA'dan daha etkili şekilde transle edilmiştir (Şekil 12D).

Dolayısıyla, psödouridin modifikasyonu *in vitro* kültürlenен hücrelerde ve *in vivo*- çoklu hayvan modellerinde ve çoklu uygulama yollarıyla RNA translasyon verimi arttırır, bu, RNA translasyonunu arttırmanın bir aracı olarak yaygın olarak kullanıldığını göstermektedir.

ÖRNEK 14: PSÖDOURİDİN MODİFİKASYONU RNA STABİLİTESİNİ *IN VIVO*

OLARAK ARTTIRIR

Önceki Örnekten gelen hayvanlarda enjeksiyondan sonra 1 ve 4 saat sonra splenik RNA'nın Northern analizleri uygulanan mRNA'ların sağlam ve kısmen bozulmuş formlarında olduklarını ve kolayca tespit edilebildiğini ortaya koymuştur (Şekil 12C, sağ panel). Aksine, 24 saatte, modifiye edilmemiş capTEVIucAn mRNA tespit seviyesinin altında olurken capTEVIucAn TmRNA, kısmi olarak bozunmuş olsa da, hâlâ açıkça saptanabilir olmuştur. Bu yüzden, TmRNA, kontrol mRNA'sından daha stabil şekilde *in vivo* muhafaza edilir.

In vivo protein üretiminin, kantitatif olarak intravenöz yolla verilen mRNA konsantrasyonuna bağlı olup, olmadığını test etmek için, mRNA'lar farelere 0,015-0,150 mg/kg'de (0,3-3,0 µg capTEVIucAn, hayvan başına) uygulanmış ve dalaklar yukarıda tarif edildiği gibi 6 saat sonra analiz edilmiştir. Lusiferaz ekspresyonu, enjekte edilen RNA miktarı ve at her bir konsantrasyonu ile kantitatif olarak ilişkilidir (Şekil 13).

Bu bulgular Örnek 12'nin sonuçlarını doğrular, bu da, TmRNA'nın, modifiye edilmemiş RNA'dan daha stabil olduğunu gösterir.

Ayrıca Ψ-mRNA'nın immünojenikliği, modifiye edilmemiş RNA'dan, burada yukarıda tarif edilen şekilde daha az olmuştur (Şekil 7 ve Şekil 12C, sağ panel).

Örnek 13-14'ü özetlemek için, m-mRNA'nın geleneksel mRNA ile karşılaştırıldığında *in vitro* gözlemlenen 3 avantajı (gelişmiş translasyon, arttırılmış stabilite ve indirgenmiş

immünojeniklik), ayrıca *in vivo* olarak gözlemlenir.

ÖRNEK 15: SOLUNUM SİSTEMİ YOLUYLA İLETİLEN Ψ mRNA, İNTRAVENÖZ OLARAK UYGULANAN mRNA'YA BENZER ŞEKİLDE DAVRANIR

5 TmRNA'nın inhalasyon yoluyla iletim yeteneğini test etmek için ateşböceği lusiferazını kodlayan Lipofectin® veya PEI ile kompleksleştirilmiş mRNA'lar intratrakeal yolla farelere verilmiş, burada bir iğne, trakeanın içine yerleştirilmiş ve mRNA çözeltisi akciğerlere püskürtülmüştür. İntravenöz iletme
10 benzer şekilde, intravenöz yollara kıyasla, intratrakeal yolla önemli ölçüde daha az protein üretilmiş olsa da, modifiye edilmemiş mRNA (Şekil 14) ile karşılaştırıldığında TmRNA ile anlamlı ölçüde daha büyük lusiferaz ekspresyonu gözlemlenmiştir. İntratrakeal yolla uygulanan modifiye edilmemiş mRNA, araç
15 kontrolleri ile karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek enflamatuvar sitokin (IFN- α ve TNF- α) konsantrasyonları ile ilişkilendirilirken, TmRNA ilişkilendirilmemiştir (Şekil 15).

Bu yüzden, TmRNA, doğal immün yanıtı aktive etmeden inhalasyon yoluyla sağlanabilir.

ÖRNEK 16: EPO- Ψ mRNA'NIN 293 HÜCRELERİNE İLETİMİ

TmRNA, insan EPO cDNA'sını içeren bir plazmitten üretilmiştir. 0,25 μ g EPO- Ψ mRNA, 10^6 kültürlenmiş 293 hücrelerine transfekte edilmiş, 600 mU/ml'den daha büyük EPO proteini üretilmiştir. Bu
25 yüzden, mevcut buluşun modifiye edilmiş RNA molekülleri, hücrelere rekombinant proteinlerin iletilmesinde etkilidirler.

ÖRNEK 17: GELİŞTİRİLMİŞ EPO KODLAYAN Ψ mRNA YAPILARININ HAZIRLANMASI

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

EPO kodlama sekansı, EPO- Ψ mRNA üretimi için şablonlar olarak
30 kullanılan 2 yeni plazmid, pTEV- EPO ve pT7TS-EPO üretmek için kısıtlama enzimi teknikleri kullanılarak klonlanır. EPO- Ψ mRNA'lar, T7 RNA polimerazı (RNAP) kullanılarak, nükleosidler ekimolar (7,5 mM) konsantrasyonlarda dahil ederek *in vitro* transkripsiyon ile bu şablonlardan (MessageMachine® ve
35 MegaScript® kitleri; Ambion) üretilir. Nükleosid

modifikasyonlarını dahil etmek için, Ψ trifosfat (TriLink, San Diego, CA), transkripsiyon tepkimesinde UTP'nin yerini alır. Ψ mRNA'nın başlıklanmasını sağlamak için, bir tersinmez başlık analoğu, 6 mM 3'-O-Me-m7GpppG (New England BioLabs, Beverly, MA) da yer almıştır. Ψ mRNA, bir -1,5 μ g/ μ l RNA'nın, 30 °C'de 3 ila 24 saat süreyle karıştırılmış 5 mM ATP, ve 60 U/ μ l maya poli(A) polimeraz (USB, Cleveland, OH) ile tepkimesinde poli(A) kuyruklanır. Ψ mRNA'ların kalitesi, agaroz jel elektrofizisini denatüre etme yoluyla değerlendirilir. Limulus Amebosit Lisat jel pıhtı tahlili kullanılarak 3 pg/ml'lik bir duyarlılık ile Limulus Amebosit Lysate jel pıhtı testi kullanılarak mRNA preparatlarında LPS için tahliller de yapılır.

SONUÇLAR

EPO- Ψ mRNA'nın proksimal 3'-transle edilmemiş bölgesi (3'UTR), yeni EPO mRNA'dan -90 nt uzunluğundaki pirimidin bakımından zengin stabilize edici elemanı korur, bu, EPO mRNA'yı yaygın bir protein olan eritropoietin mRNA bağlayıcı proteinle (ERBP) spesifik bir ilişki kurarak stabilize eder. EPO- Ψ mRNA'nın kararlılığını en üst düzeye çıkarmak için, transkribe edilen mRNA'nın stabilitesini ve translasyon verimliliğini arttırmak için EPO plazmidine 2 değişiklik dahil edilir: 1) tütün etch virüsünün (TEV) A5'UTR sekansı, pTEV-EPO üretmek için EPO kodlama sekansının yukarısına dahil edilir. 2) bir plazmit, pT7TS-EPO üretilir, burada EPO cDNA, β -globin 5' ve 3'UTR'lere karşılık gelen sekanslarla kuşatılmıştır.

Ayrıca, bu plazmid şablonlarından Ψ mRNA üretimi sırasındaki poli(A) kuyruğunun uzunluğu sırasında Ψ mRNA üretimi, poli(A) polimeraz reaksiyonunun enkübasyon süresi arttırılarak uzatılır. Daha uzun poli(A) kuyruğu, '['mRNA'nın translasyon sırasında bozunduğu hızı azaltır.

Bu iyileştirmeler in vivo olarak daha iyi çeviri verimliliği sağlar, bu yüzden nihai ürünün terapötik dozunu minimize eder.

ÖRNEK 18: EPO mRNA YAPILARINDAN PROTEİN ÜRETİMİNİN IN VITRO

ANALİZİ

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

Memeli hücrelerinin hazırlanması.

İnsan embriyonik böbrek 293 hücreleri (ATCC) glutamin (Invitrogen) ve %10 FCS (Hyclone, Ogden, UT) (tam ortam) takviyeli DMEM içine yayılır. Lökoferez örnekleri, HIV bulaşmamış gönüllülerden IRB onaylı bir protokolle elde edilir. DC'ler, yukarıda tarif edilen şekilde ve AIM V Medium® (Invitrogen) içinde GM-CSF (50 ng/ml) + IL-4 (100 ng/ml) (R & D Systems) ile üretilir.

Mürin dalak hücreleri ve DC yayınlanmış prosedürler yoluyla elde edilir. Kısaca, BALB/c farelerinden alınan dalaklar, aseptikal olarak çıkarılır ve tam ortamda forsepsle kıyılır. Doku parçaları yerçekimi tarafından sediment haline getirilir ve tek hücre süspansiyonu AKC lizis tamponu (Sigma) ile yıkanır ve lizlenir. Murin DC'ler, femurlardan ve 6-9 haftalık BALB/c farelerinin tibialarından toplanan kemik iliği hücrelerinden elde edilir. Hücreler %10 FCS (Invitrogen) ve 50 ng/ml muGM-CSF (R&D) içeren DMEM'de kültürlenir ve 7'nci günde kullanılır.

Hücrelerin transfeksiyonu ve EPO ve pro-enflamatuvar sitokinlerin saptanması

Transfeksiyonlar, fosfat tamponu varlığında splenik ve *in vitro* hücre ekspresyonu için etkili bir dağıtım yöntemi olan Lipofectin ile gerçekleştirilir. EPO-ΨmRNA (0,25 µg/kuyu; 100.000 hücre) 1 saat boyunca her bir hücre tipine üç kopya halinde eklenir ve üst faz taze ortamla değiştirilir. 24 saat sonra, üst faz, EPO, IFN-α veya β, ve TNF-α'nın ELISA ölçümü için toplanır.

SONUÇLAR

Benzersiz UTR'lerin ΨmRNA çevrimsel etkinliğinin arttırılması üzerindeki etkisini değerlendirmek için,, her bir geliştirmeyi (5' TEV elemanı, β-globin 5' ve 3'UTR'ler) içeren veya içermeyen uzun poli(A) kuyruklu EPO-ΨmRNA, *in vitro* protein üretimi ve *in vitro* immün aktivasyonu açısından test edilir. EPO konvansiyonel nükleosidi mRNA kontroller olarak kullanılmıştır. Her mRNA'dan protein üretiminin etkinliği, memeli hücre hatları, (HEK293, CHO), insan ve murin birincil DC'lerinde ve her bir mRNA için

dalak hücrelerinde değerlendirilir. Tüm hücrelerde üretilen toplam EPO ve primer hücrelerde immünojenisite (süpernatant ile ilişkili proenflamatuar sitokinler) ölçümü değerlendirilir. Yüksek EPO üretiminin (1 veya daha fazla hücre tipinde) ve düşük sitokin açığa çıkmasının optimum kombinasyonunu gösteren mRNA yapısı sonraki çalışmalarda kullanılır. EPO-ΨmRNA'nın 5' ve 3'UTR'leri ve daha uzun poli(A) kuyrukları, transkripsiyon verimliliğinde tahmini 2-10 kat artış sağlar, immünojeniklikte ise bir artış olmaz.

10 **ÖRNEK 19: EPO ÜRETİMİNİN KARAKTERİZASYONU VE EPO-ΨmRNA'YA IN VIVO BİYOLOJİK YANIT**

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

EPO-ΨmRNA'nın farelere uygulanması.

Burada tarif edilen tüm hayvan çalışmaları, Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı için NIH Kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilir ve Pennsylvania Üniversitesi Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından onaylanır. Dişi BALB/c fareleri (deneysel koşul başına n = 5; 6 hafta, 18-23 g; Charles River Laboratuvarları), bir N₂O ve O₂ (70:30) karışımındaki %3,5 halotan kullanılarak anestezi edilir, ardından halotan %1'e düşürülür ve anestezi bir burun maskesi kullanılarak sürdürülür. Hayvan vücut sıcaklıkları işlem boyunca 37 °C'ye ısıtılmış bir ısıtma yastığı kullanılarak korunur. EPO-ΨmRNA-lipofektin kompleksleri (çeşitli miktarlarda nükleik asit ile 1 µl lipofektini 60 µl nihai hacimde karıştırarak oluşturulur, lateral kuyruk venine enjekte edilir. Kan örnekleri, mRNA enjeksiyonundan sonra 3 gün boyunca günde 3 kez, doz yanıtı çalışmalarında 1 optimal zaman noktasında ve retikülositoz çalışmalarında günde 2-6 gün arasında toplanır.

Retikülositlerin akış sitometrisi ile belirlenmesi.

Tam kan örnekleri, Retic-COUNT reaktifi (BD Diagnostics) ve bir FACScan akış sitometresinde elde edilen veri olayları kullanılarak lekelenir. Kırmızı kan hücreleri (RBC'ler) ileri ve yan saçılma özellikleri ile seçilir ve Thiazole Orange'ın alımı bakımından test edilir. Retic-COUNT reaktifi ile boyanmış

hücreler, floresans ile tespit edilir ve retikülositler toplam RBC'nin yüzdesi olarak ifade edilir. Örnek başına en az 50.000 olay sayılmıştır.

SONUÇLAR

5 EPO'yu kodlayan mRNA'ya yanıt olarak biyolojik olarak işlevsel insan EPO proteini (hEPO) üretimini optimize etmek için, aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilir:

10 Tek bir EPO-ΨmRNA enjeksiyonundan sonra EPO üretiminin zaman seyri. İntravenöz 1 µg PO-ΨmRNA uygulamasından sonra, serumdaki EPO proteininin yarılanma ömrünü belirlemek için ELISA yoluyla EPO-ΨmRNA uygulamasından sonraki 1-96 saat itibariyle seri olarak hEPO ölçülür. Bu yarılanma ömrü, hem EPO proteininin yarı ömrünün hem de EPO-ΨmRNA'nın fonksiyonel yarılanma ömrünün bir çarpımıdır. EPO ΨmRNA uygulamasından sonra EPO proteini ölçmek 15 için elde edilen optimum zaman noktası, sonraki çalışmalarda kullanılır.

