

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 955**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2011** **E 18179157 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020** **EP 3431485**

54 Título: **Ácidos nucleicos manipulados y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

01.10.2010 US 40441310 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.10.2021

73 Titular/es:

**MODERNATX, INC. (100.0%)
200 Technology Square
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**SCHRUM, JASON;
SIECZKIEWICZ, GREGORY, J.;
EJEBE, KENECHI y
ELBASHIR, SAYDA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 862 955 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ácidos nucleicos manipulados y métodos de uso de los mismos

5 Antecedentes de la Invención

Las moléculas de ARN de origen natural son sintetizadas a partir de cuatro ribonucleótidos básicos: ATP, CTP, UTP y GTP, pero pueden contener nucleótidos modificados después de la transcripción. Además, aproximadamente cien modificaciones de nucleótidos diferentes han sido identificadas en ARN (Rozenski, J. Crain, P. y McCoskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update. Nucl Acids Res 27:196-197). El papel de las modificaciones de nucleósidos en el potencial inmunoestimulador y en la eficiencia de traducción de ARN, sin embargo, no está claro.

Existen varios problemas con las metodologías anteriores para llevar a cabo expresión de proteínas. Por ejemplo, ADN heterólogo introducido en una célula puede ser heredado por células hijas (ya sea o no que el ADN heterólogo se haya integrado en el cromosoma) o por descendencia. El ADN introducido puede integrarse en el ADN genómico de la célula hospedadora en cierta frecuencia, dando como resultado alteraciones y/o daño en el ADN genómico de la célula hospedadora. Además, deben llevarse a cabo varias etapas antes de que se produzca una proteína. Una vez dentro de la célula, el ADN debe ser transportado al interior del núcleo en donde es transcrito en ARN. El ARN transcrito a partir de ADN debe entrar después en el citoplasma en donde es traducido para formar proteína. Esta necesidad de varias etapas de procesamiento crea tiempos de retraso antes de la generación de una proteína de interés. Además, es difícil obtener la expresión de ADN en células. Frecuentemente el ADN entra en las células pero no es expresado o no es expresado a velocidades o concentraciones razonables. Esto puede ser un problema particular cuando se introduzca ADN en células tales como células primarias o líneas celulares modificadas.

Existe la necesidad en la técnica de modalidades biológicas para resolver la modulación de traducción intracelular de ácidos nucleicos.

El documento WO 2008/083949 se refiere al uso de un ARN (secuencia) para expresión intracelular de un anticuerpo, en donde el ARN (secuencia) codifica un anticuerpo o contiene al menos una región codificante, que codifica al menos un anticuerpo, respectivamente.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece esta divulgación. Aunque pueden usarse en la práctica o pruebas de la presente divulgación métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí, se describen en la presente métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean limitativos. Otras características de la invención son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

40 Sumario de la invención

En función de la divulgación que está contenida en el presente documento, la presente invención proporciona un equipo para administrar dos construcciones de ARNm modificadas *in vivo* para provocar la traducción intracelular de las construcciones de ARNm en cadenas pesadas y ligeras de una proteína de inmunoglobulina, comprendiendo el equipo un primer ácido nucleico aislado que es ARNm traducible que i) codifica una cadena pesada de inmunoglobulina o una cadena ligera de inmunoglobulina y ii) comprende un nucleósido modificado, en donde el primer ácido nucleico es capaz de evadir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el primer ácido nucleico aislado, en donde el ARNm traducible está desprovisto de nucleótidos de citidina o uracilo.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una preparación farmacéutica para administrar dos construcciones de ARNm modificadas *in vivo* para provocar traducción intracelular de las construcciones de ARNm en cadenas pesadas y ligeras de una proteína de inmunoglobulina, comprendiendo la preparación una cantidad eficaz de un primer ácido nucleico que es un ARNm traducible que i) codifica una cadena pesada de inmunoglobulina o una cadena ligera de inmunoglobulina y ii) comprende un nucleósido modificado, en donde el primer ácido nucleico presenta degradación reducida por una nucleasa celular y es capaz de evadir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el primer ácido nucleico, en donde el ARNm traducible está desprovisto de nucleótidos de citidina o uracilo.

La presente invención y algunas realizaciones preferidas de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Se describen en la presente métodos para producir proteínas, polipéptidos y péptidos. Por ejemplo, el método incluye introducir un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico modificado descrito en la presente) que codifica una proteína, polipéptido o péptido de interés en una célula (por ejemplo, una célula humana), en condiciones en las que la proteína, polipéptido o péptido de interés se produzca (por ejemplo, traduzca) en la célula. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una o más modificaciones de nucleósidos (por ejemplo, una o más modificaciones de nucleósidos descritas en la presente). En algunos casos, el ácido nucleico es capaz de evadir una respuesta

inmunitaria innata de una célula en la cual se introduzca el ácido nucleico. En algunos casos, la proteína, polipéptido o péptido es una proteína terapéutica descrita en la presente. En algunos casos, la proteína, polipéptido o péptido comprende una o más modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, modificaciones post-traduccionales presentes en células humanas). Se describen también en la presente composiciones y kits para la producción de proteínas. Se describen además en la presente células y cultivos con niveles de proteínas alterados (por ejemplo, generadas mediante un método descrito en la presente).

En un aspecto, la invención incorpora un método para producir una proteína (por ejemplo, una proteína heteróloga) de interés en una célula, el método comprende las etapas de: (i) proporcionar una célula objetivo con capacidad de traducción de proteínas; y (ii) introducir en la célula objetivo una composición que comprenda un primer ácido nucleico aislado que comprenda una región traducible que codifique la proteína de interés y una modificación de nucleósido, en condiciones tales que la proteína de interés se produzca en la célula. En algunos casos, el método comprende además la etapa de purificar sustancialmente la proteína de interés a partir de la célula. En algunos casos, la proteína de interés es una proteína secretada.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de una proteína (por ejemplo, una proteína heteróloga) de interés en una célula, comprendiendo el método las etapas de: (i) proporcionar una célula objetivo con capacidad de traducción de proteínas; y (ii) introducir en la célula objetivo una composición que comprenda: (a) un primer ácido nucleico aislado que comprenda una región traducible que codifique la proteína de interés y una modificación de nucleósido; y (b) un segundo ácido nucleico que comprenda un ácido nucleico inhibidor, en condiciones tales que la proteína de interés se produzca en la célula. En algunos casos, el método comprende además la etapa de purificar sustancialmente la proteína de interés a partir de la célula. En algunos casos, la proteína de interés es una proteína secretada.

En un aspecto, la divulgación incorpora un método para incrementar la producción de una proteína de interés expresada recombinantemente en una célula, que comprende las etapas de: (i) proporcionar una célula objetivo que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica la proteína de interés; y (ii) introducir en la célula objetivo una composición que comprende un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible que codifica una proteína efectora de traducción y una modificación de nucleósido en condiciones tales que la proteína efectora se produzca en la célula, incrementando así la producción de la proteína expresada recombinantemente en la célula.

En algunos casos, la célula objetivo es una célula de mamífero. En algunos casos, la célula objetivo es una célula de levadura. En algunos casos, la célula objetivo es una célula bacteriana, una célula de insecto o una célula vegetal. En algunos casos, la proteína de interés es una proteína secretada. En algunos casos, la proteína de interés es una proteína de transmembrana. En algunos casos, la proteína de interés es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos casos, la proteína de interés es un factor de crecimiento o citocina. En algunos casos, la proteína de interés es un péptido o peptidomimético. En algunos casos, la proteína efectora de traducción es proteína de transferencia de ceramida (CERT). En algunos casos, la proteína efectora de traducción es traducida en la célula objetivo en una cantidad eficaz para incrementar la eficiencia de traducción de la proteína expresada recombinantemente. En algunos casos, la proteína efectora de traducción se traduce en la célula objetivo en una cantidad eficaz para reducir la eficiencia de traducción de proteínas en la célula que no sea la proteína expresada recombinantemente. En algunos casos, la proteína efectora de traducción se traduce en la célula objetivo en una cantidad eficaz para reducir la formación de cuerpos de inclusión que contengan la proteína expresada recombinantemente. En algunos casos, la proteína efectora de traducción se traduce en la célula objetivo en una cantidad eficaz para reducir la degradación intracelular de la proteína expresada recombinantemente. En algunos casos, la proteína efectora de traducción es traducida en la célula objetivo en una cantidad eficaz para incrementar la secreción de la proteína expresada recombinantemente.

En otro aspecto, la invención incorpora un método para alterar el nivel de una proteína de interés en una célula objetivo, comprendiendo el método las etapas de: (i) modular la actividad de al menos una molécula efectora de traducción en la célula objetivo; y (ii) cultivar la célula. En algunos casos, la célula objetivo no contiene un ácido nucleico recombinante. En algunos casos, el método comprende además la etapa de aislar la proteína de interés.

En otro aspecto, la divulgación incorpora un método para modular el nivel de una proteína de interés en una célula objetivo, que comprende las etapas de: i) modular la actividad de al menos una molécula efectora de traducción en la célula objetivo, en donde la modulación comprende introducir en la célula objetivo un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible que codifica la proteína efectora de traducción y una modificación de nucleósido; y (ii) cultivar la célula.

En un aspecto, la divulgación incorpora una célula animal (por ejemplo, una célula de mamífero) con un nivel de proteínas alterado, generada por las etapas de: (i) introducir en la célula una cantidad efectiva de un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible que codifica una proteína efectora de traducción y una modificación de nucleósido; y (ii) cultivar la célula. En algunos casos, la cantidad eficaz del primer ácido nucleico aislado introducido en la célula se valora frente a una cantidad deseada de proteína traducida a partir de la región traducible.

En un aspecto, la invención incorpora un cultivo de alta densidad que comprende una pluralidad de las células descritas en la presente. En algunos casos, el cultivo comprende un proceso intermitente. En algunos casos, el cultivo comprende un proceso de alimentación continua.

5 En un aspecto, la invención incorpora una composición para producción de proteínas, comprendiendo la composición un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación de nucleósido, en donde el ácido nucleico exhibe degradación reducida por una nucleasa celular, y una célula de mamífero adecuada para traducción de la región traducible del primer ácido nucleico. En algunos casos, la célula de mamífero comprende un ácido nucleico recombinante.

10 En otro aspecto, la divulgación incorpora una composición para producción de proteínas, comprendiendo la composición: (i) un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación de nucleósido, en donde el ácido nucleico exhibe declaración reducida por una nucleasa celular; (ii) un segundo ácido nucleico que comprende un ácido nucleico inhibidor; y (iii) una célula de mamífero adecuada para la traducción de la
15 región traducible del primer ácido nucleico, en donde la célula de mamífero comprende un ácido nucleico objetivo en el que es capaz de actuar el ácido nucleico inhibidor. En algunos casos, la célula de mamífero comprende un ácido nucleico recombinante.

20 En un aspecto, la invención incorpora un kit para la producción de proteínas, comprendiendo el kit un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación de ácido nucleico, en donde el ácido nucleico es capaz de evadir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la cual se introduzca el primer ácido nucleico aislado, y el envase e instrucciones para lo mismo.

25 En otro aspecto, la divulgación incorpora un kit para la producción de proteínas, comprendiendo el kit: (i) un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible, provisto en una cantidad eficaz para producir una cantidad deseada de una proteína codificada por la región traducible cuando se introduzca en una célula objetivo; (ii) un segundo ácido nucleico que comprende un ácido nucleico inhibidor, provisto en una cantidad eficaz para inhibir sustancialmente la respuesta inmunitaria innata de la célula y (iii) envase e instrucciones para el mismo.

30 En otro aspecto más, la divulgación incorpora un kit para producción de proteínas, comprendiendo el kit un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación de nucleósido, en donde el ácido nucleico exhibe degradación reducida por una nucleasa celular, y envase e instrucciones para el mismo.

35 En un aspecto, la divulgación incorpora un kit para la producción de proteínas, comprendiendo el kit un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y por lo menos dos modificaciones de nucleósidos diferentes, en donde el ácido nucleico exhibe degradación reducida por una nucleasa celular, y envase e instrucciones para el mismo.

40 En otro aspecto, la divulgación incorpora un kit para producción de proteínas, comprendiendo el kit: (i) un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible; (ii) un segundo ácido nucleico aislado que comprende un ácido nucleico inhibidor; y (iii) envase e instrucciones para el mismo.

45 En otro aspecto más, la divulgación incorpora un kit para la producción de proteínas, comprendiendo el kit: (i) un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y al menos una modificación de nucleósido, en donde el ácido nucleico exhibe degradación reducida por una nucleasa celular; (ii) un segundo ácido nucleico que comprende un ácido nucleico inhibidor; y (iii) envase e instrucciones para el mismo.

50 En un aspecto, la divulgación incorpora un kit para producción de proteínas, que comprende un primer ácido nucleico aislado que codifica una región traducible que codifica una proteína, en donde el primer ácido nucleico comprende una modificación de ácido nucleico, en donde el primer ácido nucleico presenta degradación reducida en una célula en la cual el primer ácido nucleico aislado es introducido en comparación con un ácido nucleico que no comprende una modificación de ácido nucleico, y envase e instrucciones para el mismo.

55 En otro aspecto, la divulgación incorpora un kit para la producción de proteínas, que comprende un primer ácido nucleico aislado que codifica una región traducible que codifica una proteína, en donde el primer ácido nucleico comprende una modificación de ácido nucleico, en donde el primer ácido nucleico es más estable en una célula en la cual el primer ácido nucleico aislado es introducido en comparación con un ácido nucleico que no comprende una modificación de ácido nucleico, y envase e instrucciones para el mismo.