Tek bir EPO-ΨmRNA enjeksiyonundan sonra EPO üretiminin doz 20 yanıtı. Üretilen EPO proteini ve uygulanan EPO-ΨmRNA miktarı arasındaki korelasyonu belirlemek için, EPO- ΨmRNA'nın artan konsantrasyonları (0,01 ila 1 µg/hayvan) uygulanır ve EPO optimum zaman noktasında ölçülecektir.

HES üretimi ile retikülositoz arasındaki ilişki. EPO-ΨmRNA'nın EPO aktivitesinin biyolojik bir korelasyonu üzerindeki etkisini ölçmek amacıyla, kandaki retikülosit sıklığını belirlemek için 25 akış sitometrisi kullanılır. Akış sitometrisi, < %3'lük bir değişim katsayısına sahiptir. Fareler tek bir doz EPO-ΨmRNA alırlar ve 2-6 günlerinden itibaren farelerden kan alınır. EPO-ΨmRNA dozu ile retikülosit sıklığı arasındaki ilişki daha sonra maksimal retikülositoz zaman noktasında değerlendirilir. 30 Retikülosit sayısında en az %5 artışa yol açan EPO-ΨmRNA dozu sonraki çalışmalarda kullanılır. Farelerde tahmini 50 mU/ml'lik serum hEPO konsantrasyonları ve/veya retikülosit frekansındaki %5'lik bir artış elde edilir.

ÖRNEK 20: EPO-ΨmRNA'NIN *IN VIVO* İMMÜN YANITLARININ ÖLÇÜLMESİ

35 MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

Plazmadaki sitokinlerin tespiti.

7 günlük lipofektin kompleksli mRNA uygulaması sırasında ve sonrasında farklı zamanlarda toplanan kandan alınan serum örnekleri, fare IFN- α , TNF- α ve IL-12 bakımından ELISA kitleri kullanılarak analiz edilir.

Northern Blot analizi.

Dalaktan (2,0 örnek) izole edilen RNA örnekleri, %1,4 agaroz jel elektroforezi denatüre edilerek ayrılır, yüklü membranlara aktarılır (Schleicher ve Schuell) ve MiracleHyb® (Stratagene) içinde hibritleştirilir. Membranlar, TNF- α , akış istikameti tarafında IFN sinyalleme molekülleri (örneğin IRF7, IL-12 p35 ve p40, ve GAPDH) ve diğer immün aktivasyon markörleri bakımından araştırılır. Tüm problemlerin spesifikliği, sekanslama ile doğrulanmıştır. Membranları incelemek için, 50 ng DNA, rastsal bir etiketleme kitine sahip (Roche) Redivue[α -³²P] dCTP® (Amersham) ile etiketlenir. Hibritleştirilmiş membranlar, bir MS yoğunlaştırıcı elek kullanılarak -70 °C'de Kodak BioMax MS filmine maruz bırakılır.

Histopatoloji.

EPO- Ψ mRNA ile tedavi edilir ve pozitif ve negatif kontrol ile tedavi edilmiş farelerin dalakları hasat edilir, sabitlenir, kesitlenir, hematoksilin ve eozin ile lekelenir ve bir veteriner patolojist tarafından immün aktivasyon emareleri açısından incelenir.

SONUÇLAR

Mevcut buluşun RNA moleküllerinin immünojenikliğin azalmasını doğrulamak için, farelere (n = 5) günlük dozlarla EPO- Ψ mRNA 7 gün süreyle verilir, ardından, immün aracılı advers olaylar bakımından, serum sitokin konsantrasyonları, enflamatuvar proteinleri kodlayan mRNA'ların splenik ekspresyonu ve patolojik inceleme ile belirtilen şekilde değerlendirilir. Maksimum olarak uygulanan dozlar, 3 μ g veya 5 x yukarıdaki gibi belirlenen etkili tek dozdur. Değiştirilmemiş mRNA ve sadece Lipofectin®, sırasıyla pozitif ve negatif kontroller olarak kullanılır.

Bu çalışmalar mevcut buluşun RNA moleküllerinin

immünojenikliğini doğrular.

ÖRNEK 21: EPO-ΨmRNA iletim YÖNTEMLERİNDEN DAHA İYİLEŞTİRİLMESİ
Nanoparçacık kompleksleştirilmesi.

Polimer ve ΨmRNA çözeltileri kompleksler oluşturmak için
5 karıştırılır. Çeşitli formülasyon koşulları test edilmiş ve
optimize edilmiştir: (1) 22 nm altı polietilenimin (PEI)/mRNA
kompleksleri, 25 hacim mRNA'in su içinde 1 hacim PEI'ye
karıştırma olmadan 15 dakika süreyle ilavesiyle yapılır. (2)
12x150 nm'lik ortalama boyutlardaki çubuk benzeri poli-L-lizin
10 - polietilen glikol (PLL-PEG), 9 hacim mRNA'nın asetat karşı
iyon tamponundaki 1 hacim CK₃₀-PEG_{10k} 'ye vortekslenirken yavaşça
ilavesiyle sentezlenmiştir. (3) Biyobozunur gen taşıyıcı
polimer, poliaspartik anhidrit-ko-etilen glikol (PAE) sentezi
için, N-(benziloksikarbonil)-L-aspartik anhidrür ve etilen
15 glikolün halka açıcı polikondensasyonu ile sentezlenir. Daha
sonra, aspartik asidin pendan amininin koruması kaldırılır ve
hidrojen klorür ile asitleştirilerek protonlanır ve mRNA ile
yoğunlaştırılır. (4) En yeni nesil nanopartiküller için, bölüntü
stoğu CK₃₀PEG_{10k} amonyum asetat (1,25 mL; 6,4 mg/mL) olarak
20 silikonize Eppendorf tüplerine ilave edilir. Ardından mRNA, 1-2
dakika boyunca yavaş yavaş CK₃₀PEG_{10k}'ye (2,5 mg 11,25mL RNase'siz
H₂O) ilave edilir. 15 dakika sonra, bu, RNase'siz H₂O'da 1:2'ye
seyreltilmiştir.

Intratrakeal iletim.

25 Fareler, bir anestetik odada %3 halotan (%70 N₂O + %30 O₂)
anestezilenir ve burun konisi kullanılarak yapılan ameliyat
sırasında %1 halotan (%70 N₂O + %30 O₂) ile muhafaza edilir.
Trakea os açığa çıkarılır ve 50 µI mRNA kompleksi, 150 µI hava
ile akciğer içine trakea içerisinden 250 µI Hamilton enjektör
30 (Hamilton, Reno, NV) kullanılarak bir 27 G'lik 1/2" iğne ile
infüze edilir.

SONUÇLAR

Intratrakeal (i.t.) yolla verilen ΨmRNA'nın iletimi ve
ekspresyonunun verimliliğini geliştirmek için, ΨmRNA,
35 nanoparçacıklar halinde enkapsüle edilir. Nanopartikül

paketleme, DNA'nın (örneğin) nükleer membran gözeneginden daha küçük olan partiküllere yoğunlaştırılmasını ve poli-L-lisin ve polietilen glikol içeren kimyasalların kullanılmasıyla enkapsüle edilmesini içerir. RNA, 4 farklı nanopartikül formülasyonu halinde paketlenir (PEI, PLL, PAE, ve CK₃₀PEG_{10k}), ve Ψ mRNA aktarımının verimi lusiferaz-kodlayan Ψ mRNA ile (Luc- Ψ mRNA) karşılaştırır. Doğum kinetiği ve doz yanıtı daha sonra EPO- Ψ mRNA kullanılarak karakterize edilir.

ÖRNEK 22: REKOMBİNANT ISI ŞOKU PROTEİNİ KODLAYAN MODİFİYE EDİLMİŞ mRNA'NIN KAROTİS ARTERİNE İLETİM YOLUYLA RESTENOZUN ÖNLENMESİ

MALZEMELER VE DENEYSEL YÖNTEMLER

Deneysel tasarım

RNA, balon anjiyoplasti zamanı yakınında intra-arteriyel enjeksiyonla sıçanların karotis arterine uygulanır, bundan sonra kan akışı yeniden sağlanır. Enjeksiyondan 3 saat sonra sıçanlar kurban ediliyor, karotis arter kesitleri çıkarılır, vasküler endotel hücreleri toplanır ve homojenize edilir ve lusiferaz aktivitesi, yukarıdaki Örneklerde tarif edildiği gibi belirlenir.

SONUÇLAR

Lusiferaz kodlayan psödouridin modifiyeli RNA, sıçan karotis arterlerine uygulanır. 3 saat sonra, lusiferaz RNA iletim yerinde tespit edilebilir ancak bitişik bölgelerde tespit edilemez.

Ardından, bu protokol, hayvan restenoz modelinde balon anjiyoplasti sonrasında kan damarının restenozunu önlemek için, bir ısı şoku proteini, örneğin HSP70'i kodlayan modifiye RNA'nın; bir büyüme faktörü (örneğin trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotel büyüme faktörü (V-EGF) veya insülin benzeri büyüme faktörü (IGF); büyüme faktörü sinyalini aşağı regüle eden veya antagonize eden bir proteinin iletilmesiyle kullanılır. Modifiye RNA'nın uygulanması, restenoz insidansını azaltır.

ÖRNEK 23: SOLUNUM EPİTELYUMUNA CFTR KODLAYAN MODİFİYE EDİLMİŞ mRNA'NIN İLETİLMESİYLE KİSTİK FİBROZ TEDAVİSİ

CFTR'yi kodlayan psödouridin- veya nükleosidi modifiye edilmiş RNA, Örnek 13'de tarif edilen şekilde, bir kistik fibroz hayvan modelinin akciğerlerine aktarılır ve hastalık üzerine etkisi, Scholte BJ, et al yayınında tarif edilen şekilde değerlendirilir (Animal models of cystic fibrosis. J Cyst Fibres 2004; 3 Suppl 2: 183-90) veya 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). RNA'nın verilmesi kistik fibrozu iyileştirir.

İlave deneylerde, mevcut buluşun modifiye edilmiş mRNA molekülleri,, terapötik değere sahip diğer rekombinant proteinleri, örn. RNA'yı bir inhaler yoluyla akciğerlere iletmek üzere kullanılır.

ÖRNEK 24: HEMATOPOİETİK HÜCRELERE ADA KODLAYAN MODİFİYE EDİLMİŞ mRNA MOLEKÜLLERİNİN İLETİMİ İLE XLA'NIN TEDAVİSİ

ADA'yı kodlayan psödouridin- veya nükleosidi modifiye edilmiş RNA bir X- bağlantılı agammaglobülinemi hayvan modelinin hematopoetik hücrelerine aktarılır ve hastalık üzerine etkisi, 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) veya Zonta S, Lovisetto F, et al, Uretero- neocystostomy in a swine model of kidney transplantation: a new technique. J Surg Res. 2005 Apr;124(2):250-5) yayınlarında tarif edilen şekilde değerlendirilir. RNA'nın verililişinin XLA'yı iyileştirdiği bulunmuştur.

ÖRNEK 25: İMMÜNO-MODÜLATÖR PROTEİNİ KODLAYAN MODİFİYE EDİLMİŞ mRNA MOLEKÜLLERİNİN BİR NAKİL ALANINA TAŞINMASIYLA ORGAN REJEKSİYONUNUN ÖNLENMESİ

bir sitokin, bir kemokin veya bir interferonu kodlayan (örneğin IL-4, IL- 13, IL-10 veya TGF- β) psödouridin- veya nükleosidi modifiye edilmiş RNA, hayvan modelinin bir organ

transplantasyonu rejeksiyonu olan yerine aktarılır, ve rejeksiyonun vaka sıklığı üzerindeki etkisi, 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) veya 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) yayınlarında tarif edilen şekilde değerlendirilir. RNA'nın verilmesi, nakil reddinin insidansını azaltır.

ÖRNEK 26: VÜCUT DOKULARINA MODİFİYE EDİLMİŞ mRNA'NIN İLETİLMESİYLE NIEMANN-PICK HASTALIĞI, MUKOPOLİSAKKARİDOZ VE DİĞER DOĞUŞTAN METABOLİK HATALARIN TEDAVİ EDİLMESİ

Sfingomyelinazı kodlayan psödouridin- veya nükleosidi modifiye edilmiş RNA, Niemann-Pick hastalığı tip A ve B hayvan modellerinin akciğer, beyin veya diğer dokularına aktarılır ve hastalık üzerine etkisi, 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) veya 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) yayınında tarif edildiği gibi değerlendirilir. RNA'nın verilisinin hastalığı iyileştirdiği bulunmuştur.

Alfa-L-iduronidaz, iduronat-2-sülfataz veya bir ilgili enzimi kodlayan psödouridin- veya nükleosidi modifiye edilmiş RNA, bir mukopolisakkaridli hayvan modelinin vücut dokularına aktarılır ve hastalık üstündeki etkisi, 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) veya 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) yayınlarında tarif edilen şekilde değerlendirilir. RNA'nın verilmesi hastalığı iyileştirir.

İlave deneylerde, mevcut buluşun modifiye edilmiş mRNA molekülleri pıhtılaşma faktörlerini elde etmek üzere (örneğin hemofiliaklar için) kullanılır.

İlave deneylerde, mevcut buluşun modifiye edilmiş mRNA molekülleri Gaucher'in tedavisi için asit-b- glukozidazı elde etmek amacıyla kullanılır.

İlave deneylerde, mevcut buluşun modifiye edilmiş mRNA molekülleri Fabry hastalıklarını tedavi etmek için alfa-galaktosidaz A'yı elde etmek amacıyla kullanılır.