60 En un aspecto, la divulgación incorpora un kit para la producción de proteínas de inmunoglobulina, que comprende un primer ácido nucleico aislado que comprende (i) una región traducible que codifica la proteína de inmunoglobulina y (ii) una modificación de ácido nucleico, en donde el primer ácido nucleico es capaz de evadir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la cual se introduzca el primer ácido nucleico aislado, en donde la región traducible está sustancialmente libre de nucleótidos de citidina y uracilo, y envase e instrucciones para el mismo.

65 En otro aspecto, la divulgación incorpora una célula de mamífero generada mediante el uso de un kit descrito en la

presente.

En otro aspecto más, la divulgación incorpora una proteína de inmunoglobulina aislada producida a partir de una célula de producción que comprende un primer ácido nucleico aislado que comprende i) una región traducible que codifica la proteína de inmunoglobulina y (ii) una modificación de ácido nucleico, en donde el primer ácido nucleico es capaz de evadir una respuesta inmunitaria innata de la célula, en donde la región traducible está sustancialmente libre ya sea de nucleótidos de citidina o uracilo o la combinación de nucleótidos de citidina y uracilo.

En un aspecto, la divulgación incorpora una preparación farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína descrita en la presente.

En otro aspecto, la divulgación incorpora una preparación farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un primer ácido nucleico que comprende: i) una región traducible que codifica una proteína de inmunoglobulina y ii) una modificación de ácido nucleico, en donde el primer ácido nucleico exhibe degradación reducida por una nucleasa celular y es capaz de evadir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la cual se introduzca el primer ácido nucleico, en donde la región traducible está sustancialmente libre de nucleótidos de citidina y uracilo.

Casos de los anteriormente mencionados métodos, células, cultivos, composiciones, preparaciones y kits pueden incluir una o más de las siguientes características:

En algunos casos, el primer ácido nucleico aislado comprende ARN mensajero (ARNm). En algunas modalidades o casos, el ARNm comprende al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propiniluridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tiouridina, 1-taurinometil-4-tiouridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-desaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-pseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina y 4-metoxi-2-tio-pseudouridina. En algunas modalidades o casos, el ARNm comprende al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina. En algunas modalidades o casos, el ARNm comprende al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-desaza-adenina, 7-desaza-8-aza-adenina, 7-desaza-2-aminopurina, 7-desaza-8-aza-2-aminopurina, 7-desaza-2,6-diaminopurina, 7-desaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina y 2-metoxi-adenina. En algunas modalidades o casos, el ARNm comprende al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en inosina, 1-metil-inosina, wiosina, wibutosina, 7-desaza-guanosina, 7-desaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-desaza-guanosina, 6-tio-7-desaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** ilustra gráficas de barras de una detección por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) de G-CSF humana en células de ovario de hámster chino transfectadas *in vitro* con ARNmod que codifica G-CSF humano 12 y 24 horas después de la transfección.

La **figura 2** ilustra gráficas de barras de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para IgG humana de células de ovario de hámster chino transfectadas *in vitro* con las cadenas pesada y ligera de ARNmod que codifica trastuzumab 12, 24 y 36 horas después de la transfección.

La **figura 3** ilustra gráficas de barras de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detección de IgG humana de células de riñón embrionario humano transfectadas *in vitro* (HEK293, por sus siglas en inglés) con cadenas pesada y ligera de ARNmod que codifica trastuzumab 36 horas después de la transfección. R1, R2, R3 son experimentos de transfección triplicados llevados a cabo en una placa de 24 pocillos y normalizados a muestras no tratadas.

La **figura 4** ilustra una imagen de una detección por transferencia de Western de células de ovario de hámster chino transfectadas *in vitro* con las cadenas pesada y ligera de ARNmod que codifica trastuzumab 24 horas después de la transfección. HC y LC indican la cadena pesada y la cadena ligera de trastuzumab respectivamente.

La **figura 5** ilustra imágenes a partir de la tinción inmunológica de células de ovario de hámster chino transfectadas *in vitro* con las cadenas pesada y ligera de ARNmod que codifican tanto trastuzumab como rituximab 13 horas después de la transfección.

- 5 La **figura 6** ilustra imágenes de un ensayo de inmunoabsorción por unión de ARNmod que codifica trastuzumab y rituximab. Los cuadros negros presentan la proteína de interés.

Descripción detallada

- 10 Se describen en la presente métodos para producir proteínas, polipéptidos y péptidos. La divulgación proporciona, al menos en parte, métodos para producir una proteína, polipéptido o péptido (por ejemplo, una proteína heteróloga) de interés en una célula, métodos que incrementan la producción de una proteína, polipéptido o péptido (por ejemplo, una proteína expresada recombinantemente) de interés en una célula, y métodos para alterar el nivel de una proteína, polipéptido o péptido de interés en una célula. Por ejemplo, los métodos pueden incluir la etapa de introducir un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico modificado descrito en la presente) que codifica una proteína, polipéptido o péptido de interés en una célula (por ejemplo, una célula humana), en condiciones en las que la proteína, polipéptido o péptido de interés que se produzca (por ejemplo, traduzca) en la célula. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una o más modificaciones de nucleósidos (por ejemplo, una o más modificaciones de nucleósidos descritas en la presente). En algunos casos, el ácido nucleico es capaz de evadir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la cual se introduzca el ácido nucleico, incrementando de esta manera la eficiencia de la producción de proteínas en la célula. En algunos casos, la proteína es una proteína terapéutica descrita en la presente. En algunos casos, la proteína comprende una o más modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, modificaciones post-traduccionales presentes en células humanas). También se describen en la presente composiciones y kits para producción de proteínas. Se describen además en la presente células y cultivos con niveles de proteínas alterados (por ejemplo, generados mediante un método descrito en la presente).

- En general, ácidos nucleicos exógenos, particularmente ácidos nucleicos virales, introducidos en células inducen una respuesta inmunitaria innata, dando como resultado la producción de interferón (IFN, por sus siglas en inglés) y muerte celular. Sin embargo, es de gran interés para la producción de proteínas recombinantes suministrar un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN) dentro de una célula, por ejemplo, en cultivo celular, *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, para de esta manera causar traducción intracelular del ácido nucleico y producción de la proteína codificada. En la presente se proporcionan en parte ácidos nucleicos que codifican polipéptidos útiles capaces de modular la función y/o actividad de una célula, y métodos para hacer y usar estos ácidos nucleicos y polipéptidos. Como se describe en la presente, estos ácidos nucleicos son capaces de reducir la actividad inmunitaria innata de una población de células en las cuales son introducidos, incrementando así la eficiencia de producción de proteínas en esa población de células. Además, una o más actividades y/o propiedades adecuadas adicionales de los ácidos nucleicos y proteínas de la divulgación son descritas.

Métodos de producción de proteínas

- 40 Los métodos provistos en la presente son útiles para incrementar el rendimiento de productos proteínicos en un proceso de cultivo celular. En un cultivo celular que contiene una pluralidad de células hospedadoras, la introducción de las moléculas de ARNm modificadas descritas en la presente se traduce en eficiencia incrementada en la producción de proteínas con relación a un ácido nucleico no modificado correspondiente. Esta eficiencia de producción de proteínas incrementada puede ser demostrada, por ejemplo, al mostrar transfección celular incrementada, traducción de proteínas incrementada a partir del ácido nucleico, degradación de ácido nucleico reducida y/o respuesta inmunitaria innata reducida de la célula hospedadora. La producción de proteínas puede medirse mediante ELISA, y la actividad de la proteína puede medirse mediante varios ensayos funcionales conocidos en la técnica. La producción de proteínas puede generarse en un proceso continuo o un proceso semicontinuo.

Cultivo y crecimiento de células

- 55 En los métodos de la divulgación, las células son cultivadas. Las células pueden ser cultivadas en suspensión o como cultivos adherentes. Las células pueden ser cultivadas en una variedad de recipientes incluyendo, por ejemplo, biorreactores, bolsas celulares, bolsas de ondas, placas de cultivo, matraces, hipermatraces y otros recipientes bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Las células pueden cultivarse en IMDM (Invitrogen, número de catálogo 12440-53) o cualquier otro medio adecuado que incluya formulaciones de medios definidos químicamente. Las condiciones ambientales adecuadas para cultivo celular, tales como temperatura y composición atmosférica, también son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de la divulgación pueden usarse con cualquier célula que sea adecuada para su uso en producción de proteínas. En un caso, las células se seleccionan del grupo que consiste en células animales (por ejemplo, células de mamífero), células bacterianas, células vegetales, microbianas, de algas y fúngicas. En algunos casos, las células son células de mamífero, tales como células de ser humano, ratón, rata, cabra, caballo, conejo, hámster o vaca. Por ejemplo, las células pueden provenir de cualquier línea celular establecida, incluyendo, pero no limitada a células de HeLa, NS0, SP2/0, HEK 293T, Vero, Caco, Caco-2, MDCK, COS-1, COS-7, K562, Jurkat, CHO-K1, DG44, CHOK1SV, CHO-S,

Huvec, CV-1, HuH-7, NIH3T3, HEK293, 293, A549, HepG2, IMR-90, MCF-7, U-20S, Per.C6, SF9, SF21 u ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés). En ciertos casos, las células son células fúngicas, tales como células seleccionadas del grupo que consiste en: células de *Chrysosporium*, células de *Aspergillus*, células de *Trichoderma*, células de *Dictyostelium*, células de *Candida*, células de *Saccharomyces*, células de *Schizosaccharomyces* y células de *Penicillium*. En ciertos otros casos, las células son células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *B. subtilis* o BL21. Las células primarias y secundarias que serán transfectadas por el presente método pueden obtenerse a partir de una variedad de tejidos e incluyen todos los tipos de células que pueden mantenerse en cultivo. Por ejemplo, células primarias y secundarias que pueden ser transfectadas por el presente método incluyen fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales mamarias, células epiteliales intestinales), células endoteliales, células gliales, células neurales, elementos formados de la sangre (por ejemplo, linfocitos, células de médula ósea), células musculares y precursores de estos tipos de células somáticos. Las células primarias pueden obtenerse de un donante de la misma especie u otra especie (por ejemplo, ratón, rata, conejo, gato, perro, cerdo, vaca, ave, oveja, cabra, caballo).

Las células de la presente invención son útiles para la producción *in vitro* de productos terapéuticos que pueden ser purificados y suministrados mediante las rutas de administración convencionales. Con o sin amplificación, estas células pueden ser sujetas a cultivo a gran escala para cosecha de productos proteínicos intracelulares o extracelulares.

Métodos de suministro de ácido nucleico celular

Los métodos de la presente divulgación incrementan el suministro de ácido nucleico a una población celular, *in vivo*, *ex vivo* o en cultivo. Por ejemplo, un cultivo de células que contenga una pluralidad de células hospedadoras (por ejemplo, células eucarióticas tales como células de levadura o mamífero) se pone en contacto con una composición que contiene un ácido nucleico mejorado que tenga al menos una modificación de nucleósido y, opcionalmente, una región traducible. La composición también contiene generalmente un reactivo de transfección u otro compuesto que incremente la eficiencia de absorción de ácido nucleico mejorada en las células hospedadoras. El ácido nucleico mejorado exhibe retención mejorada en la población de células, con respecto a ácido nucleico no modificado correspondiente. La retención del ácido nucleico mejorado es mayor que la retención del ácido nucleico no modificado. En algunos casos, es de al menos aproximadamente 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 100 %, 150 %, 200 % o más de 200 % más alta que la retención del ácido nucleico no modificado. Esta ventaja de retención puede lograrse mediante un ciclo de retención con el ácido nucleico mejorado, o se puede obtener siguiendo ciclos de transfección repetidos.

Introducción en células de moléculas de ARN modificadas o transitorias para producción de proteínas

Pueden generarse células transfectadas transitoriamente mediante métodos de transfección, electroporación, agentes catiónicos, polímeros o moléculas de suministro a base de lípidos bien conocidos por los expertos en la técnica. Las moléculas de ARN transitorias modificadas pueden introducirse en las células cultivadas ya sea en etapas de tipo discontinuo tradicionales o en etapas de flujo continuo si es adecuado. Los métodos y composiciones de la presente divulgación pueden usarse para producir células con producción incrementada de una o más proteínas de interés. Las células pueden transfectarse o se les puede introducir de otra manera uno o más ARN. Las células pueden ser transfectadas con las dos o más construcciones de ARN simultánea o secuencialmente. En ciertos casos varias rondas de los métodos descritos en la presente pueden usarse para obtener células con expresión incrementada de una o más moléculas de ARN o proteínas de interés. Por ejemplo, las células pueden ser transfectadas con una o más construcciones de ARN que codifiquen un ARN o proteína de interés y aislarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Las células aisladas pueden someterse luego a rondas adicionales de transfección con uno o más de otro ARN que codifique un ARN o proteína de interés y aislarse una vez más. El método es útil, por ejemplo, para generar células con expresión incrementada de un complejo de proteínas, moléculas de ARN o proteínas en la misma vía biológica o una relacionada, moléculas de ARN o proteínas que actúen corriente arriba o corriente abajo unas de otras, moléculas de ARN o proteínas que tengan una función moduladora, activadora o represora entre sí, moléculas de ARN o proteínas que dependan unas de otras para función o actividad, o moléculas de ARN o proteínas que compartan homología (por ejemplo, homología de secuencia, estructural o funcional). Por ejemplo, este método puede usarse para generar una línea celular con la expresión incrementada de las cadenas pesada y ligera de una proteína de inmunoglobulina (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o fragmentos de unión a antígeno de la misma. Las proteínas de inmunoglobulina pueden ser proteínas de inmunoglobulina completamente humanas, humanizadas o quiméricas. Un ARN que sea transfectado en una célula de la invención puede comprender una secuencia que sea un ARN que codifique una proteína de interés. Cualquier proteína puede producirse de acuerdo con los métodos descritos aquí. Los ejemplos de proteínas que pueden producirse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, sin limitación, hormonas peptídicas (por ejemplo, insulina), hormonas glucoproteicas (por ejemplo, eritropoyetina), antibióticos, citocinas, enzimas, vacunas (por ejemplo, vacuna para VIH, vacuna para PVH, vacuna para VBH), terapéuticos antineoplásicos (por ejemplo, Mucl) y anticuerpos terapéuticos. En un caso particular el ARN codifica una proteína de inmunoglobulina o un fragmento de unión a antígeno de la misma, tal como una cadena pesada de inmunoglobulina, una cadena ligera de inmunoglobulina, un Fv de cadena individual, un fragmento de un anticuerpo, tal como un Fab, Fab' o (Fab')₂ o un fragmento de unión a antígeno de una inmunoglobulina. En un caso específico, el ARN codifica eritropoyetina. En

otro caso específico, el ARN codifica una o más proteínas de inmunoglobulina, o fragmentos de las mismas, que se unen a y, opcionalmente, antagonizan o agonizan un receptor de superficie celular: El receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), HER2 o c-ErbB-1, tal como Erbitux™ (cetuximab).

5 **Aislamiento o purificación de proteínas**

Los métodos descritos en la presente pueden comprender además la etapa de aislar o purificar las proteínas, polipéptidos o péptidos producidos mediante los métodos descritos en la presente. Los expertos en la técnica pueden hacer fácilmente una determinación de la manera adecuada para purificar o aislar la proteína de interés a partir de las células cultivadas. Generalmente, esto se hace a través de un método de captura usando purificación de unión por afinidad o sin afinidad. Si la proteína de interés no es secretada por las células cultivadas, entonces se llevaría a cabo una lisis de las células cultivadas antes de la purificación o aislamiento como se describe arriba. Se puede usar un fluido de cultivo celular no aclarado que contenga la proteína de interés junto con los componentes de medios de cultivo celular así como aditivos de cultivo celular, tales como compuestos antiespumantes y otros nutrientes y complementos, células, restos celulares, proteínas de células hospedadoras, ADN, virus y similares en la presente divulgación. Además, el proceso puede llevarse a cabo, si se desea, en el propio biorreactor. El fluido puede ser ya sea pre-acondicionado a un estímulo deseado tal como pH, temperatura u otra característica de estímulo o el fluido puede acondicionarse después de la adición del polímero o los polímeros o pueden añadirse el polímero o los polímeros a un líquido portador que sea adecuadamente acondicionado al parámetro necesario para la condición de estímulo requerida para que ese polímero sea solubilizado en el fluido. El polímero o los polímeros se dejan circular exhaustivamente con el fluido y después se aplica el estímulo (cambio en pH, temperatura, concentración de sal, etc.) y la proteína y el polímero o los polímeros deseados se precipitan fuera de la solución. El polímero y proteína o proteínas deseadas se separan del resto del fluido y se lavan opcionalmente una o más veces para eliminar cualquier contaminante atrapado o unido débilmente. La proteína deseada se recupera después del polímero o los polímeros tal como mediante elución y similares. Típicamente, la elución se hace en un conjunto de condiciones tales que el polímero permanezca en su forma sólida (precipitada) y conserve cualquier impureza de este durante la elución selectiva de la proteína deseada. Como alternativa, el polímero y proteína así como cualquier impureza puede solubilizarse en un fluido nuevo tal como agua o una solución de pH regulado y la proteína puede recuperarse por un medio tal como cromatografía de afinidad, intercambio iónico, hidrófoba o cualquier otro tipo de cromatografía que tenga una preferencia y selectividad para la proteína sobre aquella del polímero o impurezas. La proteína eluida se recupera después y si se desea se somete a etapas de procesamiento adicionales, ya sea etapas de tipo discontinuo tradicionales o etapas de flujo continuo si es adecuado.

Además, es útil optimizar la expresión de un polipéptido específico de una línea celular o colección de líneas celulares de interés potencial, particularmente una proteína manipulada tal como una variante de proteína de una proteína de referencia que tenga una actividad conocida. En un caso, se proporciona un método para optimizar la expresión de una proteína manipulada en una célula objetivo, al proporcionar una pluralidad de tipos de células objetivo, y poniendo en contacto independientemente con cada uno de la pluralidad de tipos de células objetivo una molécula de ARNm modificada que codifique un polipéptido manipulado. Además, las condiciones de cultivo pueden ser alteradas para incrementar la eficiencia de producción de proteínas. Posteriormente, la presencia y/o nivel del polipéptido manipulado en la pluralidad de tipos de células objetivo se detecta y/o cuantifica, permitiendo la optimización de la expresión de un polipéptido manipulado mediante la selección de una célula objetivo eficiente y condiciones de cultivo celular relacionadas con la misma. Estos métodos son particularmente útiles cuando el polipéptido manipulado contiene una o más modificaciones post-traduccionales o tiene una estructura terciaria sustancial, situaciones que complican una producción de proteínas eficiente.

Las "proteínas de interés" o "proteínas deseadas" incluyen aquellas provistas en la presente y fragmentos, mutantes, variantes y alteraciones de las mismas. Especialmente, las proteínas/polipéptidos o polipéptidos de interés deseados son por ejemplo, pero no limitados a, insulina, factor de crecimiento tipo insulina, hormona de crecimiento humano (hGH, por sus siglas en inglés), activador de plasminógeno tisular (tPA, por sus siglas en inglés), citocinas, tales como interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón (IFN) alfa, IFN beta, IFN gamma, IFN omega o IFN tau, factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), tal como TNF alfa y TNF beta, TNF gamma, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL); factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés), proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). También se incluye la producción de eritropoyetina o cualquier otro factor de crecimiento hormonal. El método de acuerdo con la divulgación también se puede usar adecuadamente para la producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos. Estos fragmentos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab (fragmento de unión a antígeno). Los fragmentos Fab consisten en las regiones variables de ambas cadenas que se mantienen juntos por la región constante adyacente. Estos pueden formarse mediante digestión con proteasa, por ejemplo, con papaína, a partir de anticuerpos convencionales, pero también se pueden producir fragmentos Fab similares mientras tanto por ingeniería genética. Los fragmentos de anticuerpo adicionales incluyen fragmentos F(ab')₂ los cuales pueden prepararse mediante el corte proteolítico con pepsina.

La proteína de interés se recupera típicamente del medio de cultivo como un polipéptido secretado, o se puede

recuperar de lisados de células hospedadoras si se expresa sin una señal secretora. Es necesario purificar la proteína de interés a partir de otras proteínas recombinantes y proteínas de células hospedadoras de una manera en la que se obtengan preparaciones sustancialmente homogéneas de la proteína de interés. Como una primera etapa, se eliminan células y/o restos celulares en partículas del medio de cultivo o lisado. El producto de interés se purifica posteriormente a partir de proteínas, polipéptidos y ácidos nucleicos solubles, por ejemplo, por fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía Sephadex, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE. En general, los métodos que enseñan a una persona experta cómo purificar una proteína heteróloga expresada por células hospedadoras, se conocen bien en la técnica. Estos métodos son, por ejemplo, descritos por (Harris y Angal, *Protein Purification Methods: A Practical Approach*, Oxford University Press, 1995) o (Robert Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer, 1988).

Los métodos de la presente invención incrementan el suministro de ácido nucleico en una población celular, *in vivo*, *ex vivo* o en cultivo. Por ejemplo, un cultivo celular que contenga una pluralidad de células hospedadoras (por ejemplo, células eucarióticas tales como células de levadura o mamífero) se pone en contacto con una composición que contiene un ácido nucleico mejorado que tiene al menos una modificación de nucleósido y, opcionalmente, una región traducible. La composición contiene también generalmente un reactivo de transfección u otro compuesto que incrementa la eficiencia de absorción de ácido nucleico mejorada en las células hospedadoras. El ácido nucleico mejorado exhibe retención mejorada en la población celular, con respecto a un ácido nucleico no modificado correspondiente. La retención del ácido nucleico mejorado es mayor que la retención del ácido nucleico no modificado. En algunos casos, es de al menos aproximadamente 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 100 %, 150 %, 200 % o más de 200 % más alta que la retención del ácido nucleico no modificado. Esta ventaja de retención puede lograrse por una ronda de transfección con el ácido nucleico mejorado, o puede obtenerse siguiendo rondas de transfección repetidas.

En algunos casos, el ácido nucleico mejorado se suministra a una población de células objetivo con uno o más ácidos nucleicos adicionales. Este suministro puede ser al mismo tiempo, o el ácido nucleico mejorado se suministra antes del suministro del uno o más ácidos nucleicos adicionales. El uno o más ácidos nucleicos adicionales pueden ser ácidos nucleicos modificados o ácidos nucleicos no modificados. Se entiende que la presencia inicial de los ácidos nucleicos mejorados no induce sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de la población celular y, más aún, que la respuesta inmunitaria innata no será activada por la presencia posterior de los ácidos nucleicos no modificados. A este respecto, el ácido nucleico mejorado puede a su vez no contener una región traducible, si la proteína que se desee que esté presente en la población de células objetivo es traducida a partir de los ácidos nucleicos no modificados.

Expresión de proteínas antagonistas

Los métodos y composiciones descritos en la presente pueden usarse para producir proteínas que sean capaces de atenuar o bloquear la respuesta biológica agonista endógena y/o antagonizar una molécula receptora o de señalización en un sujeto mamífero. Por ejemplo, la señalización de receptor de IL-12 e IL-23 es mejorada en trastornos autoinmunitarios crónicos tales como esclerosis múltiple y enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematoso, espondilitis anquilosante y enfermedad de Crohn (Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD (2006) Curr. Opin. Immunol. 18 (6): 670-5). En otro caso, un ácido nucleico codifica un antagonista para receptores de quimiocina. Los receptores de quimiocina CXCR-4 y CCR-5 se requieren para la entrada de VIH en células hospedadoras (Arenzana-Seisdedos F *et al.*, (1996) Nature, 3 de octubre; 383 (6599): 400).

Porciones de dirección. En casos de la divulgación, se proveen ácidos nucleicos modificados para expresar un compañero de unión a proteína o un receptor sobre la superficie de la célula, el cual funciona para dirigir la célula a un espacio tisular específico o para interactuar con una porción específica, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Los socios de unión a proteínas adecuados incluyen anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos, proteínas de andamiaje o péptidos. Además, ácidos nucleicos modificados pueden ser empleados para dirigir la síntesis y ubicación extracelular de lípidos, carbohidratos u otras porciones biológicas.

Silenciamiento permanente de la expresión génica. Un método para silenciar epigenéticamente la expresión génica en un sujeto mamífero, que comprende un ácido nucleico en donde la región traducible codifica un polipéptido o polipéptidos capaces de dirigir la metilación de histona H3 específica de secuencia para iniciar la formación de heterocromatina y reducir la transcripción génica aproximadamente genes específicos para efectos de silenciar el gen. Por ejemplo, una mutación de ganancia de función en el gen de cinasa Janus 2 es responsable de la familia de enfermedades mieloproliferativas.

Detalles del mecanismo. La levadura de fisión requiere dos complejos de ARNi para el ensamblaje de heterocromatina mediado por ARNi: el complejo de silenciamiento transcripcional inducido por ARN (RITS, por sus siglas en inglés) y el complejo de ARN polimerasa dirigido por ARN (RDRC, por sus siglas en inglés) (Motamedi *et al.* Cell 2004, 119, 789-802). En levadura de fisión, el complejo RITS contiene la proteína de la familia Argonauta de unión a ARNi Ago1, una proteína de cromodominio Chp1 y Tas3. El complejo de levadura de fisión RDRC está compuesto de una ARN polimerasa dependiente de ARN Rdp1, una helicasa de ARN putativa Hrr1 y una proteína

de la familia de polimerasa poliA Cid12. Estos dos complejos requieren la ribonucleasa Dicer y metiltransferasa de Ctr4 de histona H3 para actividad. Juntas, Ago1 se une a moléculas de ARNip generadas a través del corte mediado por Dicer de transcritos de ARNbc generados co-transcripcionalmente de Rdp1 y permite la asociación directa específica de secuencia de Chp1, Tas3, Hrr1 y Ctr4 a regiones de ADN destinadas para metilación y modificación de

Producción de variantes de polipéptidos.

Los métodos y composiciones descritos en la presente pueden usarse para la producción de variantes de polipéptidos. En la presente se proporcionan ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes, los cuales tienen cierta identidad con una secuencia de polipéptidos de referencia. El término "identidad" como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más péptidos, según se determina al comparar las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de parentesco de secuencia entre péptidos, según se determina por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. "Identidad" inhibe el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineaciones de espacios (si las hay) resueltas por un modelo matemático o programa de ordenador particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de péptidos relacionados puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, parte 1, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., ed.s, M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo *et al.*, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

En algunos casos, la variante de polipéptido tiene la misma o similar actividad que el polipéptido de referencia. Como alternativa, la variante tiene una actividad alterada (por ejemplo, incrementada o reducida) con respecto a un polipéptido de referencia. Generalmente, las variantes de un polinucleótido o polipéptido particular de la divulgación tendrán al menos aproximadamente 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con aquel polinucleótido o polipéptido de referencia particular según se determina por programas de alineación de secuencia y parámetros descritos en la presente y conocidos por los expertos en la técnica.

Según reconocen los expertos en la técnica, fragmentos de proteínas, dominios de proteína funcionales y proteínas homólogas también se consideran dentro del alcance de esta divulgación. Por ejemplo, en la presente se proporciona cualquier fragmento de proteína de una proteína de referencia (que significa una secuencia de polipéptidos al menos un residuo de aminoácido más corta que una secuencia de polipéptidos de referencia pero de otra manera idéntica) aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 aminoácidos de largo. En otro ejemplo, se puede utilizar de acuerdo con la divulgación cualquier proteína que incluya un tramo de aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50 o aproximadamente 100 aminoácidos, que sea aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 100 % idéntica con cualquiera de las secuencias descritas en la presente. En ciertos casos, una secuencia de proteínas que se utilizará de acuerdo con la invención incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más mutaciones como se muestra en cualquiera de las secuencias provistas o referenciadas aquí.