İlave deneylerde, mevcut buluşun modifiye edilmiş mRNA molekülleri bulaşıcı hastalıkların tedavisi için sitokinleri elde etmek amacıyla kullanılır.

İlave deneylerde, mevcut buluşun değiştirilmiş mRNA molekülleri, örneğin, ABCA4; ABCD3; ACADM; AGL; AGT; ALDH4A1; ALPL; AMPD1; APOA2; AVSD1; BRCD2; C1QA; C1 QB; C1QG; C8A; C8B; CACNA1S; CCV; CD3Z; CDC2L1; CHML; CHS1; CIAS1; CLCNKB; CMD1A; CMH2; CMM; COL11A1; COL8A2; COL9A2; CPT2; CRB1; CSE; CSF3R; CTPA; CTSK; DBT; DIO1; DISC1; DPYD; EKV; ENO1; ENO1P; EPB41; EPHX1; F13B; F5; FCGR2A; FCGR2B; FCGR3A; FCHL; FH; FMO3; FMO4; FUCA1; FY; GALE; GBA; GFND; GJA8; GJB3; GLC3B; HF1; HMGCL; HPC1; HRD; HRPT2; HSD3B2; HSPG2; KCNQ4; KCS; KIF1B; LAMB3; LAMC2; LGMD1B; LMNA; LOR; MCKD1; MCL1; MPZ; MTHFR; MTR; MUTYH; MYOC; NB; NCF2; NEM1; NPHS2; NPPA; NRAS; NTRK1; OPTA2; PBX1; PCHC; PGD; PHA2A; PHGDH; PKLR; PKP1; PLA2G2A; PLOD; PPOX; PPT1; PRCC; PRG4; PSEN2; PTOS1; REN; RFX5; RHD; RMD1; RPE65; SCCD; SERPINC1; SJS1; SLC19A2; SLC2A1; SPG23; SPTA1; TALI; TNFSF6; TNNT2; TPM3; TSHB; UMPK; UOX; UROD; USH2A; VMGLOM; VWS; WS2B; ABCB11; ABCG5; ABCG8; ACADL; ACP1; AGXT; 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; UGT1 A0; UV24; WSS;
XDH; ZAP70; ZFHx1B; ACAA1; AGS1; AGTR1; AHSB; AMT; ARMET; BBS3;
BCHE; BCPM; BTB; CASR; CCR2; CCR5; CDL1; CMT2B; COL7A1; CP; CPO;
5 CRV; CTNNB1; DEM; ETM1; FANCD2; FIH; FOXL2; GBE1; GLB1; GLC1C;
GNAI2; GNAT1; GP9; GPX1; HGD; HRG; ITIH1; KNG; LPP; LRS1; MCCC1;
MDS1; MHS4; MITF; MLH1; MYL3; MYMY; OPA1; P2RY12; PBXP1; PCCB;
POU1F1; PPARG; PROS1; PTHR1; RCA1; RHO; SCA7; SCLC1; SCN5A; SI;
SLC25A20; SLC2A2; TF; TGFBR2; THPO; THRB; TKT; TM4SF1; TRH; UMPS;
10 UQCRC1; USH3A; VHL; WS2A; XPC; ZNF35; ADH1B; ADH1C; AFP; AGA;
AIH2; ALB; ASMD; BFHD; CNGA1; CRBM; DCK; DSPP; DTDP2; ELONG;
ENAM; ETVFHD; EVC; F11; FABP2; FGA; FGB; FGFR3; FGG; FSHMD1A; GC;
GNPTA; GNRHR; GYPB; HCA; HCL2; HD; HTN3; HVBS6; IDUA; IF; JPD;
KIT; KLKB1; LQT4; MANBA; MLLT2; MSX1; MTP; NR3C2; PBT; PDE6B;
15 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;
20 MCC; MCCC2; MSH3; MSX2; NR3C1; PCSK1; PDE6A; PFBI; RASA1; SCZD1;
SDHA; SGCD; SLC22A5; SLC26A2; SLC6A3; SM1; SMA0; SMN1; SMN2;
SPINK5; TCOF1; TELAB1; TGFBI; ALDH5A1; ARG1; AS; ASSP2; BCKDHB;
BF; C2; C4A; CDKN1 A; COL10A1; COL11A2; CYP21A2; DYX2; EJM1;
ELOVL4; EPM2A; ESR1; EYA4; F13A1; FANCE; GCLC; GJA1; GLYS1; GMPR;
25 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;
30 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; CHORDOMA; CLCN1; CMH6;
CMT2D; COL1A2; CRS; CYMD; DFNA5; DLD; DYT11; EEC1; ELN; ETV1;
FKBP6; GCK; GHRHR; GHS; GLI3; GPDS1; GUSB; HLXB9; HOXA13; HPFH2;
35 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;
 5 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;
 10 CDKN2A; CHAC; CLA1; CMD1B; COL5A1; CRAT; DBH; DNAI1; DYS; DYT1;
 ENG; FANCC; FBP1; FCMD; FRDA; GALT; GLDC; GNE; GSM1; GSN;
 HSD17B3; HSN1; IBM2; INVS; JBTS1; LALL; LCCS1; LCCS; LGMD2H;
 LMX1B; MLLT3; MROS; MSSE; NOTCH1; ORM1; PAPP; PIP5K1B; PTCH;
 PTGS1; RLN1; RLN2; RMRP; ROR2; RPD1; SARDH; SPTLC1; STOM; TDFA;
 15 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;
 20 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;
 25 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;
 30 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;
 35 RSN; SAS; SAX1; SCA2; SCNN1A; SMAL; SPPM; SPSMA; TBX3; TBX5;

TCF1; TPI1; TSC3; ULR; VDR; VWF; ATP7B; BRCA2; BRCD1; CLN5; CPB2;
 ED2; EDNRB; ENUR1; ERCC5; F10; F7; GJB2; GJB6; IPF1; MBS1; MCOR;
 NYS4; PCCA; RBI; RHOK; SCZD7; SGCG; SLC10A2; SLC25A15; STARP1;
 ZNF198; ACHM1; ARVD1; BCH; CTAA1; DAD1; DFNB5; EML1; GALC; GCH1;
 5 IBGC1; IGH@; IGHC grubu; IGHG1; IGHM; IGHR; IV; LTBP2; MCOP;
 MJD; MNG1; MPD1; MPS3C; MYH6; MYH7; NP; NPC2; PABPN1; PSEN1;
 PYGL; RPGRIP1; SERPINA1; SERPINA3; SERPINA6; SLC7A7; SPG3A;
 SPTB; TCL1A; TGM1; TITF1; TMIP; TRA@; TSHR; USH1A; VP; ACCPN;
 AHO2; ANCR; B2M; BBS4; BLM; CAPN3; CDAN1; CDAN3; CLN6; CMH3;
 10 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; DNASE1; DPEP1; ERCC4; FANCA; GALNS; GAN; HAGH;
 15 HBA1; HBA2; HBHR; HBQ1; HBZ; HBZP; HP; HSD11B2; IL4R; LIPB; MC1R;
 MEFV; MHC2TA; MLYCD; MMVP1; PHKB; PHKG2; PKD1; PKDTS; PMM2; PXE;
 SALL1; SCA4; SCNN1B; SCNN1G; SLC12A3; TAT; TSC2; VDI; WT3; ABR;
 ACACA; ACADVL; ACE; ALDH3A2; APOH; ASPA; AXIN2; BCL5; BHD; BLMH;
 BRCA1; CACD; CCA1; CCZS; CHRN1B; CHRNE; CMT1A; COL1A1; CORD5;
 20 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;
 25 PRKWNK4; PRP8; PRPF8; PTLAH; RARA; RCV1; RMSA1; RP17; RSS; SCN4A;
 SERPINF2; SGCA; SGSH; SHBG; SLC2A4; SLC4A1; SLC6A4; SMCR; SOST;
 SOX9; SSTR2; SYM1; SYNS1; TCF2; THRA; TIMP2; TOC; TOP2A; TP53;
 TRIM37; VBCH; ATP8B1; BCL2; CNSN; CORD1; CYB5; DCC; F5F8D; FECH;
 FEO; LAMA3; LCFS2; MADH4; MAFD1; MC2R; MCL; MYP2; NPC1; SPPK;
 30 TGFBRE; TGIF; TTR; AD2; AMH; APOC2; APOE; ATHS; BAX; BCKDHA;
 BCL3; BFIC; C3; CACNA1 A; CCO; CEACAM5; COMP; CRX; DBA; DDL);
 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;
 35 LYL1; MAN2B1; MCOLN1; MDRV; MLLT1; NOTCH3; NPHS1; OFC3; OPA3;

PEPD; PRPF31; PRTN3; PRX; PSG1; PVR; RYR1; SLC5A5; SLC7A9; STK11;
 TBXA2R; TGFB1; TNNI3; TYROBP; ADA; AHCY; AVP; CDAN2; CDPD1;
 CHED1; CHED2; CHRNA4; CST3; EDN3; EEGV1; FTLL1; GDF5; GNAS; GSS;
 HNF4A; JAG1; KCNQ2; MKKS; NBIA1; PCK1; PI3; PPCD; PPGB; PRNP;
 5 THBD; TOP1; AIRE; APP; CBS; COL6A1; COL6A2; CSTB; DCR; DSCR1;
 FPDMM; HLCS; HPE1; ITGB2; KCNE1; KNO; PRSS7; RUNX1; SOD1; TAM;
 ADSL; ARSA; BCR; CECR; CHEK2; COMT; CRYBB2; CSF2RB; CTHM; CYP2D6;
 CYP2D7P1; DGCR; DIA1; EWSR1; GGT1; MGCR; MN1; NAGA; NF2; OGS2;
 PDGFB; PPARA; PRODH; SCO2; SCZD4; SERPIND1; SLC5A1; SOX10; TCN2;
 10 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; C1
 HR; CACNA1F; CALB3; CBBM; CCT; CDR1; CFNS; CGF1; CHM; CHR39C;
 CIDX; CLA2; CLCN5; CLS; CMTX2; CMTX3; CND; COD1; COD2; COL4A5;
 15 COL4A6; CPX; CVD1; CYBB; DCX; DFN2; DFN4; DFN6; DHOF; DIAPH2;
 DKC1; DMD; DSS; DYT3; EBM; EBP; ED1; ELK1; EMD; EVR2; F8; F9;
 FCP1; FDP5L5; FGD1; FGS1; FMR1; FMR2; G6PD; GABRA3; GATA1; GDI1;
 GDXY; GJB1; GK; GLA; GPC3; GRPR; GTD; GUST; HMS1; HPRT1; HPT;
 HTC2; HTR2C; HYR; IDS; IHG1; IL2RG; INDX; IP1; IP2; JMS; KALI;
 20 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;
 25 PFKFB1; PGK1; PGK1P1; PGS; PHEX; PHKA1; PHKA2; PHP; PIGA; PLP1;
 POF1; POLA; POU3F4; PPMX; PRD; PRPS1; PRPS2; PRS; RCCP2; RENBP;
 RENS1; RP2; RP6; RPGR; RPS4X; RPS6KA3; RS1; S11; SDYS; SEDL;
 SERPINA7; SH2D1A; SHFM2; SLC25A5; SMAX2; SRPX; SRS; STS; SYN1;
 SYP; TAF1; TAZ; TBX22; TDD; TFE3; THAS; THC; TIMM8A; TIMP1; TKCR;
 30 TNFSF5; UBE1; UBE2A; WAS; WSN; WTS; WWS; XIC; XIST; XK; XM; XS;
 ZFX; ZIC3; ZNF261; ZNF41; ZNF6; AMELY; ASSP6; AZF1; AZF2; DAZ;
 GCY; RPS4Y; SMCY; SRY; ZFY; ABAT; AEZ; AFA; AFD1; ASAH1; ASD1;
 ASMT; CCAT; CECR9; CEPA; CLA3; CLN4; CSF2RA; CTS1; DF; DIH1;
 DWS; DYT2; DYT4; EBR3; ECT; EEFLA1L14; EYCL2; FANCB; GCSH; GCSL;
 35 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; MTTS1; NAMSD; 5 OCD1; OPD2; PCK2; PCLD; PCOS1; PFKM; PKD3; PRCA1; PRO1; PROP1; RBS; RFXAP; RP; SHOX; SLC25A6; SPG5B; STO; SUOX; THM; veya TTD'i kodlayan mRNA moleküllerinin uygulanmasıyla, metabolizmanın doğuştan gelen diğer hatalarını düzeltmek için kullanılır.

10 **ÖRNEK 27: İNOS KODLAYAN MODİFİYE EDİLMİŞ mRNA MOLEKÜLLERİNİN VÜCUT DOKULARINA İLETİLMESİYLE VAZOSPAZMIN TEDAVİSİ**

İndüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS) kodlayan psödouridin- veya nükleosidi modifiye edilmiş RNA, vazospazm hayvan modellerinin vasküler endotelyumuna aktarılır (örneğin 15 subaraknoid hemoraji), ve hastalık üstündeki etkisi, 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) veya Park S, Yamaguchi M, et al, Neurovascular protection reduces early brain injury 20 after subarachnoid hemorrhage. Stroke 2004;35(10): 2412-7) yayınlarında tarif edilen şekilde değerlendirilir. RNA'nın verilmesi hastalığı iyileştirir.

ÖRNEK 28: BİR İMMÜNO SUPRESİF PROTEİNİ KODLAYAN MODİFİYE EDİLMİŞ mRNA'NIN İLETİMİYLE SAÇ BÜYÜMESİNİN GERİ KAZANILMASI

Psödouridin- veya bir telomeraz veya bir immünosupresif proteini kodlayan nükleosidi modifiye edilmiş RNA (örneğin, α -MSH, TGF- β 1, veya IGF-I, hayvanların kıl foliküllerine iletilir ve kıl kaybı veya kelleşme modeli olarak kullanılır, ve kıl büyümesi üzerindeki etkisi şu yayınlardaki gibi değerlendirilir: 30 Jiang J, Tsuboi R, et al, Topical application of ketoconazole stimulates hair growth in C3H/HeN mice. J Dermatol 2005;32(4): 243-7) veya 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 35 blockade disease onset in the C3H/HeJ mouse model. J Invest

Dermatol 2005;124(5): 947-57). RNA uygulaması kıl/tüy büyümesini geri kazandırmıştır.