Producción de bibliotecas de polipéptidos

Los métodos y composiciones descritos en la presente se pueden usar para la producción de bibliotecas de polipéptidos. En la presente se proporcionan bibliotecas de polinucleótidos que contienen modificaciones de nucleósidos, en donde los polinucleótidos contienen individualmente una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, tal como un anticuerpo, compañero de unión a proteína, proteína de andamiaje y otros polipéptidos conocidos en la técnica. Típicamente, los polinucleótidos son ARNm en una forma adecuada para introducción directa en un anfitrión de célula objetivo, el cual a su vez sintetiza el polipéptido codificado.

En ciertos casos, se producen y prueban variantes múltiples de una proteína, cada una con diferentes modificaciones de aminoácidos, para determinar la mejor variante en términos de farmacocinética, estabilidad, biocompatibilidad y/o actividad biológica, o una propiedad biofísica tal como nivel de expresión. Esta biblioteca puede contener aproximadamente 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ o más de 10⁹ variantes posibles (incluyendo sustituciones, supresiones de uno o más residuos e inserción de uno o más residuos).

Producción de complejos polipéptido-ácido nucleico

Los métodos y composiciones descritos en la presente pueden usarse para la producción de complejos polipéptido-

ácido nucleico. Una adecuada traducción de proteínas incluye la agregación física de un número de polipéptidos y ácidos nucleicos asociados con el ARNm. La presente divulgación proporciona complejos proteína-ácido nucleico que contienen un ARNm traducible que tiene una o más modificaciones de nucleósidos (por ejemplo, al menos dos modificaciones de nucleósidos diferentes) y uno o más polipéptidos unidos al ARNm. Generalmente, las proteínas son provistas en una cantidad efectiva para prevenir o reducir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la cual se introduzca el complejo.

Producción de ácidos nucleicos modificados no traducibles

Los métodos y composiciones descritos en la presente pueden usarse para la producción de ácidos nucleicos modificados no traducibles. Según se describe en la presente, se proporcionan moléculas de ARNm que tienen secuencias que son sustancialmente no traducibles. Este ARNm es eficaz como una vacuna cuando se administra a un sujeto mamífero.

También se proporcionan ácidos nucleicos modificados que contienen una o más regiones no codificadoras. Estos ácidos nucleicos modificados generalmente no son traducidos, pero son capaces de unirse a y secuestrar uno o más componentes de maquinaria de traducción tales como una proteína ribosómica o un ARN de transferencia (ARNt), reduciendo de esta manera en forma eficaz la expresión de proteínas en la célula. El ácido nucleico modificado puede contener un ARN nucleolar pequeño (ARNnop), microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN en horquilla pequeño (ARNhp) o ARN de interacción con Piwi (ARNip).

Ácidos nucleicos modificados

Esta invención proporciona métodos para producir proteínas usando ácidos nucleicos, incluyendo moléculas de ARN tales como moléculas de ARN mensajero (ARNm) que contienen uno o más nucleósidos modificados (llamados "ácidos nucleicos modificados"), los cuales tienen propiedades útiles incluyendo la falta de una inducción sustancial de la respuesta inmunitaria innata de una célula en la cual se introduzca el ARNm. Debido a que estos ácidos nucleicos modificados incrementan la eficiencia de producción de proteínas, la retención intracelular de ácidos nucleicos, y la viabilidad de las células contactadas, así como poseen inmunogenicidad reducida, estos ácidos nucleicos que tienen estas propiedades son llamados "ácidos nucleicos mejorados" en la presente.

La expresión "ácido nucleico", en su sentido más amplio, incluye cualquier compuesto y/o sustancia que sea o pueda ser incorporado en una cadena de oligonucleótidos. Los ejemplos de ácidos nucleicos para usarse de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no están limitados a, uno o más de ADN, ARN incluyendo ARNm mensajero (ARNm), híbridos de los mismos, agentes inductores de interferencia por ARN (ARNi), agentes de ARNi, moléculas de ARN de interferencia pequeñas (ARNip), moléculas de ARN en horquilla pequeñas (ARNhp), moléculas de microARN (miARN), moléculas de ARN en antisentido, ribozimas, ADN catalítico, moléculas de ARN que inducen la formación de triples hélices, aptámeros, vectores, etc., descritos en detalle en la presente.

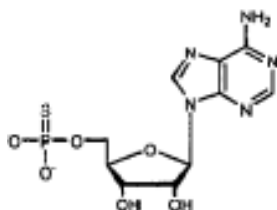
Se proporcionan ácidos nucleicos modificados que contienen una región traducible y una, dos o más de dos modificaciones de nucleósidos diferentes. En algunos casos, el ácido nucleico modificado exhibe degradación reducida en una célula en la cual se introduce el ácido nucleico, con respecto a un ácido nucleico no modificado correspondiente. Por ejemplo, la velocidad de degradación del ácido nucleico modificado se reduce en aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de 90 %, en comparación con la velocidad de degradación del ácido nucleico no modificado correspondiente. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen ácidos ribonucleicos (moléculas de ARN), ácidos desoxirribonucleicos (moléculas de ADN), ácidos nucleicos de treosa (TNA, por sus siglas en inglés), ácidos nucleicos de glicol (GNA, por sus siglas en inglés) o un híbrido de los mismos. En casos típicos, el ácido nucleico modificado incluye ARN mensajeros (ARNm). Como se describe en la presente, los ácidos nucleicos de la divulgación no inducen sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de una célula en la cual se introduce el ARNm.

En algunas modalidades o casos, los nucleósidos modificados incluyen ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-desaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-pseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina y 4-metoxi-2-tio-pseudouridina.

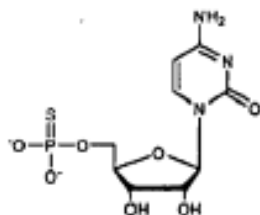
En algunas modalidades o casos, los nucleósidos modificados incluyen 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina.

En algunas modalidades o casos, los nucleósidos modificados incluyen 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-desaza-adenina, 7-desaza-8-aza-adenina, 7-desaza-2-aminopurina, 7-desaza-8-aza-2-aminopurina, 7-desaza-2,6-diaminopurina, 7-desaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina y 2-metoxi-adenina.

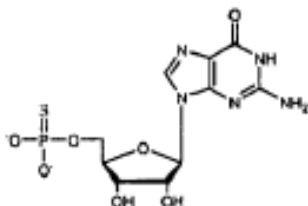
En modalidades o casos específicos, un nucleósido modificado es 5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina, 5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-uridina o 5'-O-(1-tiofosfato)-pseudouridina.



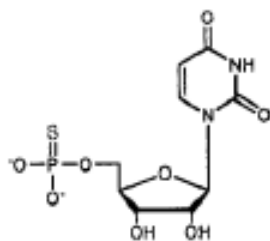
5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina



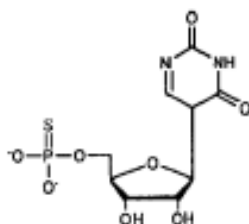
5'-O-(1-tiofosfato)-citidina



5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina



5'-O-(1-tiofosfato)-uridina



5'-O-(1-tiofosfato)-pseudouridina

La porción de fosfato α -tiosustituida es provista para conferir estabilidad a polímeros de ARN y ADN a través de los enlaces del esqueleto de fosforotioato no natural. ADN y ARN de fosforotioato han incrementado la resistencia a nucleasa y posteriormente una semivida más larga en un ambiente celular. Se espera que los ácidos nucleicos enlazados a fosforotioato también reduzcan la respuesta inmunitaria innata a través de la unión/activación más débil de moléculas inmunitarias innatas celulares.

En ciertos casos es deseable degradar intracelularmente un ácido nucleico modificado introducido en la célula, por ejemplo, si se desea la sincronización precisa de la producción de proteínas. Así, la divulgación proporciona un ácido nucleico modificado que contiene un dominio de degradación, en el cual es posible actuar de una manera directa dentro de una célula.

En otras modalidades o casos, los nucleótidos modificados incluyen inosina, 1-metil-inosina, wiosina, wibutosina, 7-desaza-guanosina, 7-desaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-desaza-guanosina, 6-tio-7-desaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

Otros componentes de ácido nucleico son opcionales y son beneficiosos en algunos casos. Por ejemplo, se proporciona una región no traducida 5' (UTR) y/o una 3'UTR, en donde cualquiera o ambas pueden contener independientemente una o más modificaciones de nucleósidos diferentes. En estos casos, también pueden estar presentes modificaciones de nucleósidos en la región traducible. También se proporcionan ácidos nucleicos que contienen una secuencia Kozak.

Además, se proporcionan ácidos nucleicos que contienen una o más secuencias de nucleótidos intrónicas capaces de ser extirpadas del ácido nucleico.

Además, se proporcionan ácidos nucleicos que contienen un sitio de entrada a ribosomas interno (IRES, por sus siglas en inglés). Un IRES puede actuar como el único sitio de unión a ribosoma, o puede servir como uno de los múltiples sitios de unión a ribosoma de un ARNm. Un ARNm que contiene más de un sitio de unión a ribosoma funcional puede codificar varios péptidos y polipéptidos que sean traducidos independientemente por los ribosomas ("ARNm multicistónico"). Cuando los ácidos nucleicos son provistos con un IRES, se proporciona además opcionalmente una segunda región traducible. Los ejemplos de secuencias IRES que se pueden usar de acuerdo con la invención incluyen sin limitación, las de picornavirus (por ejemplo, FMDV), virus de plaga (CFFV), virus de la polio (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia simica (SIV) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

Prevención o reducción de activación de respuesta inmunitaria celular innata usando ácidos nucleicos modificados

Los ácidos nucleicos modificados descritos en la presente son capaces de evadir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la cual los ácidos nucleicos sean introducidos, incrementando así la eficiencia de producción de proteínas en la célula. La expresión "respuesta inmunitaria innata" incluye una respuesta celular a ácidos nucleicos de una sola hebra exógenos, generalmente de origen viral o bacteriano, que incluye la inducción de expresión y liberación de citocinas, particularmente los interferones, y muerte celular. La síntesis de proteínas también se reduce durante la respuesta inmunitaria celular innata. Aunque es ventajoso eliminar la respuesta inmunitaria innata en una célula, la divulgación proporciona moléculas de ARNm modificadas que reducen sustancialmente la respuesta inmunitaria, incluyendo señalización de interferón, sin eliminar completamente esta respuesta. En algunos casos, la respuesta inmunitaria es reducida en aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 %, o más de 99,9 %, en comparación con la respuesta inmunitaria inducida por un ácido nucleico no modificado correspondiente. Esta reducción puede medirse mediante la expresión o el nivel de actividad de interferones tipo 1 o la expresión de genes regulados por interferón tales como receptores tipo toll (por ejemplo, TLR7 y TLR8). La reducción de una respuesta inmunitaria innata también puede medirse por muerte celular reducida después de una o más administraciones de moléculas de ARN modificadas a una población de células; por ejemplo, la muerte celular es aproximadamente 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de 95 % menor que la frecuencia de muerte celular observada con un ácido nucleico no modificado correspondiente. Además, la muerte celular puede afectar menos de aproximadamente 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 % o menos de 0,01 % de células puestas en contacto con los ácidos nucleicos modificados.

La divulgación proporciona la introducción repetida (por ejemplo, transfección) de ácidos nucleicos modificados en una población de células objetivo, por ejemplo, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La etapa de poner en contacto la población de células puede repetirse una o más veces (tal como dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco veces). En algunos casos, la etapa de poner en contacto la población de células con los ácidos nucleicos modificados se repite un número de veces suficiente de tal manera que se logre una eficiencia predeterminada de traducción de proteínas en la población celular. Dada la citotoxicidad reducida de la población de células objetivo proporcionada por las modificaciones de ácido nucleico, tales transfecciones repetidas son realizables en una diversa gama de tipos de células.

Síntesis de ácidos nucleicos modificados

Los ácidos nucleicos para usarse de acuerdo con la divulgación pueden prepararse de acuerdo con cualquier técnica disponible incluyendo, pero no limitada a síntesis química, síntesis enzimática, la cual se llama generalmente transcripción *in vitro*, corte enzimático o químico de un precursor más largo, etc. Los métodos para sintetizar moléculas de ARN se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Gait, M.J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; y Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: Methods and applications*. Methods in Molecular Biology, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005).

Los ácidos nucleicos modificados no tienen que ser modificados uniformemente a lo largo de la longitud completa de la molécula. Diferentes modificaciones de nucleótidos y/o estructuras de esqueleto pueden existir en varias posiciones del ácido nucleico. Alguien de capacidad ordinaria en la técnica apreciará que los análogos de nucleótidos u otras modificaciones pueden ubicarse en cualquier posición de un ácido nucleico de tal manera que la función del ácido nucleico no se reduzca sustancialmente. Una modificación también puede ser una modificación terminal 5' o 3'. Los ácidos nucleicos pueden contener como mínimo uno y como máximo 100 % de nucleótidos modificados, o cualquier porcentaje intermedio, tal como al menos aproximadamente 50 % de nucleótidos modificados, por lo menos aproximadamente 80 % de nucleótidos modificados o al menos aproximadamente 90 % de nucleótidos modificados.

Generalmente, la longitud de un ARNm modificado de la presente divulgación es adecuada para producción de proteínas, polipéptidos o péptidos en una célula (por ejemplo, una célula humana). Por ejemplo, el ARNm es de una longitud suficiente como para permitir la traducción de al menos un dipéptido en una célula. En un caso, la longitud del ARNm modificado es mayor de 30 nucleótidos. En otro caso, la longitud es mayor de 35 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 40 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 45 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 55 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 80 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 90 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 100 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 120 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 140 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 160 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 180 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 200 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 250 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 300 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 350 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 400 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 450 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 500 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 600 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 700 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 800 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 900 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1000 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1100 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1200 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1300 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1400 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1500 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1600 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1800 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 2000 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 2500 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 3000 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 4000 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 5000 nucleótidos o más de 5000 nucleótidos.

Usos de ácidos nucleicos modificados

Las proteínas, polipéptidos o péptidos producidos por los métodos descritos en la presente pueden usarse como agentes terapéuticos para tratar o prevenir una o más enfermedades o afecciones descritas en la presente.

Agentes terapéuticos. Se proporcionan composiciones, métodos, kits y reactivos para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones en seres humanos y otros animales (por ejemplo, mamíferos). Los agentes terapéuticos activos de la divulgación incluyen polipéptidos traducidos a partir de ácidos nucleicos modificados, células que contienen ácidos nucleicos modificados o polipéptidos traducidos a partir de los ácidos nucleicos modificados, y células puestas en contacto con células que contienen ácidos nucleicos modificados o polipéptidos traducidos a partir de los ácidos nucleicos modificados.

Se proporcionan métodos para inducir la traducción de un polipéptido recombinante en una población de células usando los ácidos nucleicos modificados descritos en la presente. Esta traducción puede ser *in vivo*, *ex vivo*, en cultivo o *in vitro*. La población celular se pone en contacto con una cantidad eficaz de una composición que contiene un ácido nucleico que tiene al menos una modificación de nucleósido, y una región traducible que codifica el polipéptido recombinante. La población es puesta en contacto en condiciones tales que el ácido nucleico se ubique en una o más células de la población celular y el polipéptido recombinante sea traducido en la célula del ácido nucleico.

Una cantidad eficaz de la composición se proporciona con base, por lo menos en parte, en el tejido objetivo, tipo de

célula objetivo, medios de administración, características físicas de la proteína traducida a partir del ácido nucleico modificado (por ejemplo, tamaño) y otras determinantes.

Las composiciones que contienen ácidos nucleicos modificados se formulan para administración intramuscularmente, transarterialmente, intraperitonealmente, intravenosamente, intranasalmente, subcutáneamente, endoscópicamente, transdérmicamente o intratecalmente. En algunos casos, la composición se formula para liberación extendida.

El sujeto a quien se administra el agente terapéutico padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección dañina. Se proporcionan métodos para identificar, diagnosticar y clasificar sujetos sobre estas bases, los cuales pueden incluir diagnóstico clínico, niveles de biomarcadores, estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) y otros métodos conocidos en la técnica.

En ciertos casos, el polipéptido recombinante administrado traducido a partir del ácido nucleico modificado descrito en la presente, proporciona una actividad funcional que está sustancialmente ausente en la célula en la cual el polipéptido recombinante es administrado. Por ejemplo, la actividad funcional ausente puede ser de naturaleza enzimática, estructural o reguladora génica.

En otros casos, el polipéptido recombinante administrado reemplaza un polipéptido (o varios polipéptidos) que está sustancialmente ausente en la célula en la cual el polipéptido recombinante es administrado. Esta ausencia puede deberse a mutación genética del gen que codifique o vía reguladora del mismo. Como alternativa, el polipéptido recombinante funciona para antagonizar la actividad de una proteína endógena presente en, sobre la superficie de, o secretada de la célula. Usualmente, la actividad de la proteína endógena es dañina para el sujeto, por ejemplo, debido a la mutación de la proteína endógena que da resultado a actividad o ubicación alteradas. Además, el polipéptido recombinante antagoniza, directa o indirectamente, la actividad de una porción biológica presente en, sobre la superficie de, o secretada de la célula. Los ejemplos de porciones biológicas antagonizadas incluyen lípidos (por ejemplo, colesterol), una lipoproteína (por ejemplo, lipoproteína de baja densidad), un ácido nucleico, un carbohidrato o una toxina de molécula pequeña.

Las proteínas recombinantes descritas en la presente son manipuladas para su localización dentro de la célula, potencialmente dentro de un compartimento específico tal como el núcleo, o se manipulan para secreción de la célula o translocación a la membrana plasmática de la célula.

Como se describe en la presente, una característica útil de los ácidos nucleicos modificados de la divulgación es la capacidad para reducir la respuesta inmunitaria innata de una célula a un ácido nucleico exógeno, por ejemplo, para incrementar la producción de proteínas. Se proporcionan métodos para llevar a cabo la titulación, reducción o eliminación de la respuesta inmunitaria en una célula o una población de células. En algunos casos, la célula se pone en contacto con una primera composición que contiene una primera dosis de un primer ácido nucleico exógeno incluyendo una región traducible y por lo menos una modificación de nucleósido, y se determina el nivel de la respuesta inmunitaria innata de la célula al primer ácido nucleico exógeno. Posteriormente, la célula se pone en contacto con una segunda composición, la cual incluye una segunda dosis del primer ácido nucleico exógeno, conteniendo la segunda dosis una menor cantidad del primer ácido nucleico exógeno en comparación con la primera dosis. Como alternativa, la célula se pone en contacto con una primera dosis de un segundo ácido nucleico exógeno. El segundo ácido nucleico exógeno puede contener uno o más nucleósidos modificados, los cuales pueden ser iguales o diferentes al primer ácido nucleico exógeno o, como alternativa, el segundo ácido nucleico exógeno puede no contener nucleósidos modificados. Las etapas de poner en contacto la célula con la primera composición y/o la segunda composición pueden repetirse una o más veces. Además, la eficiencia de producción de proteínas (por ejemplo, traducción de proteínas) en la célula se determina opcionalmente, y la célula puede ser re-transfectada con la primera y/o segunda composición repetidamente hasta que se logre una eficiencia de producción de proteína objetivo.

Tratamientos para enfermedades y afecciones. Se proporcionan métodos para tratar o prevenir un síntoma de enfermedad caracterizado por actividad de proteína ausente o aberrante, al reemplazar la actividad de proteína ausente o superar la actividad de proteína aberrante.

Las enfermedades caracterizadas por actividad de proteína disfuncional o aberrante incluyen, pero no están limitadas a, cáncer y enfermedades proliferativas, enfermedades genéticas (por ejemplo, fibrosis quística), enfermedades autoinmunitarias, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas. La presente divulgación proporciona un método para tratar estas afecciones o enfermedades en un sujeto al introducir tratamientos a base de proteínas o células producidos mediante un método usando los ácidos nucleicos modificados proporcionados en la presente, en donde los ácidos nucleicos modificados codifican una proteína que antagoniza o de otra manera supera la actividad de proteína aberrante presente en la célula del sujeto. Ejemplos específicos de una proteína disfuncional son las variantes de mutación en sentido erróneo del gen regulador de la conductancia de transmembrana de fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés), que produce una variante de proteína disfuncional de la proteína CFTR, que causa fibrosis quística.

Varias enfermedades se caracterizan por actividad de proteína ausente (o reducida sustancialmente de tal manera que la función de proteína adecuada no se presente). Estas proteínas pueden no estar presentes, o esencialmente ser no funcionales. La presente divulgación proporciona un método para tratar estas afecciones o enfermedades en un sujeto al introducir ácido nucleico o tratamientos a base de células que contengan los ácidos nucleicos modificados proporcionados en la presente, en donde los ácidos nucleicos modificados codifican una proteína que reemplaza la actividad de proteína ausente en las células objetivo del sujeto. Son ejemplos específicos de una proteína disfuncional las variantes de mutación sin sentido del gen regulador de conductancia de membrana de fibrosis quística (CFTR), que producen una variante de proteína no funcional de proteína CFTR, que causa fibrosis quística.

Así, se proporcionan métodos para tratar fibrosis quística en un sujeto mamífero al poner en contacto una célula del sujeto con un ácido nucleico modificado que tenga una región traducible que codifique un polipéptido CFTR funcional, en condiciones tales que una cantidad eficaz del polipéptido CFTR esté presente en la célula. Las células objetivo típicas son células epiteliales, tales como el pulmón, y los métodos de administración se determinan en vista del tejido objetivo; es decir, para suministro de pulmón, las moléculas de ARN se formulan para administración por inhalación.

En otro caso, la presente divulgación proporciona un método para tratar hiperlipidemia en un sujeto, al introducir en una población de células del sujeto Sortilina (una proteína recientemente caracterizada por estudios genómicos) producida por un método descrito en la presente usando una molécula de ARNm modificada que codifica Sortilina, reduciendo de esta manera la hiperlipidemia en un sujeto. El gen *SORT1* codifica una proteína de membrana de la red trans-Golgi (TGN, por sus siglas en inglés) llamada Sortilina. Estudios genéticos han demostrado que uno de cinco individuos tiene un polimorfismo de un solo nucleótido, rs12740374, en el locus 1p13 del gen *SORT1* que los predispone a tener bajos niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés). Cada copia del alelo menor, presente en aproximadamente 30 % de las personas, altera el colesterol LDL en 8 mg/dl, mientras que dos copias del alelo menor, presente en aproximadamente 5 % de la población, reduce colesterol LDL 16 mg/dl. Los portadores del alelo menor también han demostrado tener un riesgo 40 % reducido de infarto de miocardio. Estudios *in vivo* funcionales en ratones describen que la sobreexpresión de *SORT1* en tejido hepático de ratón llevó a niveles de colesterol LDL significativamente más bajos, tanto como 80 % más bajos, y que silenciar *SORT1* incrementó colesterol LDL aproximadamente 200 % (Musunuru K *et al.* From noncoding variant to phenotype via *SORT1* at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 2010; 466: 714-721).

Composiciones farmacéuticas

La presente divulgación proporciona proteínas generadas a partir de moléculas de ARNm modificadas y se pueden usar proteínas producidas mediante los métodos descritos aquí en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente una o más sustancias terapéuticamente activas adicionales. De acuerdo con algunos casos, se proporciona un método para administrar composiciones farmacéuticas que comprenden una o más proteínas que serán suministradas a un sujeto que las necesite. En algunos casos, las composiciones se administran a seres humanos. Para los efectos de la presente divulgación, la expresión "principio activo" se refiere generalmente a una proteína o complejo que contiene proteína como el descrito en la presente.

Aunque las descripciones de composiciones farmacéuticas provistas en la presente están dirigidas principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para su administración a seres humanos, el experto en la técnica entenderá que estas composiciones generalmente son adecuadas para su administración a animales de todas clases. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a seres humanos para de esta manera hacer a las composiciones adecuadas para su administración a varios animales se entiende bien, y el farmacólogo veterinario de capacidad ordinaria puede diseñar y/o llevar a cabo esta modificación con experimentación simplemente ordinaria, si la hay. Los sujetos a los cuales se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no están limitados a, seres humanos y/u otros primates; mamíferos, incluyendo mamíferos comercialmente relevantes tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos, perros, ratones y/o ratas; y/o aves, incluyendo aves comercialmente relevantes tales como pollos, patos, gansos y/o pavos.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado posteriormente en la técnica de farmacología. En general, estos métodos de preparación incluyen la etapa de poner el principio activo en asociación con un excipiente y/o uno o más ingredientes o accesorios, y luego, si es necesario y/o deseable, configurar y/o envasar el producto en una unidad de una sola o de varias dosis deseada.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación puede prepararse, envasarse y/o venderse a granel, como una sola dosis única, y/o como una pluralidad de dosis únicas individuales. Según se usa en la presente, una "dosis única" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo generalmente es igual a la dosis del principio activo que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de esta dosis; tal como, por ejemplo, una mitad o un tercio de

esta dosis.

Las cantidades relativas del principio activo, el excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención variarán, dependiendo de la identidad, tamaño y/o condición del sujeto tratado y dependiendo además de la ruta por la cual la composición se vaya a administrar. A manera de ejemplo, la composición puede comprender entre 0,1 % y 100 % (p/p) de principio activo.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable, el cual, según se usa en la presente, incluya cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservadores, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª edición, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) describe varios excipientes usados para formular composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida en que cualquier medio excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como al producir cualquier efecto biológico indeseable o interactuar de otra manera de una forma dañina con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, su uso se contempla como dentro del alcance de esta divulgación.