ÖRNEK 29: BİR siRNA İÇEREN DEĞİŞTİRİLMİŞ NÜKLEOSİDLERE SAHİP BİR İN VİTRO TRANSKRİBE EDİLMİŞ RNA MOLEKÜLÜNÜN SENTEZİ

5 psödouridin veya modifiye edilmiş bir nükleosid ihtiva eden ve ayrıca küçük bir girişimci RNA (siRNA) veya kısa tokalı RNA (shRNA) içeren bir çift iplikçikli RNA (dsRNA) molekülü, aşağıdaki prosedür ile sentezlenmiştir: Uridin veya 1 veya daha fazla modifiye edilmiş nükleosid içeren arzu edilen sekansa sahip komplementer RNA iplikçikleri, *in vitro* transkripsiyonla (örneğin T7, SP6 veya T3 faj RNA polimerazı tarafından) Örnek 2'de tarif edilen şekilde sentezlenir. dsRNA molekülleri düşük immünojeniklik sergiler. Diğer deneylerde, dsRNA molekülleri, arzu edilen siRNA veya shRNA'yı elde etmek üzere hücrel bir enzim tarafından işlenmek üzere tasarlanır. Birkaç yüz nükleotidin dsRNA molekülleri kolayca sentezlendiğinden, her dsRNA, birden fazla siRNA veya shRNA'nın tek bir hedef hücreye verilmesini kolaylaştırmak için birkaç siRNA veya shRNA molekülünü içereceği şekilde tasarlanabilir.

20 ÖRNEK 30: DEĞİŞTİRİLMİŞ NÜKLEOSİDLERE SAHİP BİR İN VİTRO TRANSKRİBE EDİLMİŞ RNA MOLEKÜLÜNÜN siRNA'YI İLETMEK AMACIYLA KULLANIMI

Önceki Örnekteki dsRNA molekülü, bir transfeksiyon reaktifi (örneğin bir katyonik transfeksiyon reaktifi, lipid bazlı bir transfeksiyon reaktifi, protein bazlı bir transfeksiyon reaktifi, polietilenimin bazlı bir transfeksiyon reaktifi veya kalsiyum fosfat) ile kompleksleştirilir ve ilgilenilen bir hedef hücreye iletilir. Hedef hücre yüzeyinde veya yüzeyinde bulunan enzimler, dsRNA'yı istenen siRNA veya shRNA molekülüne/moleküllerine indirgemektedir. Bu yöntem, siRNA veya shRNA sekansına/sekanslarına karşılık gelen 1 veya daha fazla hücrel genin transkripsiyonunu etkili bir şekilde susturur.

ÖRNEK 31: İLAVE NÜKLEOSİD MODİFİKASYONLARININ RNA İMMÜNOGENİKLİĞİ VE TRANSLASYONUN VERİMLİLİĞİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİ TEST ETMEK

İlave nükleosid modifikasyonları, *in vitro* olarak transkribe edilmiş RNA'ya, yukarıda Örnekler 2 ve 7'de tarif edilen yöntemler kullanılarak dahil edilir ve immünojeniklik translasyon verimi üzerindeki etkileri bakımından sırasıyla Örnekler 1-8 ve 9-15'te tarif edilen şekilde test edilir. Bazı ilave modifikasyonların immünojenikliği azalttığı ve translasyonu arttırdığı bulunmuştur.

Test edilen modifikasyonlar, örneğin, aşağıdakiler olmuştur:

m¹A; m²A; Am; ms²m⁶A; i⁶A; ms²i⁶A; io⁶A; ms²io⁶A; g⁶A; t⁶A; ms²t⁶A; m⁶t⁶A; hn⁶A; ms²hn⁶A; Ar(p); I; m¹l; m¹lm; m³C; Cm; s²C; ac⁴C; f⁵C, m⁵Cm; ac[^]Cm; k²C; m¹G; m²G; m⁷G; Gm; m²₂G; m²Gm; m²₂Gm; 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; Im; m⁴C; m⁴Cm; hm⁵C; m³U; m¹acp³Ψ; cm⁵U; m⁶Am; m⁶₂Am; m^{2,7}G; m^{2,2,7}G; m³Um; m⁵D; m³Ψ; f⁵Cm; m¹Gm; m¹Am; im⁵U; im⁵s²U; imG-14; imG2; ve ac⁶A.

SEKANS LİSTESİ

- <110> Pennsylvania Üniversitesi Mütevelli Heyeti
<120> Modifiye Edilmiş Nükleosidler İçeren RNA ve Kullanım
5 Yöntemleri
<130> EP81461 IHVSZpau
<140 henüz atanmamış
<141 > burada
<150> EP06813536.7
10 <151> 21.08.2006
<150> PCT/US2006/032372
<151> 21.08.2006
<150> 60/710,164
<151 > 23.08.2005
15 <160> 11
<170> Patentin versiyon 3.5
<210> 1
<211> 1864
<212> RNA
20 <213> Photinus pyralis
<400> 1

ggaauucua acacaacaua uacaaaacaa acgaauucua agcaaucaag cauuuacuu	60
cuauugcagc aauuuuaaauc auuucuuuuu aagcaaaagc aauuuucuga aaauuuucac	120
cauuuacgaa cgauagccau ggaagacgcc aaaaacauaa agaaaggccc ggcgccauuc	180
uaucucuaag aggauggaac cgcuggagag caacugcaua aggcuaugaa gagauacgcc	240
cugguuccug gaacaauugc uuuuacagau gcacauaucg aggugaacau cacguacgcg	300
gaauacuucg aaauugccgu ucgguuggca gaagcuaua aacgauaugg gcugaauaca	360
aaucacagaa ucgucguaug cagugaaaac ucucuucaau ucuuuaugcc gguguugggc	420
gcguuauuuu ucggaguugc aguugcgcgc gcgaacgaca uuuaauaaga acgugaauug	480
cucaacagua ugaacauuuc gcagccuacc guaguguuug uuuccaaaaa gggguugcaa	540
aaaauuuuga acgugcaaaa aaaaauacca auaauccaga aaauuauuau cauggauucu	600
aaaacggauu accagggauu ucagucgaug uacacguucg ucacauucua ucuaccuccc	660
gguuuuuauug aaauacgauu uguaccagag uccuuugauc gugacaaaac aaugcacug	720
auaauagaau ccucuggauc uacuggguaa ccuaaggug uggcccuucc gcuaagaacu	780
gccugcgua gauucucgca ugccagagau ccuauuuuug gcaaucaau cauuccggau	840
acugcgauu uaaguguugu uccauuccau cacgguuuug gaauguuac uacacucgga	900
uauuugauu guggauuucg agucgucua auguauagau uugaagaaga gcuguuuua	960
cgaucccuuc aggaauaaca aaaucaagu gcguugcuag uaccaaccu auuuucauuc	1020
uucgcaaaa gcacucugau ugacaaauac gauuuauca auuuacacga aaugcuucu	1080
gggggcgcac cucuuucgaa agaagucggg gaagcgguug caaacgcuu ccaucuucca	1140
gggauacgac aaggauaugg gcucacugag acuaucag cuauucugau uacaccgag	1200
ggggaugaua aaccgggcgc ggucgguaa guuguuccau uuuuugaagc gaagguugug	1260
gaucuggaua ccgggaaac gcugggcuu aaucagagag gcgaauuug ugucagagga	1320
ccuauuaua uguccgguu uguaaacaau ccggaagcga ccaacgccu gauugacaag	1380
gauggauggc uacauucugg agacauagcu uacugggacg aagacgaaca cuucucaua	1440
guugaccgc ugaagucuuu aaauaaauac aaaggauauc agguaggccc cgcugaauug	1500
gaaucgauu uguuacaaca cccaacauc uucgacgcgg gcguggcagg ucuucccgac	1560
gaugacgccg gugaacuucc cgccgccguu guuguuuugg agcacggaaa gacgaugacg	1620
gaaaaagaga ucguggauu cguggccagu caaguaacaa ccgcgaaaaa guugcgcgga	1680
ggaguugugu uuguggacga aguaccgaaa ggucuuaccg gaaaacucga cgcaagaaaa	1740
aucagagaga uccucauaaa ggccaagaag ggcggaaagu ccaauugua aauguaacu	1800
cuagaggau cccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1860
aaca	1864

<210> 2

<211> 1571

<212> RNA
 <213> Renilla reniformis
 <400> ?

ggcuagccac caugacuucg aaaguuuauug auccagaaca aaggaaacgg augauaacug	60
guccgcagug gugggccaga uguaaacaaa ugaauuguuc ugaaucauuu auuaauuuu	120
augauucaga aaaacaugca gaaaauugcug uuauuuuuuu acaugguaac gcgggcucuu	180
cuuauuuuauug gcgacauguu gugccacaua uugagccagu agcgcgguu auuauaccag	240
accuuauuug uaugggcaaa ucaggcaaa cuuguuaugg uucuuauagg uuacuugauc	300
auuacaaaau ucuuacugca ugguuugaac uucuuauuuu accaaagaag aucauuuuug	360
ucggccauga uuggggugcu uguuuggcau uucauuauag cuaugagcau caagauaaga	420
uccaaagcaau aguucacgcu gaaaguguag uagaugugau ugaaucaugg gaugaauggc	480
cugauuuuga agaagauuu gcguugauc aaucugaaga aggagaaaa augguuuug	540
agaauaacuu cuucguggaa accauguugc caucaaaaau caugagaaag uuagaaccag	600
aagaauuugc agcauauuu gaaccuuca aagagaaagg ugaaguucgu cguccaau	660
uaucauggcc ucgugaauc ccguuaguaa aaggugguaa accugacguu guacaaauug	720
uuaggaauua uauugcuuu cuacgugca gugaugauuu accaaaaaug uuuaauugaau	780
cggaccagg auucuuuucc aaugcuauug uugaaggugc caagaaguuu ccuaauacug	840
aaauugucaa aguaaaaggu cuucauuuuu cgcaagaaga ugcaccugau gaaaugggaa	900
aaauaucaaa aucguucguu gagcgaguuc ucaaaauga acaauugucg acgggggccc	960
cuaggaauuu uuuaagggaag aucuggccuu ccuacaaggg aaggccaggg aauuuucuu	1020
agagcagacc agagccaaca gccccaccag aagagagcuu caggucuggg guagagacaa	1080
caacuccccc ucagaagcag gagccgauag acaaggaacu guauccuuu acuucccua	1140
gaucacucuu uggcaacgac ccucgucac aaauaagaua ggggggcaac uaaagggauc	1200
ggccgcuucg agcagacaug auagauaca uugaugauu uggacaaacc acaacuagaa	1260
ugcagugaaa aaaauugcuu auuugugaaa uuugugaugc uauugcuuu uuuguaacca	1320
uuauaagcug caauaaacaa guuaacaaca acaauugcau ucauuuuaug uuucagguuc	1380
agggggagggu gugggagguu uuuaaaagca aguaaaaccu cuacaaaugu gguaaaaucg	1440
auaaguuuua acagauccag guggcacuuu ucgggggaa ugcgcggaa ccccuauuug	1500
uuuuuuuuu uaaauacauu caauaugua uccgcucaug agacaauaac ccugauaaa	1560
gcuucaauaa u	1571

<210> 3
 <211> 726
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3

gggaauuugg cccucgaggc caagaauucg gcacgaggca cgcggccagc cagcagacag	60
aggacucuca uuaaggaagg uguccugugc ccugaccua caagaugcca agagaagaug	120
cucacuucan cuauuguuac cccaagaagg ggcacggcca cucuacacc acggcugaag	180
aggccgcugg gaucggcauc cugacaguga uccugggagu cuuacugcuc aucggcuguu	240
gguaauuguag aagacgaaau ggauacagag ccuugaugga uaaaagucuu cauguuggca	300
cucaaugugc cuuaacaaga agaugccac aagaaggguu ugaucaucgg gacagcaaag	360
ugucucuuca agagaaaaac ugugaaccug ugguuccaa ugcuccaccu gcuaugaga	420
aacucucugc agaacaguca ccaccaccuu auucaccua agagccagcg agacaccuga	480
gacaugcuga aauuuuuucu cucacacuuu ugcugaauu uauacagac aucuaauguu	540
cuccuuugga augguuagg aaaaauugca gccaucucua auauaaguc aguguuaaaa	600
uuuuaguagg uccgcuagca guacuaauca ugugaggaaa ugaugagaaa uauuaauug	660
ggaaaacucc aucaauaaau guugcaaugc augauaaaaa aaaaaaaaaa aaaaacugcg	720
gccgca	726

<210> 4

<211> 7*2

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gggaauaagc uugcggccgc aguuuuuuuu uuuuuuuuuu uuaucaugca uugcaacauu	60
uuuugaugga guuuuccaa uuuaauuuu cucaucauuu ccucacauga uuaguacugc	120
uagcggaccu acuaaaauuu uaacacugac uuauuuuag agauggcuug cauuuuuccu	180
acaccauucc aaaggagaac auuagauguc uguauaaau caagcaaaag ugugagagaa	240
auaauuucag caugucucag gugucucgu ggcucuuaag gugaauaagg ugguggugac	300

uguucugcag agaguuuuc auuagcaggu ggagcauugg gaaccacagg uucacaguuu	360
uucucuugaa gagacacuuu gcugucccga ugaucaaacc cuucugugg gcaucuucuu	420
guuaaggcac auugagugcc aacauaaga cuuuuaucca ucaaggcucu guauccauuu	480
cgucuucua aauaccaaca gccgaugagc aquaagacuc ccaggauac ugucaggau	540
ccgaucccag cggccucuc agccguggug uaagaguggc cgugcccuu cuugggguaa	600
ccauagauga agugagcauc uucucuuggc aucuuguagg gucagggcac aggacaccuu	660
ccuaauagag aguccucugu cugcuggcug gccgcugucc ucgugccgaa uu	712