En algunas modalidades, un excipiente farmacéuticamente aceptable es al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % puro. En algunas modalidades, un excipiente es aprobado para usarse en seres humanos y para uso veterinario. En algunas modalidades, un excipiente es aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos. En algunas modalidades, un excipiente es grado farmacéutico. En algunas modalidades, un excipiente cumple con las normas de la Farmacopea de Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés), la Farmacopea Europea (EP, por sus siglas en inglés), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, pero no están limitados a, diluyentes inertes, agentes de dispersión y/o granulación, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, conservadores, agentes reguladores de pH, agentes lubricantes y/o aceites. Estos excipientes pueden ser incluidos opcionalmente en composiciones farmacéuticas. Excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorio, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes saborizantes y/o perfumantes pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

Los ejemplos de diluyentes incluyen, pero no están limitados a, carbonato de calcio, carbonato de sodio, fosfato de calcio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, fosfato ácido de calcio, lactosa de fosfato de sodio, sacarosa, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, sorbitol, inositol, cloruro de sodio, almidón seco, almidón de maíz, azúcar en polvo, etc., y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes de granulación y/o dispersión incluyen, pero no están limitados a, almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato de almidón de sodio, arcillas, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio, poli(vinilpirrolidona) entrelazada (crospovidona), carboximetil almidón de sodio (glicolato de almidón de sodio), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica entrelazada (croscarmelosa), metilcelulosa, almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón hidrosoluble, carboximetilcelulosa de calcio, silicato de magnesio aluminio (Veegum), laurilsulfato de sodio, compuestos de amonio cuaternario, etc., y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes tensioactivos y/o emulsionantes incluyen, pero no están limitados a, emulsionantes naturales (por ejemplo, acacia, agar, ácido algínico, alginato de sodio, tragacanto, condru, colesterol, xantano, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, lanolina, colesterol, cera y lecitina), arcillas coloidales (por ejemplo, bentonita [silicato de aluminio] y Veegum® [silicato de magnesio aluminio]), derivados de aminoácidos de cadena larga, alcoholes de alto peso molecular (por ejemplo, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol oleílico, monoestearato de triacetina, distearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo y monoestearato de propilenglicol, alcohol polivinílico), carbómeros (por ejemplo, carboxi polimetileno, ácido poliacrílico, polímero de ácido acrílico y polímero de carboxivinilo), carragenina, derivados celulósicos (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácido graso de sorbitán (por ejemplo, monolaurato de polioxietilensorbitán [Tween® 20], polioxietilensorbitán [Tween® 60], monooleato de polioxietilensorbitán [Tween® 80], monopalmitato de sorbitán [Span® 40], monoestearato de sorbitán [Span® 60], triestearato de sorbitán [Span® 65], monooleato de glicerilo, monooleato de sorbitán [Span® 80]), ésteres de polioxietileno (por ejemplo, monoestearato de polioxietileno [Myrj® 45], aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno, aceite de ricino polietoxilado, estearato de polioximetileno y Solutol®), ésteres de ácido graso de sacarosa, ésteres de ácido graso de polietilenglicol (por ejemplo, Cremophor®), éteres de polioxietileno (por ejemplo, éter laurílico de polioxietileno [Brij® 30]), poli(vinil-pirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, laurilsulfato de sodio,

Pluronic®F 68, Poloxamer® 188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato sódico, etc., y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes aglutinantes incluyen, pero no están limitados a, almidón (por ejemplo, almidón de maíz y pasta de almidón); gelatina; azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa, dextrina, melaza, lactosa, lactitol, manitol); gomas naturales y sintéticas (por ejemplo, acacia, alginato de sodio, extracto de musgo de Irlanda, goma de panwar, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, poli(vinilpirrolidona), silicato de magnesio aluminio (Veegum®), y arabogalactano de alerce); alginatos; óxido de polietileno; polietilenglicol; sales de calcio inorgánicas; ácido silícico; polimetacrilatos; ceras; agua; alcohol; etc.; y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de conservadores pueden incluir, pero no están limitados a, antioxidantes, agentes quelantes, conservadores antimicrobianos, conservadores antimicóticos, conservadores de alcohol, conservadores ácidos y/u otros conservadores. Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no están limitados a, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y/o sulfito de sodio. Los ejemplos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidratado, edetato disódico, edetato de dipotasio, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato de sodio, ácido tartárico y/o edetato trisódico. Los ejemplos de conservadores antimicrobianos incluyen, pero no están limitados a, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imidurea, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y/o timerosal. Ejemplos de conservadores antimicóticos incluyen, pero no están limitados a, butilparabeno, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y/o ácido sórbico. Los ejemplos de conservadores de alcohol incluyen, pero no están limitados a, etanol, polietilenglicol, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o alcohol feniletílico. Los ejemplos de conservadores ácidos incluyen, pero no están limitados a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroacético, ácido ascórbico, ácido sórbico y/o ácido fítico. Otros conservadores incluyen, pero no están limitados a, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), etilendiamina, laurilsulfato de sodio (SLS), lauril éter sulfato de sodio (SLES), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio, metabisulfito de potasio, Glydant Plus®, Phenonip®, metilparabeno, Germall®115, Germaben®II, Neolone™, Kathon™ y/o Euxyl®.

Los ejemplos de agentes reguladores de pH incluyen, pero no están limitados a, soluciones reguladoras de pH de citrato, soluciones reguladoras de pH de fosfato, cloruro de amonio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, glubionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, ácido D-glucónico, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, fosfato de hidróxido de calcio, acetato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, mezclas de potasio, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, mezclas de fosfato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, mezclas de fosfato de sodio, trometamina, hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido alginico, agua sin pirógenos, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico, etc., y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes lubricantes incluyen, pero no están limitados a, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, sílice, talco, malta, behanato de glicerilo, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, laurilsulfato de magnesio, laurilsulfato de sodio, etc., y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de aceites incluyen, pero no están limitados a, aceites de almendra, semilla de albaricoque, aguacate, babasú, bergamota, semilla de grosella negra, borraja, cada, manzanilla, canola, alcaravea, carnauba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semilla de algodón, emú, eucalipto, onagra, pescado, semilla de lino, geraniol, calabaza, semilla de uva, avellana, hisopo, miristato de isopropilo, jojoba, nuez de kukui, lavandina, lavanda, limón, *Litsea cubeba*, nuez de macadamia, malva, semilla de mango, semilla de *Limnanthes*, visón, nuez moscada, oliva, naranja, reloj anaranjado, palma, semilla de palma, semilla de melocotón, cacahuete, semilla de amapola, semilla de calabaza, colza, salvado de arroz, romero, cártamo, sándalo, sascuana, satireja, espinillo amarillo, sésamo, manteca de karité, silicona, soja, girasol, árbol del té, cardo, *Camellia japonica*, vetiver, nuez y germen de trigo. Los ejemplos de aceites incluyen, pero no están limitados a, estearato de butilo, triglicérido caprílico, triglicérido cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, miristato de isopropilo, aceite mineral, octildodecanol, alcohol oleílico, aceite de silicona y/o combinaciones de los mismos.

Las formas de dosis líquidas para administración oral y parenteral incluyen, pero no están limitadas a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires farmacéuticamente aceptables. Además de principios activos, las formas de dosis líquidas pueden comprender diluyentes inertes usados comúnmente en la

técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizadores y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, castor y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitano, y mezclas de los mismos. Aparte de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes y/o perfumantes. En ciertas modalidades para administración parenteral, las composiciones se mezclan con agentes solubilizantes tales como Cremophor®, alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbatos, ciclodextrinas, polímeros y/o combinaciones de los mismos.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión adecuados, agentes humectantes y/o agentes de suspensión. Las preparaciones inyectables estériles pueden ser soluciones, suspensiones y/o emulsiones inyectables estériles en diluyentes y/o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicos, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro de sodio isotónica. Se emplean convencionalmente aceites estériles y fijos como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Pueden usarse ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

Las composiciones de inyectables pueden ser esterilizadas, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana y/o al incorporar agentes de esterilización en forma de composiciones sólidas estériles que pueden ser disueltas o dispersadas en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de usar.

Para prolongar el efecto de un principio activo, comúnmente es deseable hacer más lenta la absorción del principio activo a partir de inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución la cual, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y forma cristalina. Como alternativa, la absorción retrasada de una forma de fármaco administrado parenteralmente se logra al disolver o suspender al fármaco en un vehículo de aceite. Las formas de depósito inyectables se hacen al formar matrices de microcápsula de fármaco en polímeros biodegradables tales como polilacturo-poliglicólido. Dependiendo de la relación del fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación de fármaco puede ser controlada. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las composiciones de inyectables de depósito se formulan o preparan al atrapar el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con tejidos corporales.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son típicamente supositorios que se pueden preparar al mezclar composiciones con excipientes no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorios que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y que por lo tanto se derretirán en el recto o cavidad vaginal y liberarán el principio activo.

Las formas de dosis sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólida, un principio activo se mezcla con por lo menos un excipiente inerte y farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cargas o extensores (por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico), aglutinantes (por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y acacia), humectantes (por ejemplo, glicerol), agentes disgregantes (por ejemplo, agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y carbonato de sodio), agentes de retraso de solución (por ejemplo, parafina), aceleradores de absorción (por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario), agentes humectantes (por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol), absorbentes (por ejemplo, caolín y arcilla bentonita) y lubricantes (por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio), y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender agentes reguladores de pH.

Las composiciones sólidas de un tipo similar pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosis sólidas; de comprimidos, grajeas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y corazas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden comprender opcionalmente agentes opacantes y pueden ser de una composición tal que liberen los principios activos únicamente, o de preferencia, en cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de infiltración que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas de dosis para administración tópica y/o transdérmica de una composición pueden incluir pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes y/o parches. Generalmente, un

principio activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier conservante y/o regulador de pH que se requiera según pueda ser necesario. Además, la presente divulgación contempla el uso de parches transdérmicos, los cuales comúnmente tienen la ventaja agregada de proporcionar suministro controlado de un compuesto al cuerpo. Estas formas de dosis pueden prepararse, por ejemplo, al disolver y/o dispensar el compuesto en el medio adecuado. Como alternativa o además, la velocidad puede controlarse ya sea al proporcionar una membrana de control de velocidad y/o al dispersar el compuesto en una matriz polimérica y/o gel.

Los dispositivos adecuados para usarse en el suministro de las composiciones farmacéuticas intradérmicas descritas en la presente incluyen dispositivos de aguja corta tales como aquellos descritos en las patentes de EE. UU. 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; y 5.417.662. Las composiciones intradérmicas pueden administrarse por dispositivos que limiten la longitud de penetración efectiva de una aguja en la piel, tal como aquellas descritas en la publicación de PCT WO 99/34805 y equivalentes funcionales de la misma. Los dispositivos de inyección de chorro que suministran composiciones líquidas a la dermis por medio de un inyector de chorro de líquido y/o por medio de una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que alcance la dermis son adecuados. Los dispositivos de inyección de chorro se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. 5.480.381; 5.599.302; 5.334.144; 5.993.412; 5.649.912; 5.569.189; 5.704.911; 5.383.851; 5.893.397; 5.466.220; 5.339.163; 5.312.335; 5.503.627; 5.064.413; 5.520.639; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 4.940.460; y publicaciones de PCT WO 97/37705 y WO 97/13537. Los dispositivos de suministro de polvo/partículas balísticas que usan gas comprimido para acelerar una vacuna en forma de polvo a través de las capas exteriores de la piel hasta la dermis son adecuados. Como alternativa o además, pueden usarse jeringas convencionales en el método de Mantoux clásico de administración transdérmica.

Las composiciones formuladas para administración tópica incluyen, pero no están limitadas a, preparaciones líquidas y/o semilíquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua y/o agua en aceite tales como cremas, pomadas y/o pastas, y/o soluciones y/o suspensiones. Las composiciones tópicamente administrables pueden formularse, por ejemplo, para comprender de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % (p/p) de principio activo, aunque la concentración de principio activo puede ser tan alta como el límite de solubilidad del principio activo en el disolvente. Las composiciones formuladas para administración tópica pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos aquí.

Una composición farmacéutica puede formularse, prepararse, envasarse y/o venderse para administración pulmonar por medio de la cavidad bucal. Esta composición puede formularse para comprender partículas secas que comprendan el principio activo y las cuales tengan un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 7 nm o de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 6 nm. Estas composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para administración usando un dispositivo que comprenda un depósito de polvo seco al cual se le pueda dirigir una corriente de propulsor para dispersar el polvo y/o usando un disolvente de autopropulsión/recipiente de suministro de polvo tal como un dispositivo que comprenda el principio activo disuelto y/o suspendido en un propulsor de baja ebullición en un recipiente sellado. Estos polvos comprenden partículas en las que al menos 98 % de las partículas en peso tienen un diámetro mayor de 0,5 nm y al menos 95 % de las partículas en número tienen un diámetro menor de 7 nm. Como alternativa, al menos 95 % de las partículas en peso tienen un diámetro mayor de 1 nm y al menos 90 % de las partículas en número tienen un diámetro menor de 6 nm. Las composiciones en polvo seco pueden incluir un diluyente en polvo fino sólido tal como azúcar y se proporcionan convenientemente en una forma de dosis unitaria.

Los propulsores de baja ebullición incluyen generalmente propulsores líquidos que tienen un punto de ebullición inferior a 18 °C a presión atmosférica. Generalmente, el propulsor puede constituir aproximadamente 50 % a aproximadamente 99,9 % (p/p) de la composición, y el principio activo puede constituir aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % (p/p) de la composición. Un propulsor puede comprender además ingredientes adicionales tales como un agente tensioactivo no iónico líquido y/o aniónico sólido y/o un diluyente sólido (el cual puede tener un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que comprendan el principio activo).

Las composiciones farmacéuticas formuladas para suministro pulmonar pueden proporcionar un principio activo en forma de gotas de una solución y/o suspensión. Estas composiciones pueden formularse, prepararse, envasarse y/o venderse como soluciones y/o suspensiones alcohólicas acuosas y/o diluidas, opcionalmente estériles, que comprendan principio activo, y convenientemente pueden administrarse usando cualquier dispositivo de nebulización y/o atomización. Estas composiciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero no limitados a, un agente saborizante tal como sacarina de sodio, un aceite volátil, un agente regulador de pH, un agente tensioactivo y/o un conservador tal como hidroxibenzoato de metilo. Las gotas proporcionadas por esta ruta de administración pueden tener un diámetro promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 200 nm.

Las formulaciones descritas en la presente como útiles para suministro pulmonar son útiles para suministro intranasal de una composición farmacéutica. Otra composición formulada para administración intranasal es un polvo grueso que comprende el principio activo y que tiene un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 0,2 µm a 500 µm. Esta composición se formula para administración de la manera en la que se toma rapé, es decir, mediante

inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de la nariz.

Las composiciones formuladas para administración nasal pueden, por ejemplo, comprender desde aproximadamente tan poco como 0,1 % (p/p) y tanto como 100 % (p/p) de principio activo, y pueden comprender uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente. Una composición farmacéutica puede formularse, prepararse, envasarse y/o venderse para administración bucal. Estas composiciones pueden, por ejemplo, formularse en forma de comprimidos y/o pastillas hechas usando métodos convencionales y pueden contener, por ejemplo, 0,1 % a 20 % (p/p) de principio activo, el resto comprendiendo una composición oralmente soluble y/o degradable y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente. Como alternativa, las composiciones formuladas para administración bucal pueden comprender una solución y/o suspensión en polvo y/o aerosolizada y/o atomizada que comprenda principio activo. Estas composiciones en polvo, aerosolizadas, y/o aerosolizadas, cuando son suministradas, pueden tener un tamaño de partícula y/o gota promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 200 nm, y pueden comprender además uno o más de cualesquiera ingredientes adicionales como los descritos en la presente.