<210> 5

<211> 494

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210 6

<211> 21

<212> RNA

5 <213> Yapay Sekans

<220

<223> Kimyasal olarak sentezlenmiş

<400 6 uggauccggc uuugagaucu u 21

<210> 7

10 <211> 21

<212> RNA

<213> Yapay Sekans

<220>

<223> Kimyasal olarak sentezlenmiş

15 <220>

<221 > modifiye_baz

<222> (11)..(11)

<223> urn

<400>7 uggauccggc uuugagaucu u 21

20 <210> 8

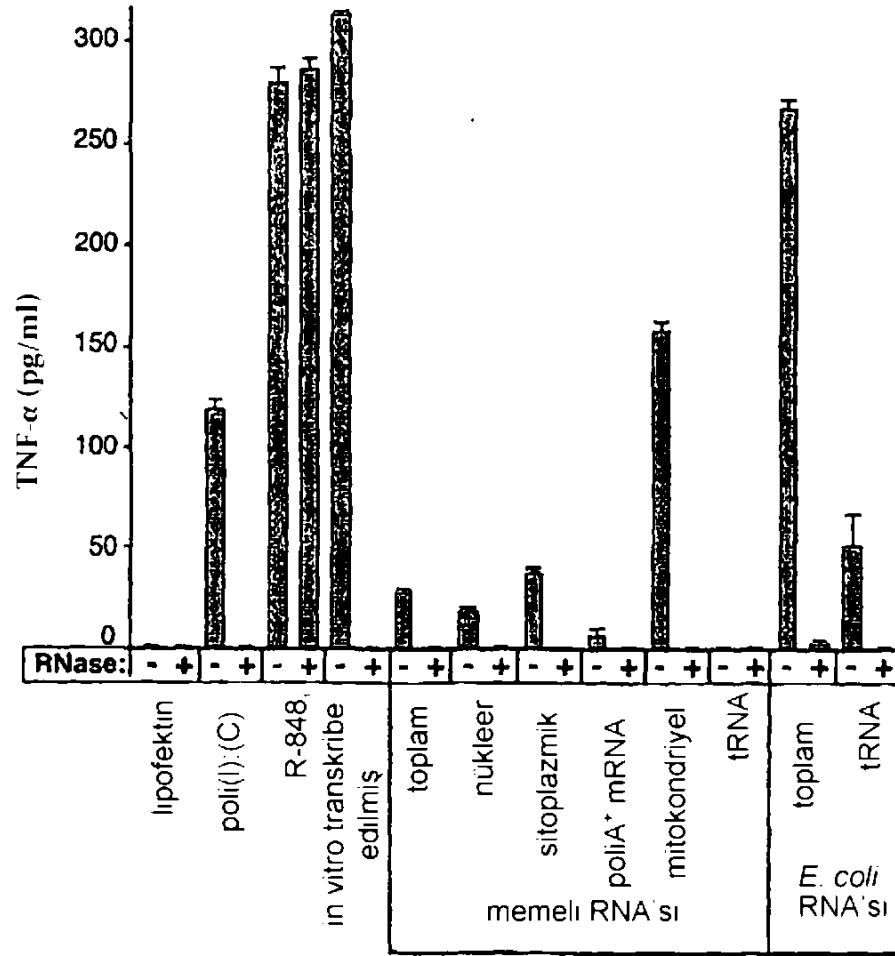
<211> 21

<212> RNA

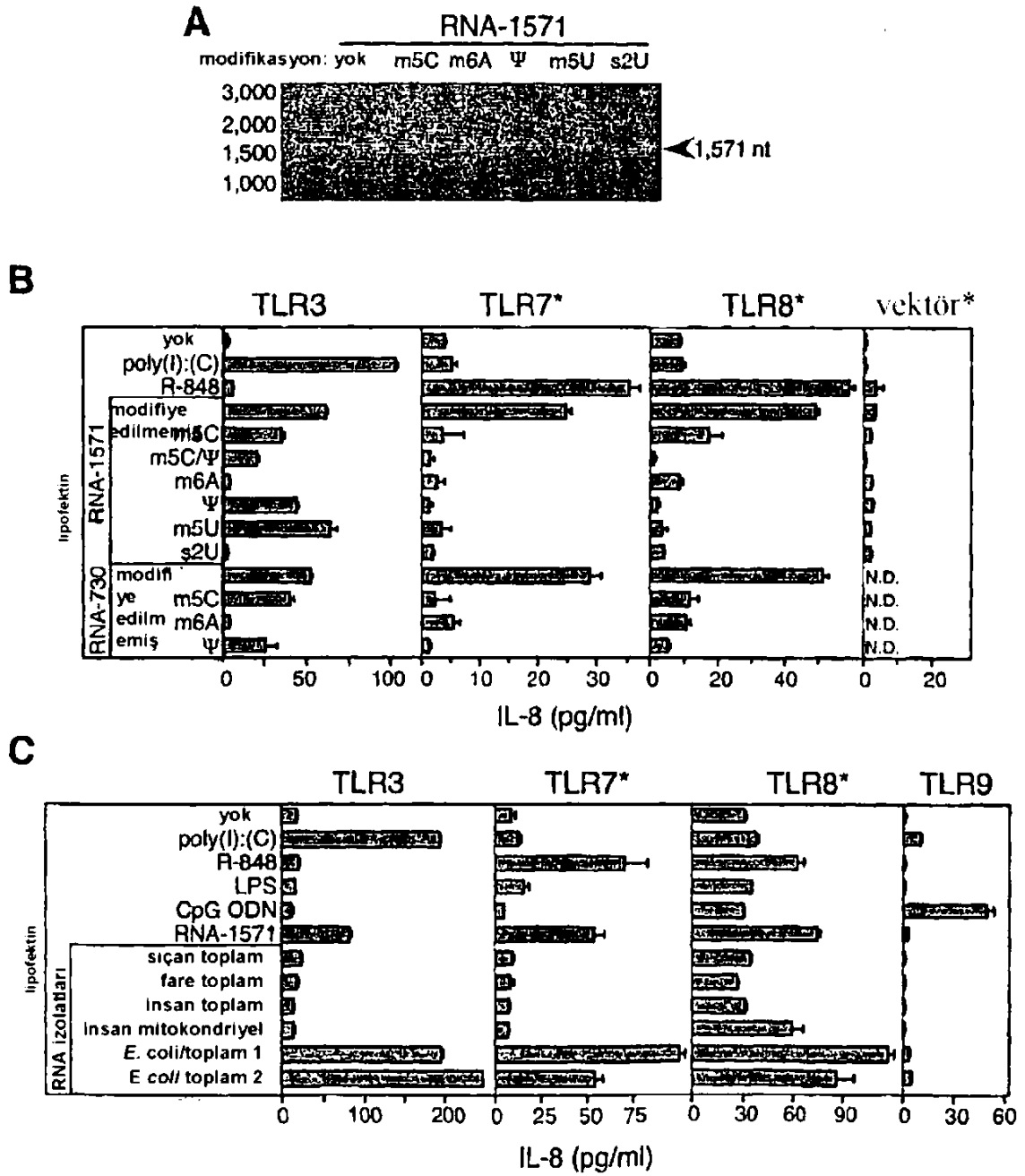
<213> Yapay Sekans

<220>

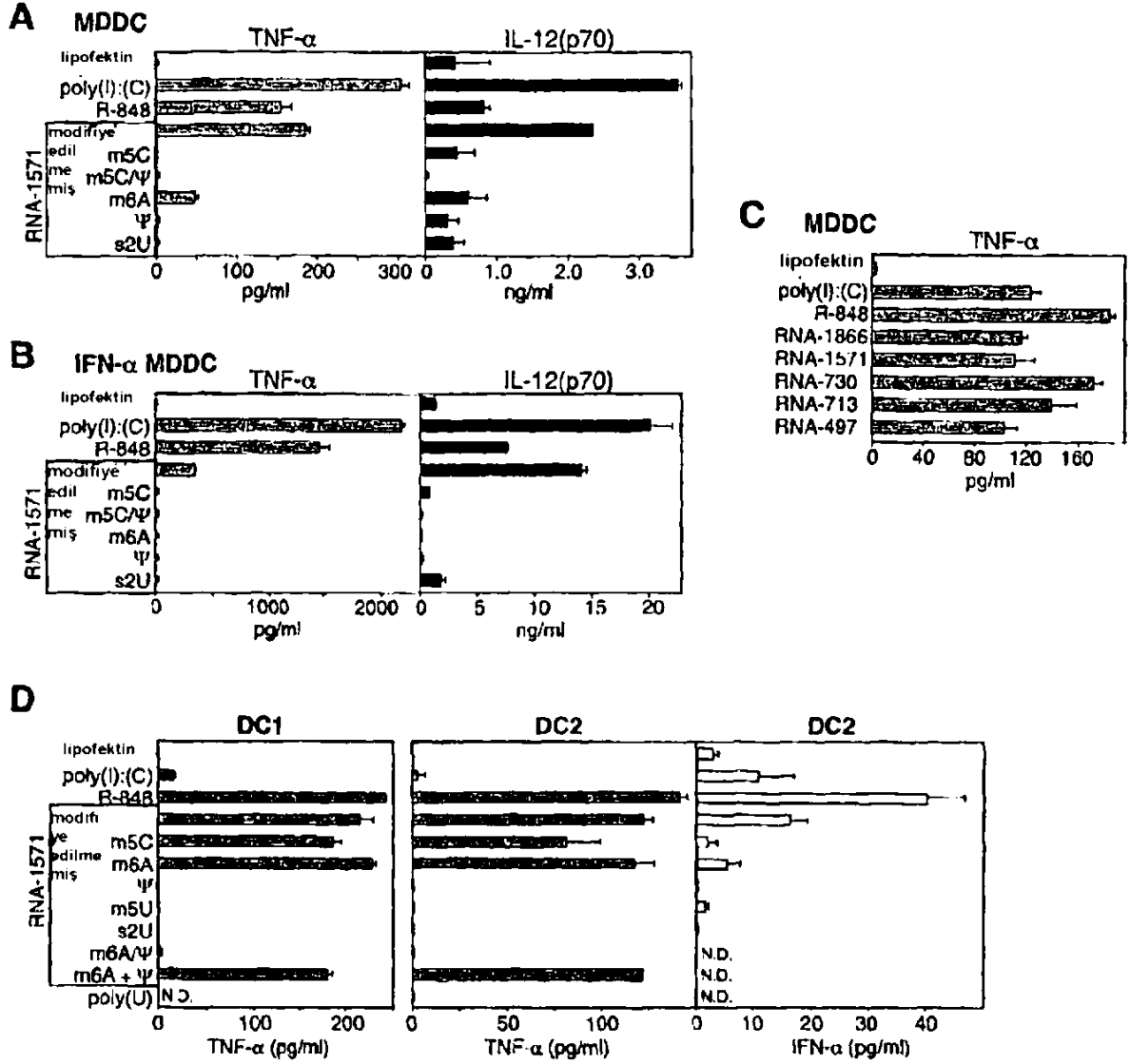
<223> Kimyasal olarak sentezlenmiş
 <220
 <221 > modifiye_baz
 <222> (6)..(6)
 5 <223> m5c
 <400> 8
 uggauccggc uuugagaucu u 21
 <210> 9
 <211> 21
 10 <212> RNA
 <213> Yapay Sekans
 <220>
 <223> kimyasal olarak sentezlenmiş
 <220>
 15 <221 > modifiye_baz
 <222> (12)..(12)
 <223> p
 <400> 9
 uggauccggc uuugagaucu u 21
 20 <210> 10
 <211> 31
 <212> RNA
 <213> Yapay Sekans
 <220>
 25 <223> Kimyasal olarak sentezlenmiş
 <400> 10
 gggagacagg gguguccgcc auuuccaggu u 31
 <210> 11
 <211> 31
 30 <212> RNA
 <213> Yapay Sekans
 <220>
 <223> Kimyasal olarak sentezlenmiş
 <400> 11
 35 gggagacagg cuauaacuca cauaauguau u 31



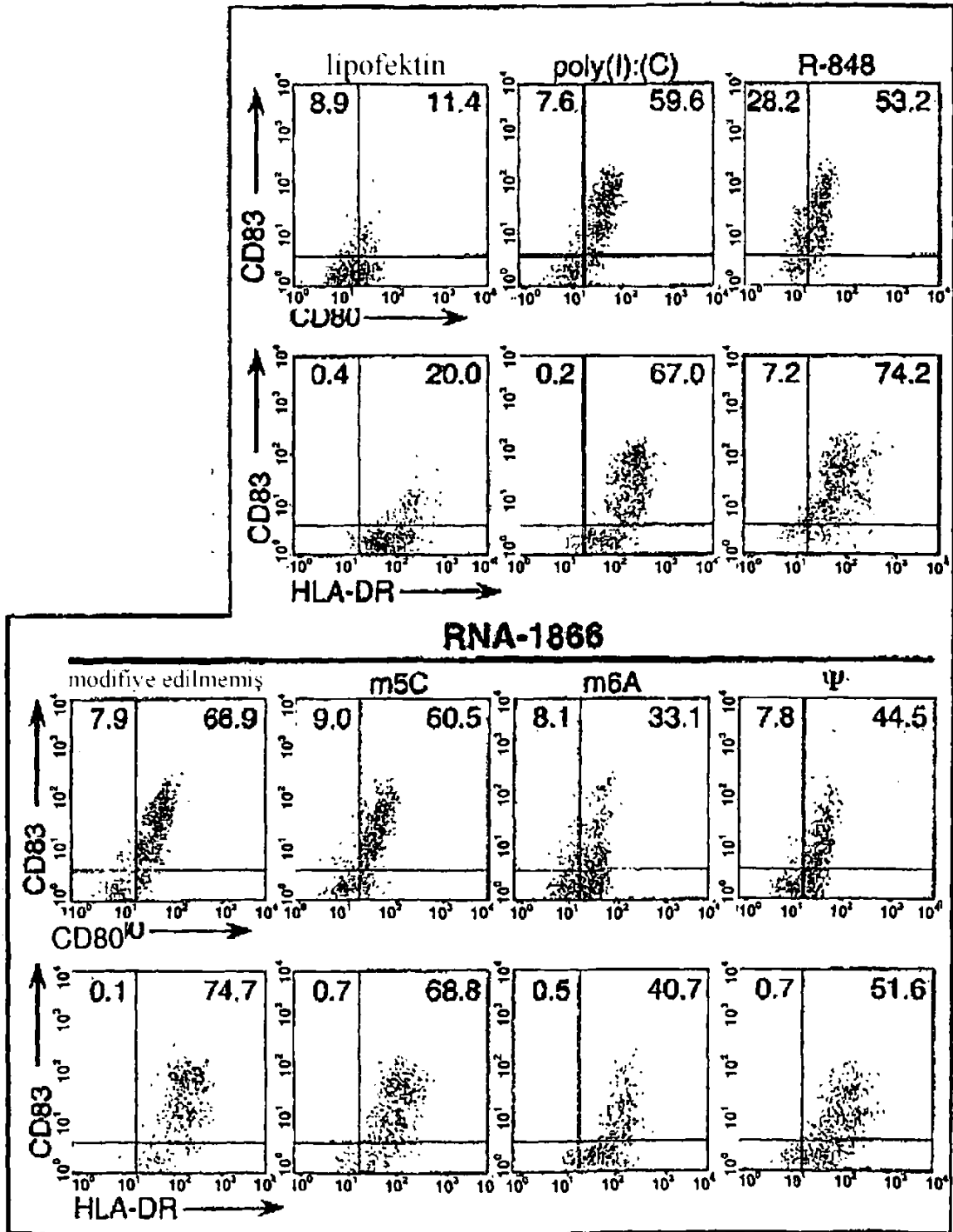
ŞEKİL 1



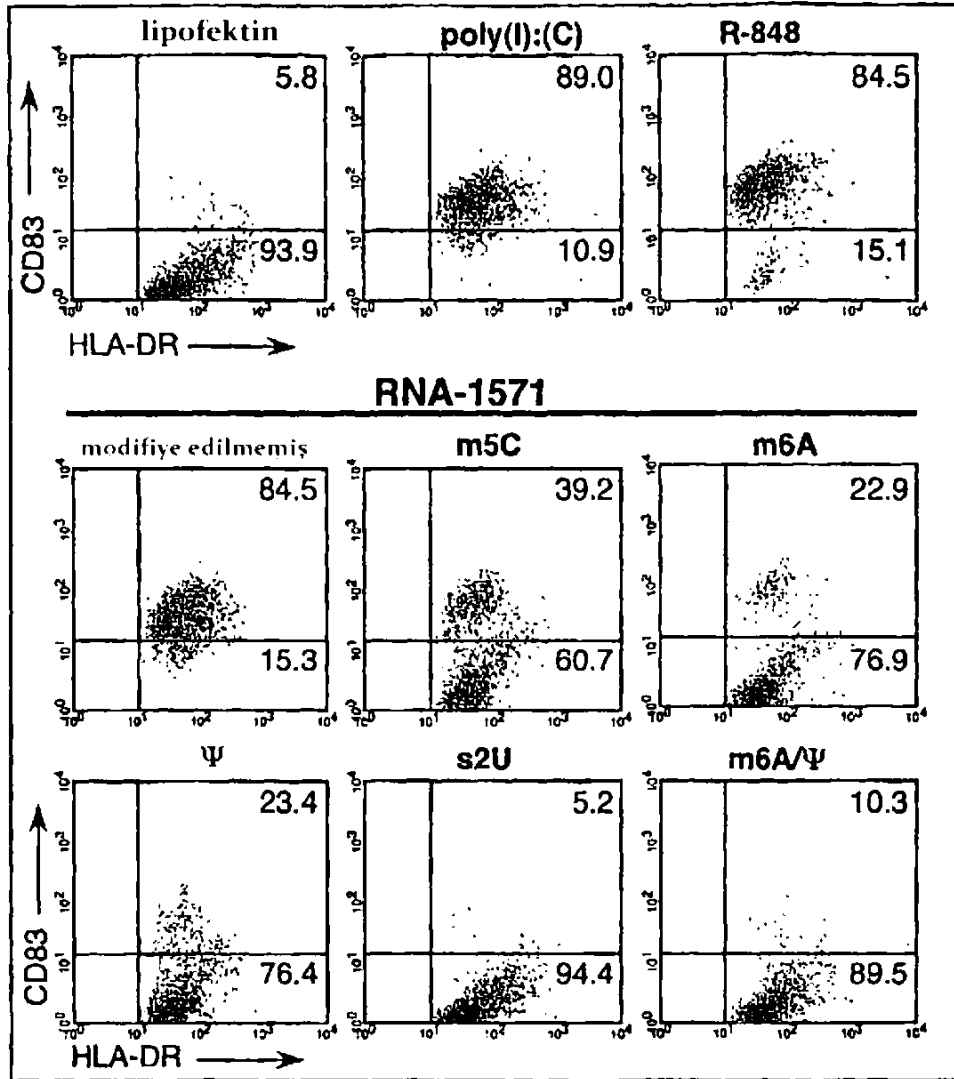
ŞEKİL 2



ŞEKİL 3A-D

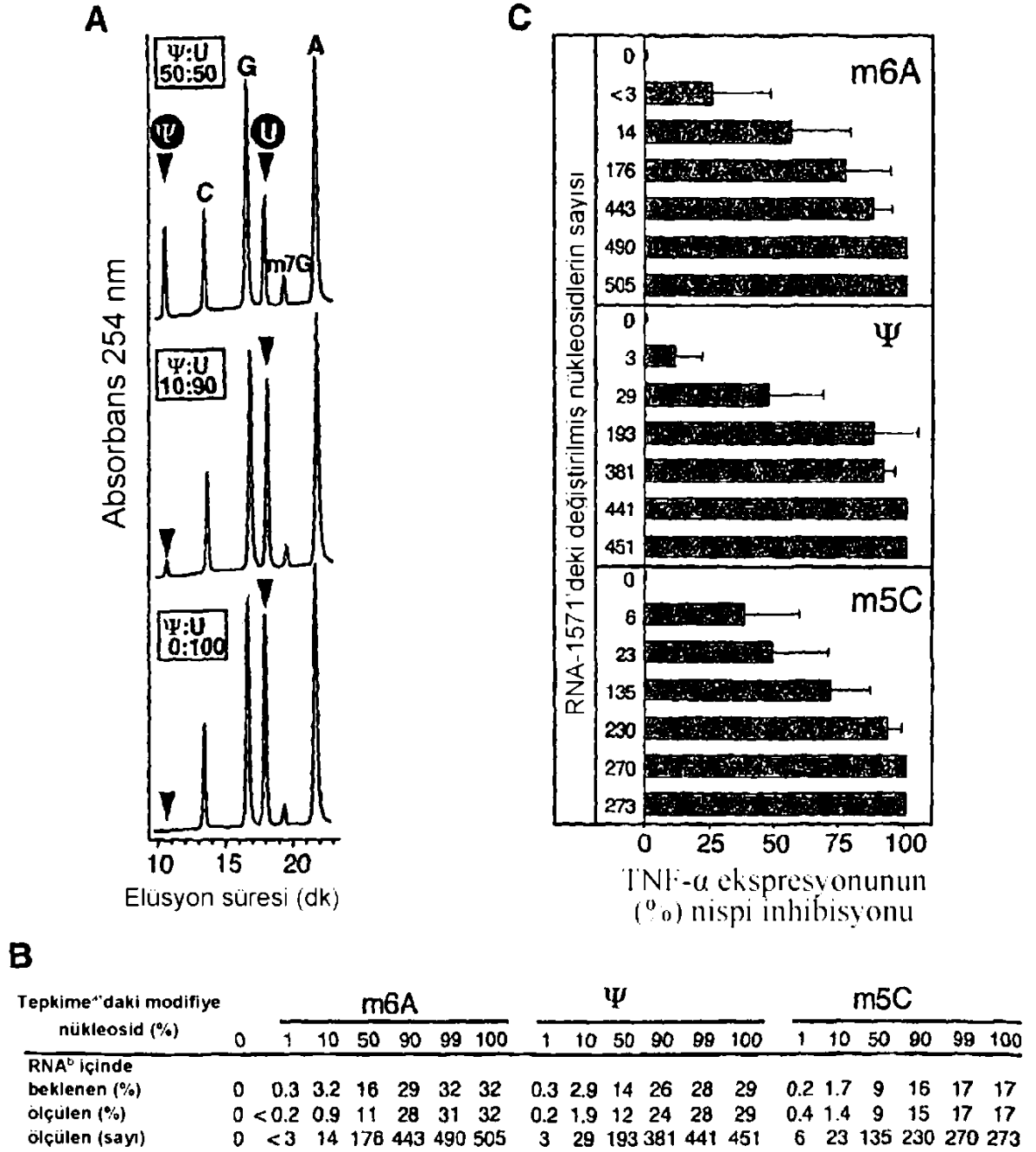


ŞEKİL 3E

A**B**

	TNF- α ⁺	CD80	CD86
	pg/ml	ortalama floresans	
lipofektin	0	7.6	55.3
poli(I):(C)	45.6	59.4	257.4
R848	48.3	55.2	235.4
RNA-1866			
<i>modifive</i>	26.7	52.7	246.4
<i>m5C</i>	0	16.4	108.6
<i>m6A</i>	0	12.4	78.4
<i>ψ</i>	0	12.0	87.5
<i>s2U</i>	0	8.0	62.7
<i>m6A/ψ</i>	0	8.6	68.4

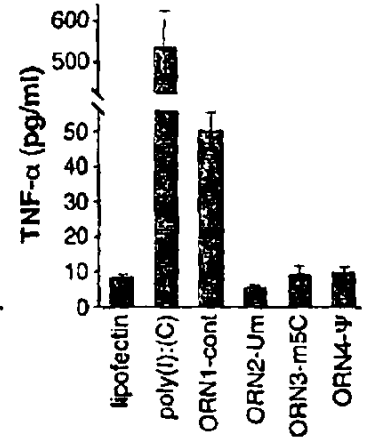
ŞEKİL 4



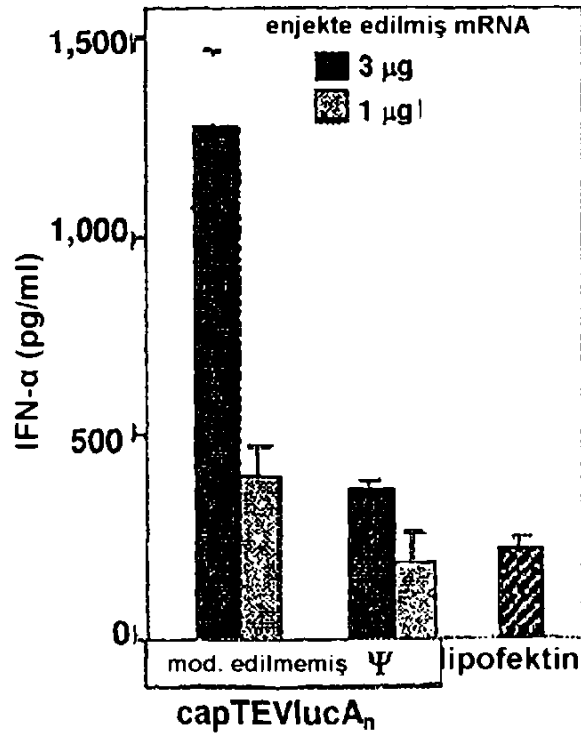
ŞEKİL 5

A

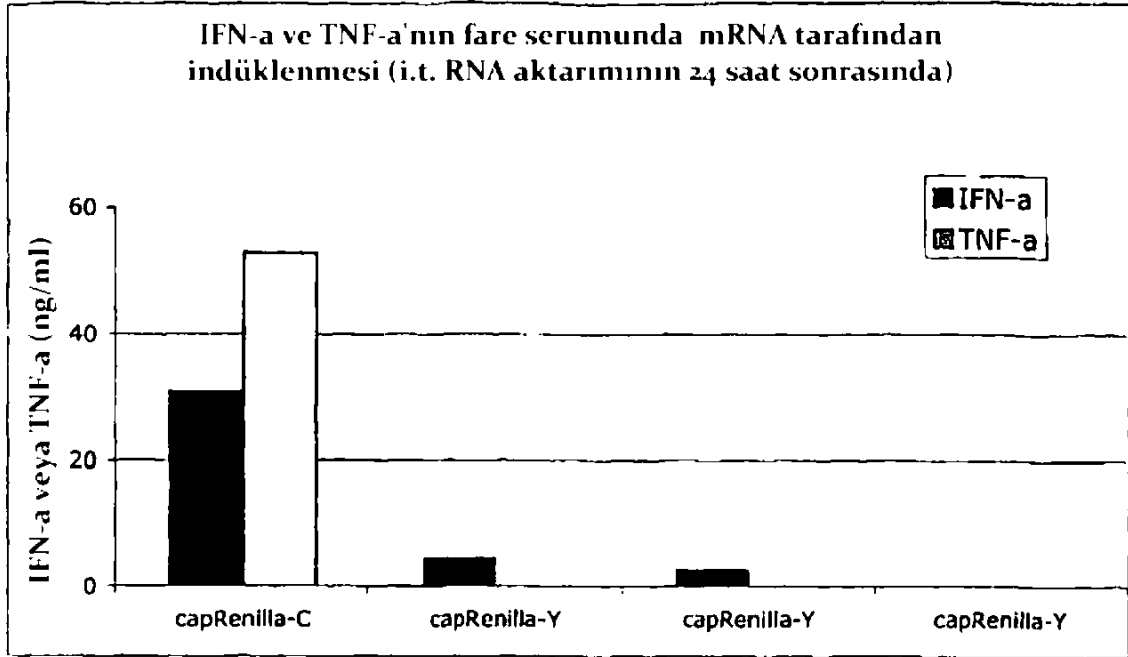
ORN1-kontrol	5' pUGGAUCCGGCUUUGAGAUCUU
ORN2-Um	5' pUGGAUCCGGCUmUUGAGAUCUU
ORN3-m5C	5' pUGGAUm5C CGGCUUUGAGAUCUU
ORN4-ψ	5' pUGGAUCCGGCUUUGAGAUCUU
ORN5	5' pppGGGAGACAGGGGUGUCCGCCAUUCCAGGUU
ORN6	5' pppGGGAGACAGGCUAUAACUCAUAUUGUAUU