Una composición farmacéutica puede formularse, prepararse, envasarse y/o venderse para administración oftálmica. Estas composiciones pueden, por ejemplo, ser formuladas en forma de colirios incluyendo, por ejemplo, una solución y/o suspensión al 0,1/1,0 % (p/p) del principio activo en un excipiente líquido acuoso u oleoso. Estas gotas pueden comprender además agentes reguladores de pH, sales y/o uno o más de cualquiera de los ingredientes adicionales descritos en la presente. Otras composiciones oftálmicamente administrables que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina y/o en una preparación liposómica. Se contemplan gotas para oídos y/o gotas para ojos dentro del alcance de esta divulgación.

Consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos pueden encontrarse, por ejemplo, en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 21ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Administración

La presente divulgación proporciona métodos que comprenden administrar proteínas o composiciones producidas mediante los métodos descritos en la presente a un sujeto que lo requiera. Las proteínas o complejos, o composiciones farmacéuticas, de formación de imágenes, diagnóstico o profilácticas de las mismas, se pueden administrar a un sujeto usando cualquier cantidad y cualquier ruta de administración eficaz para prevenir, tratar, diagnosticar o crear imágenes de una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, una enfermedad, trastorno y/o afección que se refiere a déficits de memoria de trabajo). La cantidad exacta requerida variará entre sujetos, dependiendo de la especie, edad y condición general del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad y similares. Las composiciones de acuerdo con la divulgación se formulan típicamente en una forma de dosis única para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Sin embargo, se entenderá que el uso diario o total de las composiciones de la presente divulgación será decidido por el médico que atienda dentro del alcance de criterio médico correcto. El nivel de dosis de formación de imágenes terapéuticamente eficaz, profilácticamente eficaz o adecuado y específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que esté siendo tratado y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; la hora de administración, ruta de administración y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o junto con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Las proteínas que serán suministradas y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formación de imágenes de las mismas pueden administrarse a animales, tales como mamíferos (por ejemplo, seres humanos, animales domesticados, gatos, perros, ratones, ratas, etc.). En algunos casos, las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formación de imágenes de las mismas se administran a seres humanos.

Las proteínas que serán suministradas y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formaciones de imágenes de las mismas de acuerdo con la presente invención pueden administrarse mediante cualquier ruta. En algunos casos, las proteínas y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formación de imágenes de las mismas, se administran mediante una o más de una variedad de rutas, incluyendo oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, subcutánea, intraventricular, transdérmica, interdérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (por ejemplo, mediante polvos, pomadas, cremas, geles, lociones y/o gotas), mucosa, nasal, bucal, enteral, vítea, intratumoral, sublingual; mediante instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; como una pulverización oral, pulverización nasal y/o aerosol, y/o a través de un catéter de vena porta. En algunos casos, proteínas o complejos, y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formación de imágenes de las mismas, se administran mediante inyección intravenosa sistémica. En casos específicos, pueden administrarse proteínas o complejos y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formación de imágenes de las mismas intravenosamente y/u oralmente. En casos específicos, pueden administrarse proteínas o complejos, y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formación de imágenes de las mismas, de una manera que permita a la proteína o complejo cruzar la barrera hematoencefálica,

barrera vascular u otra barrera epitelial.

Sin embargo, la divulgación abarca el suministro de proteínas o complejos, y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formación de imágenes de los mismos mediante cualquier ruta adecuada tomando en consideración los probables avances en la ciencia de suministro de fármacos.

En general la ruta de administración más adecuada dependerá de una variedad de factores incluyendo la naturaleza de la proteína o complejo que comprenda proteínas asociadas con al menos un agente que será suministrado (por ejemplo, su estabilidad en el ambiente del tracto gastrointestinal, torrente sanguíneo, etc.), la condición del paciente (por ejemplo, si el paciente es capaz de tolerar rutas de administración particulares), etc. La divulgación abarca el suministro de las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formación de imágenes mediante cualquier ruta adecuada tomando en consideración probables avances en la ciencia de suministro de fármacos.

En ciertos casos, las composiciones de acuerdo con la divulgación pueden ser administradas a niveles de dosificación suficientes para suministrar de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de peso corporal del sujeto al día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico, de diagnóstico, profiláctico o de formación de imágenes deseado. La dosis deseada puede suministrarse dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. En ciertos casos, la dosis deseada puede ser suministrada usando varias administraciones (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).

Las proteínas o complejos pueden usarse en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o formación de imágenes. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deban administrarse al mismo tiempo y/o formularse para suministrarse juntos, aunque estos métodos de suministro están dentro del alcance de la divulgación. Las composiciones pueden administrarse junto con, antes de o después de uno o más de otros tratamientos o procedimientos médicos deseados. En general, cada agente será administrado a una dosis y/o en un programa de tiempo determinado para ese agente. En algunos casos, la divulgación abarca el suministro de composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o formación de imágenes en combinación con agentes que mejoren su biodisponibilidad, reduzcan y/o modifiquen su metabolismo, inhiban su secreción y/o modifiquen su distribución dentro del cuerpo. En ciertos casos, se proporcionan tratamientos en combinación que contienen uno o más ácidos nucleicos modificados que contienen regiones traducibles que codifican una proteína o proteínas que refuerzan la inmunidad de un sujeto mamífero junto con una proteína que induce toxicidad celular dependiente de anticuerpo. Por ejemplo, se proporcionan tratamientos que contienen uno o más ácidos nucleicos que codifican trastuzumab y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). En particular, estos tratamientos en combinación son útiles en pacientes de cáncer de mama Her2+ quienes desarrollan resistencia inducida a trastuzumab. (Véase, por ejemplo, Albrecht, Immunotherapy. 2(6):795-8 (2010)).

Se apreciará además que agentes activos terapéuticamente, profilácticamente, diagnósticamente o en la formación de imágenes utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una sola composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, se espera que los agentes utilizados en combinación se utilicen a niveles que no excedan los niveles a los cuales se utilicen individualmente. En algunos casos, los niveles utilizados en combinación serán más bajos que aquellos utilizados individualmente.

La combinación particular de terapias (tratamientos o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los tratamientos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico que se desee lograr. Se apreciará también que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, una composición útil para tratar cáncer de acuerdo con la invención puede administrarse junto con un agente quimioterapéutico), o pueden lograr efectos diferentes (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso).

Kits

La invención proporciona una variedad de kits para llevar a cabo los métodos de la presente invención de manera conveniente y/o eficaz. Por ejemplo, en la presente se describen kits para producción de proteínas usando un ácido nucleico modificado descrito en la presente. Típicamente, los kits comprenderán cantidades y/o números de componentes suficientes para permitir a un usuario llevar a cabo varios tratamientos de un sujeto o sujetos y para llevar a cabo varios experimentos.

Definiciones

Agente terapéutico: La expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando sea administrado a

un sujeto, tenga un efecto terapéutico, de diagnóstico y/o profiláctico y/o provoque un efecto biológico y/o farmacológico deseado. *Animal*: Según se usa en la presente, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunos casos, "animal" se refiere a seres humanos en cualquier etapa de desarrollo. En algunos casos, "animal" se refiere a animales no humanos en cualquier etapa de desarrollo. En ciertos casos, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado vacuno, un primate o un cerdo). En algunos casos, los animales incluyen, pero no están limitados a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y gusanos. En algunos casos, el animal es un animal transgénico, animal genéticamente manipulado o un clon.

Aproximadamente: Según se usa en la presente, el término "aproximadamente" o "alrededor de" según se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En ciertos casos, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que están dentro de 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor que o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea de otra manera evidente a partir del contexto (excepto cuando este número exceda 100 % de un valor posible).

Asociado con: Según se usan en la presente, las expresiones "asociado con", "conjugado", "enlazado", "unido" y "ligado", cuando se usan con respecto a dos o más porciones, significan que las porciones están físicamente asociadas o conectadas unas con otras, ya sea directamente o por medio de una o más porciones adicionales que sirvan como un agente enlazador, para formar una estructura que sea suficientemente estable como para que las porciones permanezcan físicamente asociadas en las condiciones en las cuales la estructura se use, por ejemplo, condiciones fisiológicas.

Biológicamente activo: Según se usa en la presente, la expresión "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier sustancia que tenga actividad en un sistema y/u organismo biológico. Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tenga un efecto biológico en ese organismo, se considera biológicamente activa. En casos particulares, cuando un ácido nucleico es biológicamente activo, una porción de ese ácido nucleico que comparte al menos una actividad biológica del ácido nucleico completo se conoce típicamente como una porción "biológicamente activa".

Conservado: Según se usa en la presente, el término "conservado" se refiere a nucleótidos o residuos de aminoácidos de una secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que son aquellos que se presentan sin alterar en la misma posición de dos o más secuencias relacionadas que estén siendo comparadas. Los nucleótidos o aminoácidos que se conservan relativamente son aquellos que se conservan entre secuencias más emparentadas que los nucleótidos o aminoácidos que aparecen en otra parte en las secuencias. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias son "completamente conservadas" si son 100 % idénticas entre sí. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias son "altamente conservadas" si son al menos 70 % idénticas, al menos 80 % idénticas, al menos 90 % idénticas o al menos 95 % idénticas entre sí. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias son "altamente conservadas" si son aproximadamente 70 % idénticas, aproximadamente 80 % idénticas, aproximadamente 90 % idénticas, aproximadamente 95 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % idénticas entre sí. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias son "conservadas" si son al menos 30 % idénticas, al menos 40 % idénticas, al menos 50 % idénticas, al menos 60 % idénticas, al menos 70 % idénticas, al menos 80 % idénticas, al menos 90 % idénticas o al menos 95 % idénticas entre sí. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias son "conservadas" si son aproximadamente 30 % idénticas, aproximadamente 40 % idénticas, aproximadamente 50 % idénticas, aproximadamente 60 % idénticas, aproximadamente 70 % idénticas, aproximadamente 80 % idénticas, aproximadamente 90 % idénticas, aproximadamente 95 % idénticas, aproximadamente 98 % idénticas o aproximadamente 99 % idénticas entre sí.

Expresión: Según se usa en la presente, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a uno o más de los siguientes eventos: (1) producción de una plantilla de ARN a partir de una secuencia de ADN (por ejemplo, por transcripción); (2) procesamiento de un transcrito de ARN (por ejemplo, por empalme, edición, formación de caperuza 5' y/o procesamiento de extremos 3'); (3) traducción de un ARN en un polipéptido o proteína; y (4) modificación post-traducciona de un polipéptido o proteína.

Ex vivo: Según se usa en la presente, "ex vivo" se refiere a eventos que ocurren fuera de un organismo, por ejemplo, en o sobre tejido en un ambiente artificial fuera del organismo, por ejemplo, con la alteración mínima de condiciones naturales.

Funcional: Según se usa en la presente, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en la cual exhibe una propiedad y/o actividad por la que se caracteriza.

Homología: Según se usa en la presente, el término "homología" se refiere al parentesco general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. En algunos casos, se considera que las moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al

menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idénticas. En algunos casos, se considera que las moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % similares. El término "homólogo" necesariamente se refiere a una comparación entre al menos dos secuencias (secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos). De acuerdo con la divulgación, se considera que dos secuencias de nucleótidos son homólogas si los polipéptidos que codifican son al menos aproximadamente 50 % idénticos, al menos aproximadamente 60 % idénticos, al menos aproximadamente 70 % idénticos, al menos aproximadamente 80 % idénticos o al menos 90 % idénticos para al menos un tramo de al menos aproximadamente 20 aminoácidos. En algunos casos, las secuencias de nucleótidos homólogas son caracterizadas por la capacidad para codificar un tramo de al menos 4-5 aminoácidos especificados en forma única. Tanto la identidad como la separación aproximada de estos aminoácidos unos con respecto a otros deben considerarse para que las secuencias de nucleótidos se consideren homólogas. Para secuencias de nucleótidos de menos de 60 nucleótidos de largo, la homología se determina por la capacidad para codificar un tramo de al menos 4-5 aminoácidos especificados en forma única. De acuerdo con la invención se considera que dos secuencias de proteínas son homólogas si las proteínas son al menos aproximadamente 50 % idénticas, al menos aproximadamente 60 % idénticas, al menos aproximadamente 70 % idénticas, al menos aproximadamente 80 % idénticas o al menos aproximadamente 90 % idénticas para al menos un tramo de al menos aproximadamente 20 aminoácidos.

Identidad: Según se usa en la presente, el término "identidad" se refiere al parentesco total entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo de la identidad porcentual de dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, se puede llevar a cabo al alinear las dos secuencias para fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencias de ácido nucleico para alineación óptima y las secuencias no idénticas pueden ser ignoradas para fines de comparación). En ciertos casos, la longitud de una secuencia alineada para fines de comparación es al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los nucleótidos en posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, lo cual tiene que introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, la identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando métodos tales como aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., ed.s, M Stockton Press, Nueva York, 1991. Por ejemplo, la identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), el cual ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de residuos de ponderación PAM120, una penalización de longitud de espacios de 12 y una penalización de espacio de 4. La identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos puede, como alternativa, determinarse usando un programa GAP en el paquete de software GCG usando una matriz NWSgapdna.CMP. Los métodos comúnmente empleados para determinar la identidad porcentual entre secuencias incluyen, pero no están limitados a aquellos descritos en Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988). Las técnicas para determinar la identidad están codificadas en programas informáticos disponibles públicamente. Los ejemplos de software informático para determinar la homología entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, el paquete de programas GCG, Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA Atschul, S. F., et al., *J. Molec. Biol.*, 215, 403 (1990)).