B**C**

ŞEKİL
6

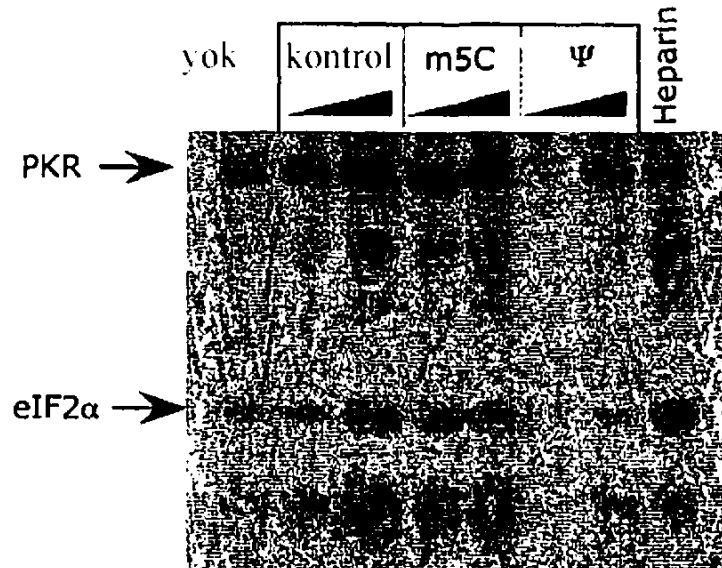


ŞEKİL 7A

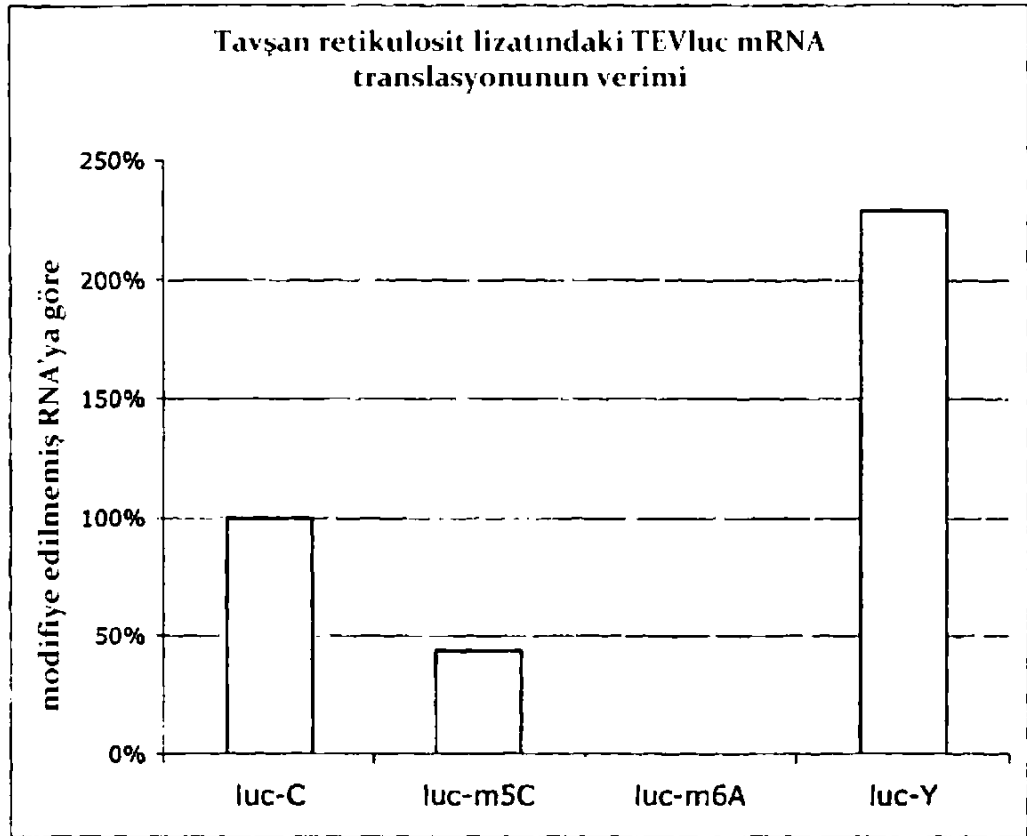


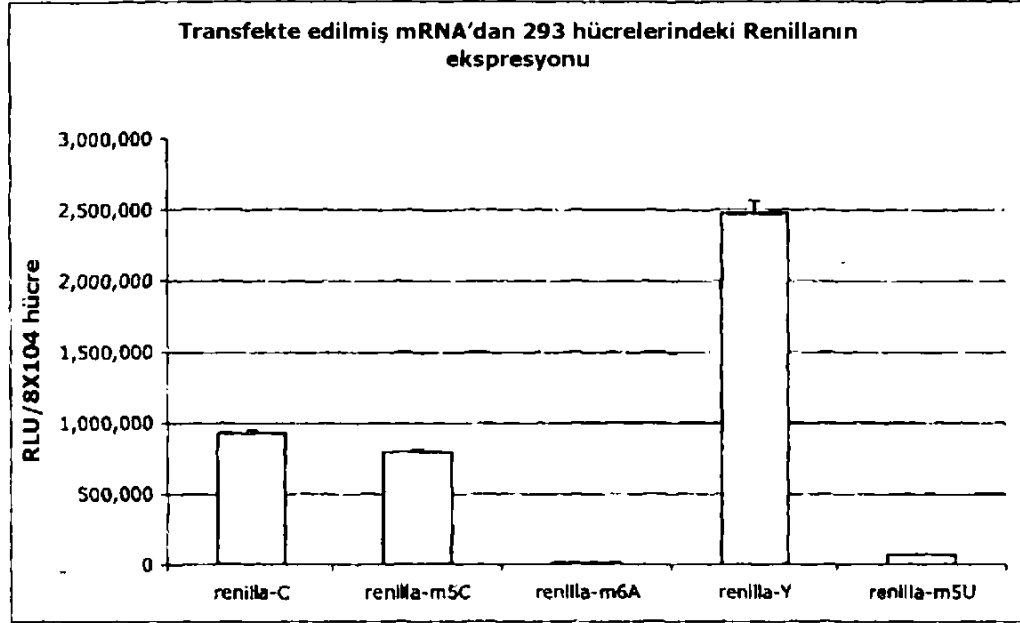
ŞEKİL 7B

mRNA'lar tarafından PKR'nin aktivasyonu

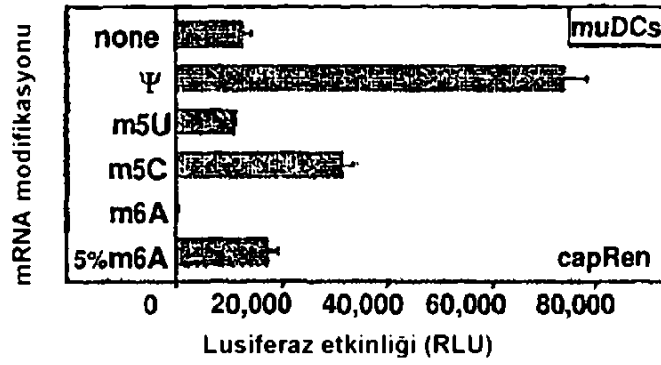


ŞEKİL 8

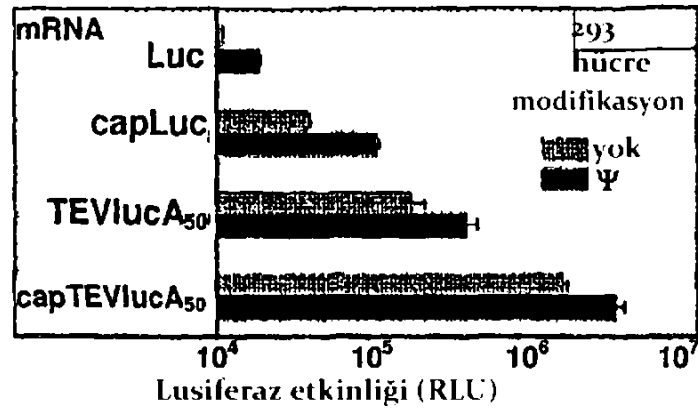
**ŞEKİL 9**



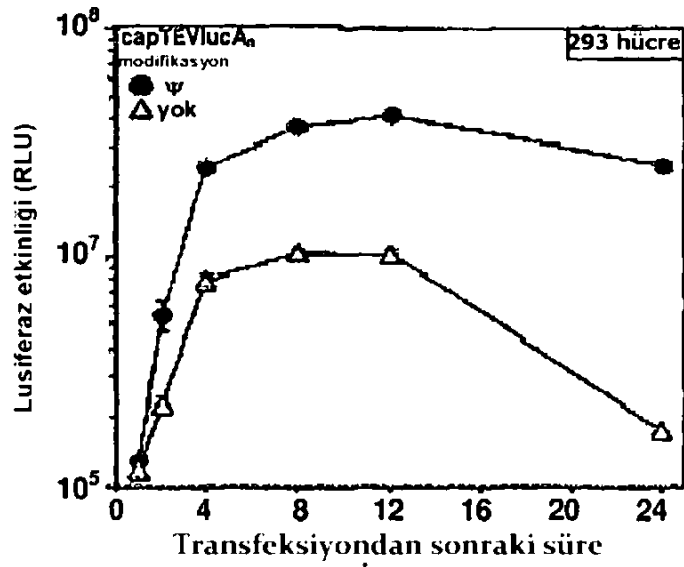
ŞEKİL 10A



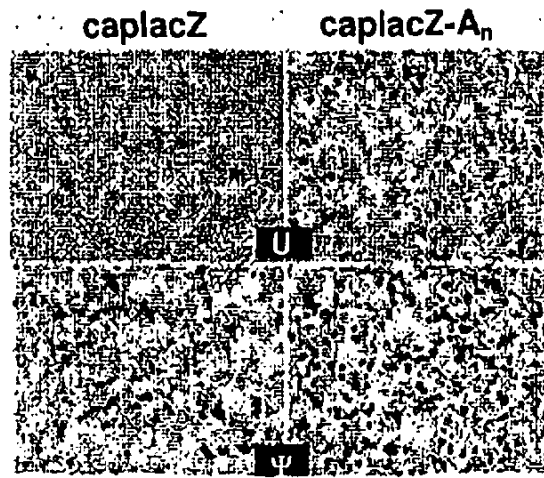
ŞEKİL 10B



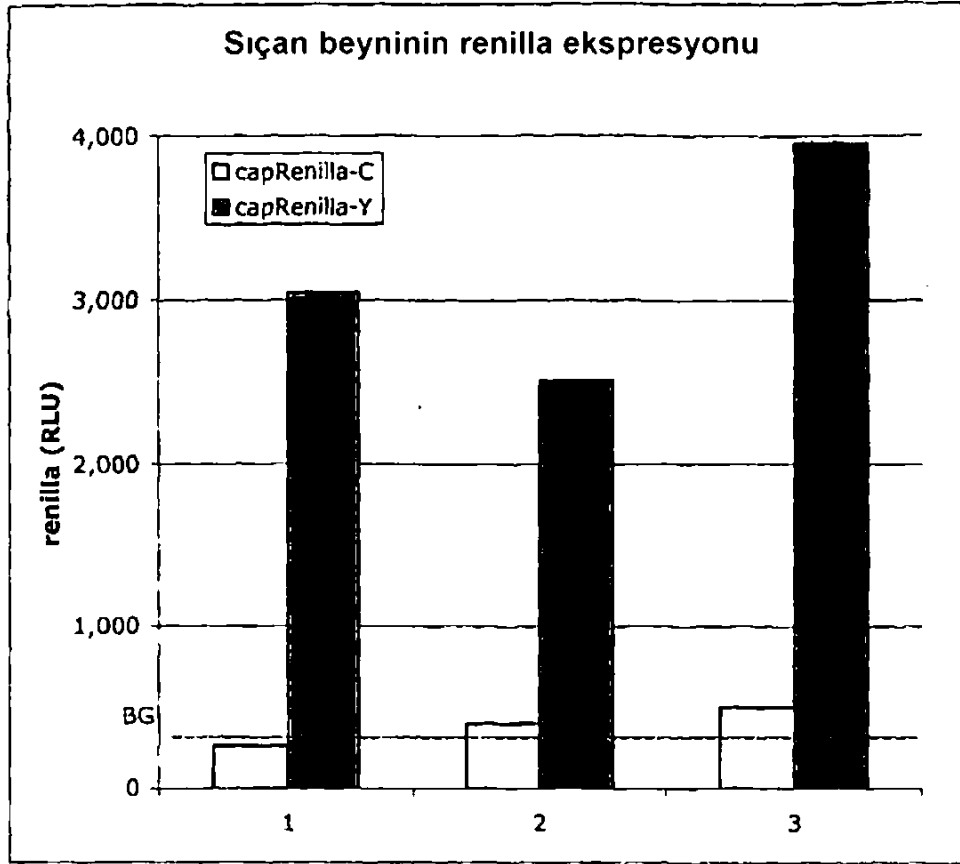
ŞEKİL 11A



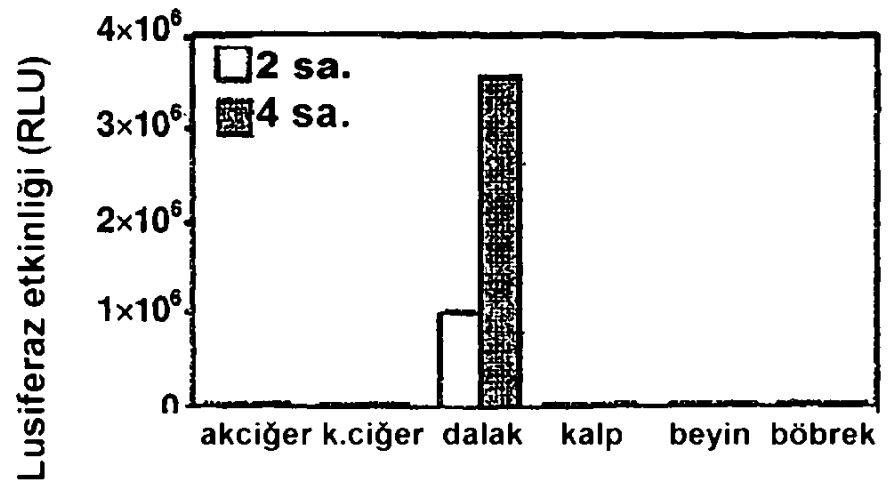
ŞEKİL 11B



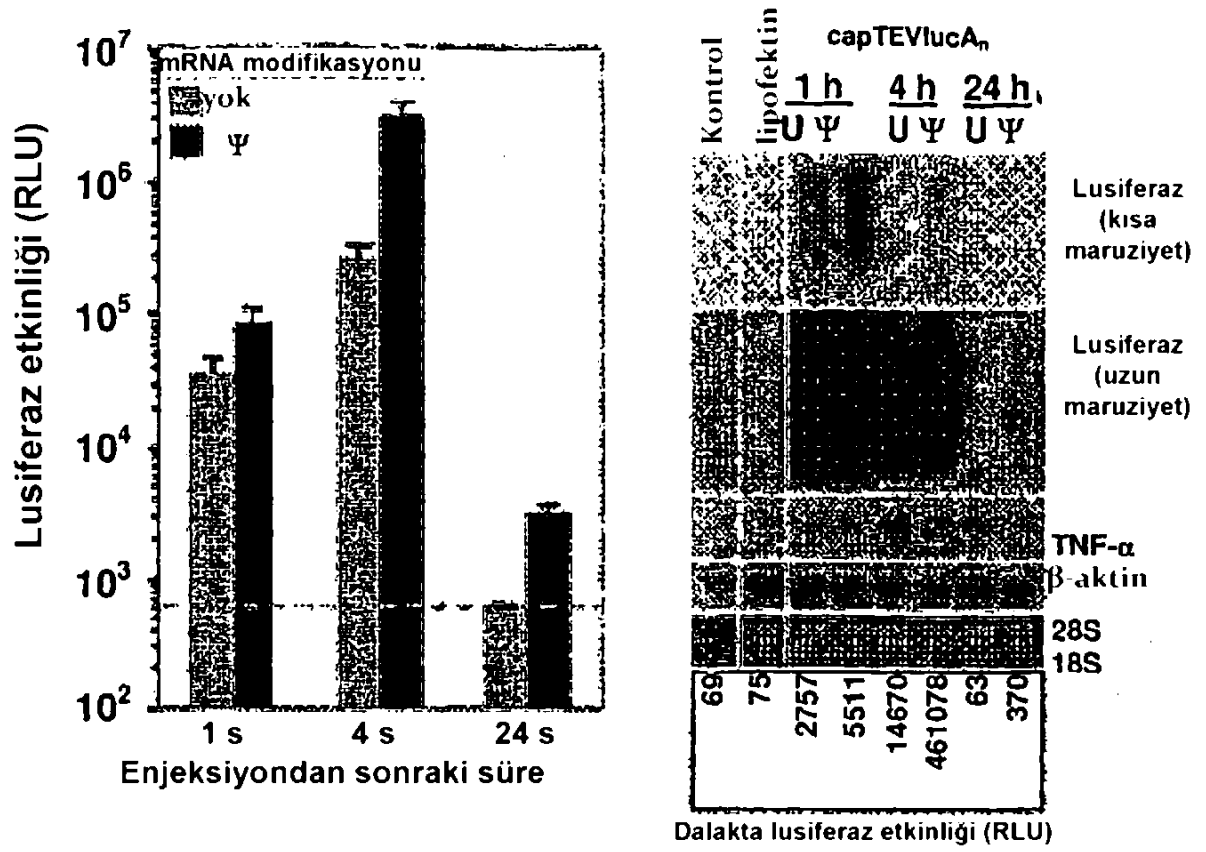
ŞEKİL 11C



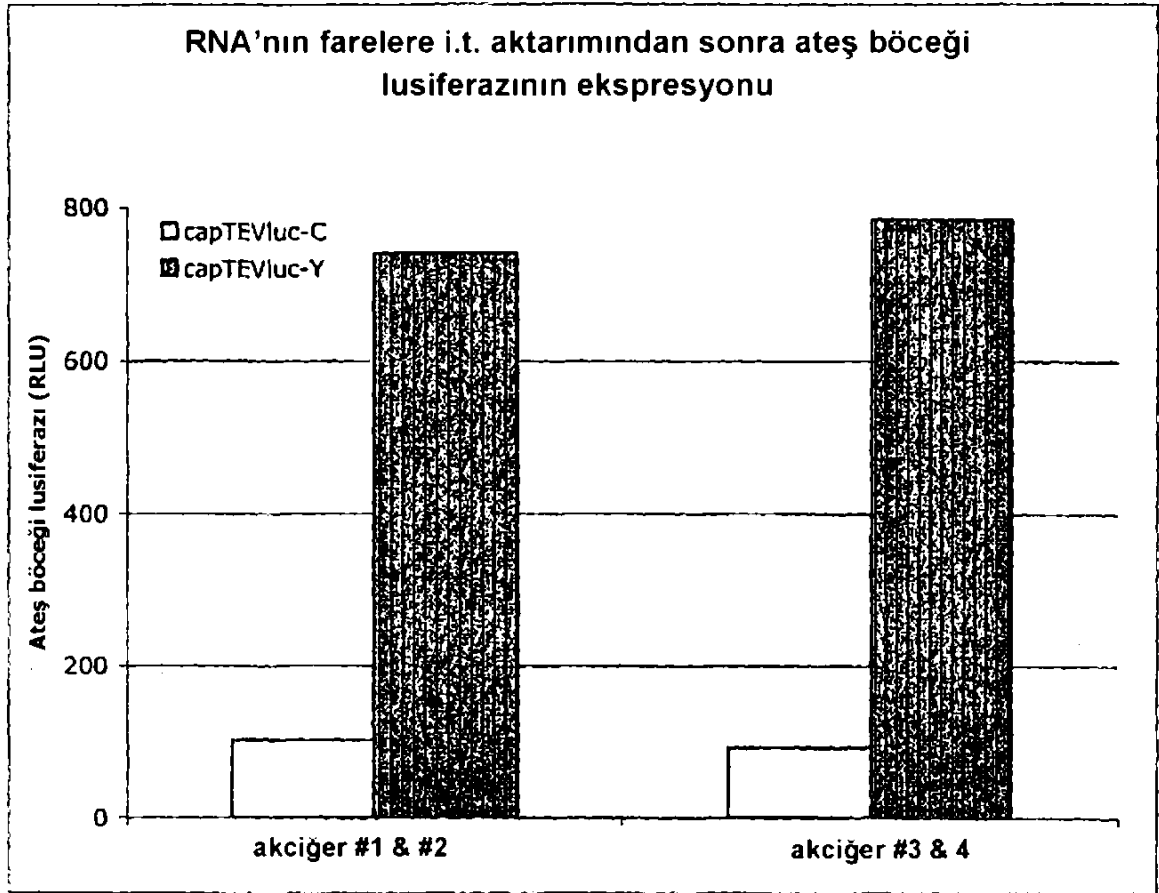
ŞEKİL 12A



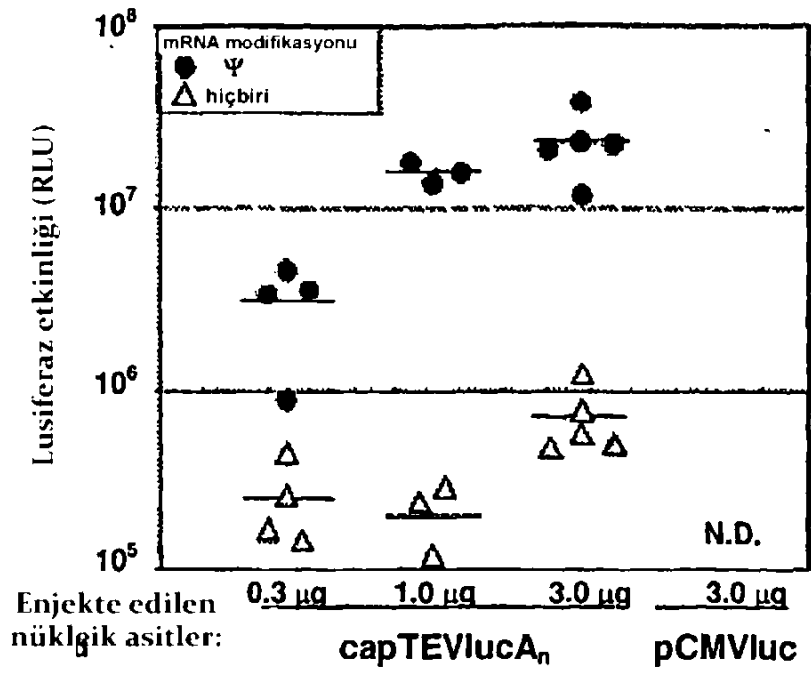
ŞEKİL 12B



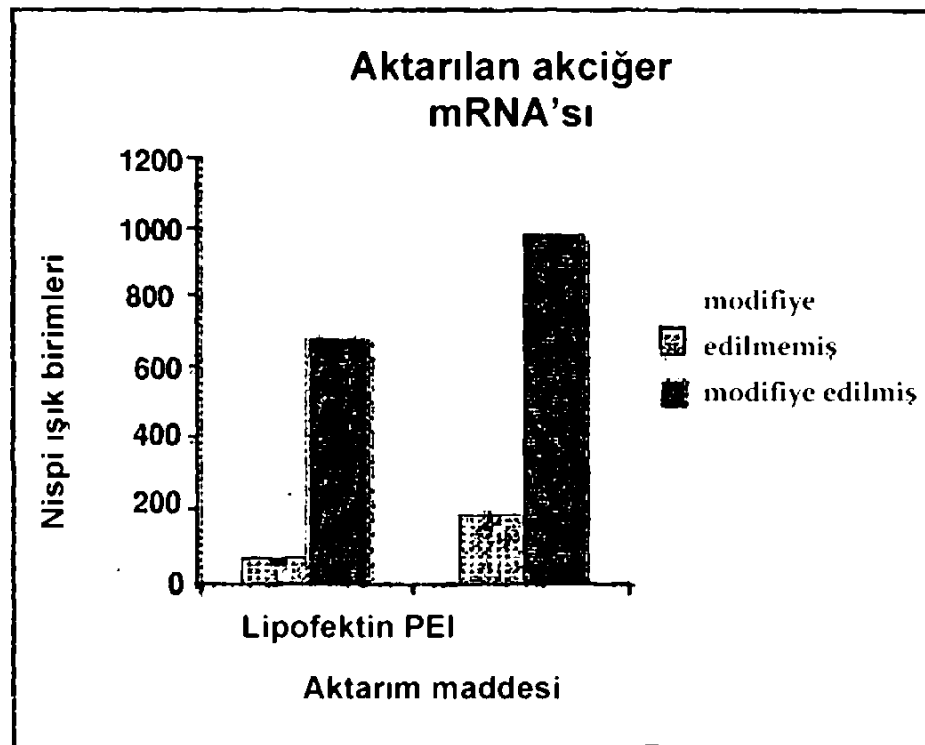
ŞEKİL 12C



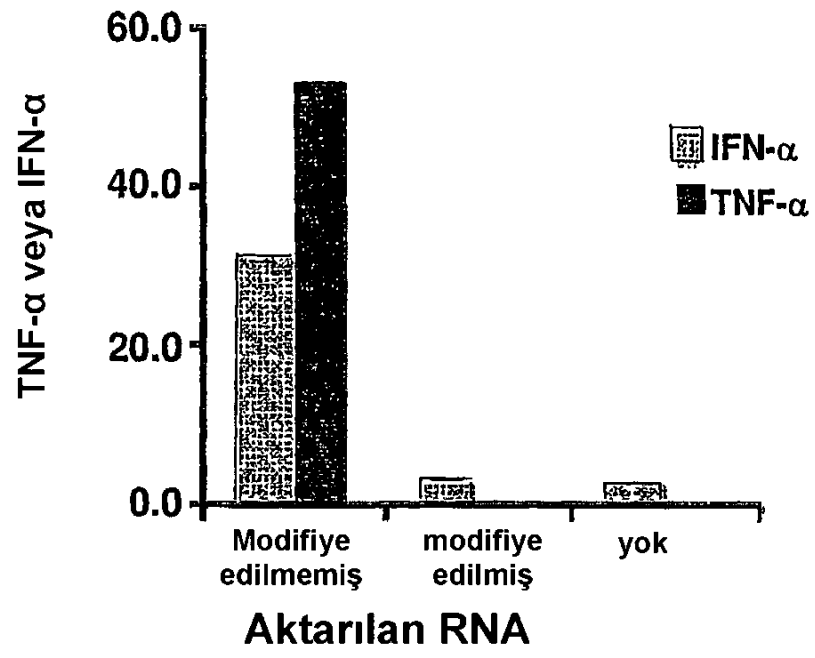
ŞEKİL 12D



ŞEKİL 13



ŞEKİL 14



ŞEKİL 15