Inhibir la expresión de un gen: Según se usa en la presente, la frase "inhibir la expresión de un gen" significa causar una reducción en la cantidad de un producto de expresión del gen. El producto de expresión puede ser un ARN transcrito a partir del gen (por ejemplo, un ARNm) o un polipéptido traducido a partir de un ARNm transcrito del gen. Típicamente una reducción en el nivel de un ARNm da lugar a una reducción en el nivel de un polipéptido traducido a partir del mismo. El nivel de expresión puede determinarse usando técnicas estándares para medir ARNm o proteína.

In vitro: Según se usa en la presente, la expresión "*in vitro*" se refiere a eventos que se presentan en un ambiente artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, en una placa de Petri, etc., en lugar de dentro de un organismo (por ejemplo, animal, vegetal o microbio).

In vivo: Según se usa en la presente, la expresión "*in vivo*" se refiere a eventos que se presentan dentro de un organismo (por ejemplo, animal, vegetal o microbio).

Aislada: Según se usa en la presente, el término "aislada" se refiere a una sustancia o entidad que ha sido (1) separada de al menos algunos de los componentes con los cuales estaba asociada cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza o en un escenario experimental), y/o (2) producida, preparada y/o fabricada por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o más de los demás componentes con los cuales estaban inicialmente asociadas. En algunos casos, los agentes aislados son más de aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o más de aproximadamente 99 % puros. Según se usa en la presente, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes.

Prevenir: Según se usa en la presente, el término "prevenir" se refiere a retrasar parcial o completamente el inicio de una enfermedad, trastorno y/o afección particular; retrasar parcial o completamente el inicio de uno o más síntomas, características o manifestaciones clínicas de una enfermedad, trastorno y/o afección particular (por ejemplo, antes de una enfermedad, trastorno y/o afección identificable); retrasar parcial o completamente la progresión de una enfermedad, trastorno y/o afección latente para activar la enfermedad, trastorno y/o afección; y/o reducir el riesgo de desarrollar patología asociada con una enfermedad, trastorno y/o afección particular.

Similitud: Según se usa en la presente, el término "similitud" se refiere al parentesco total entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo de la similitud porcentual de las moléculas poliméricas entre sí puede llevarse a cabo de la misma manera que un cálculo de la identidad porcentual, excepto que el cálculo de la similitud porcentual tiene en cuenta las sustituciones conservadoras como se entiende en la técnica.

Sujeto: Según se usa en la presente, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo al cual se le pueda administrar una composición de acuerdo con la invención, por ejemplo, para propósitos experimentales, de diagnóstico, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y seres humanos) y/o plantas.

Sustancialmente: Según se usa en la presente, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir un grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente, si es que alguna vez, llegan a concluirse y/o proceder a una conclusión o lograr o evitar un resultado absoluto. El término "sustancialmente" se usa por lo tanto aquí para capturar la falta potencial de conclusión inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

Padecer: A un individuo que está "padeciendo" una enfermedad, trastorno y/o afección se le ha diagnosticado o presenta uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afección.

Susceptible a: A un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno y/o afección no se le ha diagnosticado y/o puede no exhibir síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunos casos, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, cáncer) puede caracterizarse por uno o más de los siguientes: (1) una mutación genética asociada con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (2) un polimorfismo genético asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (3) expresión y/o actividad incrementada y/o reducida de una proteína y/o ácido nucleico asociado con la enfermedad, trastorno y/o afección; (4) hábitos y/o estilos de vida asociados con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (5) un historial familiar de la enfermedad, trastorno y/o afección; y (6) exposición a y/o infección con un microbio asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunos casos, un individuo que sea susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunos casos, un individuo que sea susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Según se usa en la presente, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente que será suministrada (por ejemplo, ácido nucleico, fármaco, agente terapéutico, agente de diagnóstico, agente profiláctico, etc.) que sea suficiente, cuando se administre a un sujeto que padezca o sea susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, mejorar síntomas de, diagnosticar, prevenir y/o retrasar el inicio de la enfermedad, trastorno y/o afección.

Factor de transcripción: Según se usa en la presente, la expresión "factor de transcripción" se refiere a una proteína de unión a ADN que regula la transcripción de ADN en ARN, por ejemplo, mediante activación o represión de transcripción. Algunos factores de transcripción llevan a cabo la regulación de la transcripción solamente, mientras que otros actúan en concierto con otras proteínas. Algunos factores de transcripción pueden tanto activar como reprimir la transcripción en ciertas condiciones. En general, los factores de transcripción se unen a una secuencia o secuencias objetivo específicas de manera altamente similar a la de una secuencia de consenso específica en una región reguladora de un gen objetivo. Los factores de transcripción pueden regular la transcripción de un gen

objetivo solo o en un complejo con otras moléculas.

Tratar: Según se usa en la presente, el término "tratar" se refiere a parcial o completamente aliviar, reducir, mejorar, aliviar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas, características o manifestaciones clínicas de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. Por ejemplo, "tratar" cáncer puede referirse a inhibir la supervivencia, crecimiento y/o dispersión de un tumor. El tratamiento puede ser administrado a un sujeto que no exhiba señales de una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, antes de una enfermedad, trastorno y/o afección identificable) y/o a un sujeto que exhiba sólo signos tempranos de una enfermedad, trastorno y/o afección con el fin de reducir el riesgo de desarrollar patología asociada con enfermedad, trastorno y/o afección. En algunos casos, el tratamiento comprende el suministro de una proteína asociada con un ácido nucleico terapéuticamente activo a un sujeto que lo requiera.

No modificado: Según se usa en la presente, "no modificado" se refiere a un ácido nucleico antes de ser modificado.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de ARNm modificado

Se prepararon moléculas de ARNm modificadas (ARNmod) usando métodos y materiales de laboratorio estándares. El marco de lectura abierto (ORF) del gen de interés es flanqueado por una región 5' no traducida (UTR) que contiene una fuerte señal de inicio de traducción de Kozak y una 3'UTR de alfa-globina que termina con una secuencia oligo(dT) para la adición templada de una cola poliA. Los ARNm fueron modificados con pseudouridina (Ψ) y 5-metil-citidina (5meC) para reducir la respuesta inmunitaria innata celular. Kariko K *et al.* Immunity 23:165-75 (2005), Kariko K *et al.* Mol Ther 16:1833-40 (2008), Anderson BR *et al.* NAR (2010).

La clonación, síntesis génica y secuenciación de vectores se llevaron a cabo con DNA2.0 Inc. (Menlo Park, CA). Las secuencias de vectores y secuencias de inserto se muestran en SEQ ID NO: 5-8. Los ORF fueron digeridos por restricción usando XbaI o HindIII y usados para síntesis de ADNc usando PCR de cola. Este producto de ADNc de PCR de cola se usó como la plantilla para la reacción de síntesis de ARNm modificado usando 25 mM de cada mezcla de nucleótidos modificados (U/C modificada fue fabricada por TriLink Biotech, San Diego, CA, A/G no modificada se compró de Epicenter Biotechnologies, Madison, WI) y kit de síntesis de ARNm completo CellScript MegaScript™ (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI). La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo durante 3-4 horas a 37 °C. La reacción de PCR usó HiFi PCR 2X Master Mix™ (Kapa Biosystems, Woburn, MA). El producto de ARNm transcrito *in vitro* se llevó a cabo en un gel de agarosa y se visualizó. El ARNm se purificó con el kit de purificación Ambion/Applied Biosystems (Austin, TX) MEGAClear RNA™. La PCR usó el kit de purificación de PCR PureLink™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) o el kit de limpieza de PCR (Qiagen, Valencia, CA). El producto se cuantificó en Nanodrop™ UV Absorbance (ThermoFisher, Waltham, MA). La calidad, calidad de absorbancia UV y visualización del producto se llevaron a cabo en un gel de agarosa al 1,2 %. El producto se resuspendió en regulador de pH TE.

A las moléculas de ARN modificadas que incorporan análogos de adenosina les fueron dadas colas poli (A) usando poli(A) polimerasa de levadura (Affymetrix, Santa Clara, CA). La reacción de PCR usó HiFi PCR 2X Master Mix™ (Kapa Biosystems, Woburn, MA). Las moléculas de ARN modificadas fueron recubiertas después de la transcripción usando enzima de recubrimiento de virus vaccinia recombinante (New England BioLabs, Ipswich, MA) y una 2'-O-metiltransferasa recombinante (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI) para generar la estructura Cap1 de 5'-guanosina. La estructura Cap2 y la estructura Cap3 pueden generarse usando 2'-O-metiltransferasas adicionales. El producto de ARNm transcrito *in vitro* se llevó a cabo en un gel de agarosa y se visualizó. El ARN modificado se purificó con el kit de purificación Ambion/Applied Biosystems (Austin, TX) MEGAClear RNA™. La PCR usó el kit de purificación PCR PureLink™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). El producto se cuantificó en Nanodrop™ UV Absorbance (ThermoFisher, Waltham, MA). La calidad, calidad de absorbancia UV y visualización del producto se llevaron a cabo en un gel de agarosa al 1,2 %. El producto se resuspendió en regulador de pH TE.

Estructuras de recubrimiento ejemplares. El recubrimiento 5' de ARN modificado puede completarse en forma concomitante durante la reacción de transcripción *in vitro* usando los siguientes análogos de recubrimiento de ARN químicos para generar la estructura de caperuza de 5'-guanosina de acuerdo con los protocolos del fabricante: 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G; G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')A; m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). El recubrimiento 5' de ARN modificado puede completarse después de la transcripción usando una enzima de recubrimiento de virus vaccinia para generar la estructura "Cap 0": m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). La estructura Cap 1 puede generarse usando tanto enzima de recubrimiento de virus vaccinia como una 2'-O-metil-transferasa para generar: m7G(5')ppp(5')G-2'-O-metilo. La estructura Cap 2 puede generarse a partir de la estructura Cap 1 seguida por la 2'-O-metilación del nucleótido antepenúltimo 5' usando una 2'-O-metil-transferasa. La estructura Cap 3 puede generarse a partir de la estructura Cap 2 seguida por la 2'-O-metilación del nucleótido preantepenúltimo 5' usando una 2'-O-metil-transferasa. Las enzimas se obtienen preferiblemente de una fuente recombinante.

Cuando se transfectan en células de mamífero, las moléculas de ARNm modificadas pueden tener una estabilidad

de entre 12-18 horas o más de 18 horas, por ejemplo, 24, 36, 48, 60, 72 o más de 72 horas.

Ejemplo 2: Generación de novo de una línea de células de producción comercial de mamífero que expresa G-CSF humano como un agente terapéutico en biorreactor modelo

- 5 La secuencia de ácido nucleico para el precursor del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) humano se muestra en SEQ ID NO: 1:

```
agcttttgaccctcgtacagaagctaatacgaactactatagggaataagagagaaaagaagagtaagaagaatataa
gagccaccatggccgggtcccgacccaaagcccatgaaacttatggccctgcagttgctgcttggcactcggccctctggacagtcca
agaagcgactcctcctggacctgcctcatcgttccgcagtcattcctttgaaagtgtctggagcaggtgcgaaagattcagggcgatggag
ccgcactccaagagaagctctgcgcgacatacaaaactttgccatcccaggagctcgtactgctcgggcacagcttggggattccctgggc
tcctctctcgtctgtccgtcgcaggctttgcagttggcaggggtgcctttccagctccactccggttgttctgtatcagggactgctgaag
cccttgagggaatctcggcagaattggggccgacgctggacacgttgagctcgacgtggcggtattcgaacaaccatctggcagcaga
tgagggaactggggatggcaccgcgctgcagccacgcagggggaatgccggcctttgcgtccgcgtttcagcgcaggggcggtgg
agtctctgtagcgcagccaccttcaatcattttggaagtctgtaccgggtgctgagacatcttcgcagccgtgaagcgctgccttctcggg
ggcttgccttctggccatgcccttctctccttgcacctgtaccttctgttgaataaagcctgagtaggaaggcgccgctcgagcat
gcatctagagggcccaattcgccctattcgaagtcg (SEQ ID NO: 1)
```

- 10 La secuencia de ácido nucleico para ARNm de G-CSF se muestra en SEQ ID NO: 2:

```
agcuuuuggaccucguacagaagcuauuacgacucacuauagggaauaagagagaaaagaagaguaagaagaaauuaaaga
gccaccaugggccggucccgacccaaagcccaugaaacuuaugcccgagcaguuugcugcuuuggcacucggccucugggac
agucaagaagcgacuccucugcaccugccuacuguuugccgagucuuuccuuuagugucugggagcagguugcgaaag
auucaggggcgaugggcgcacuccaagagaagcucugcgcgacauacaaacuugccaucccgaggagcucguacugcucgg
gcacagcuuugggauuuccugggcuccucucuguccuguccgucgagcagcuuugcaguuugcagggugccuuuccagcu
ccacuccgguuuuguuuauuagggacugcugcaagcccuugagggaauucugccagaauugggcccgcgucggacacg
uuugcagcucgacugggcgauuucgcaacaaccaucuggcagcagauagggaacuggggagugcaccgcgcugcagccca
cgcagggggcaaugccggccuuugcguccgcguuucagcgcagggcggguggaguccucguagcgagccaccuucauauu
uuuggaagucucguaccgggugcugagacauuugcgagccgugaagcgucgcuuucugcggggcuugccuucuggccau
ggccuucucucuccuugcaccuguaaccuuggucuuugaauaaagccugaguaaggagcgccgcgucgagcaugcauc
uagaggggcccaauucgcccuaucgaagucg (SEQ ID NO: 2)
```

- 15 La secuencia de ácido nucleico para un ARNm modificado con G-CSF ejemplar (ARNmod) se muestra en SEQ ID NO: 3:

```
ag5meCψψψψgga5meC5meC5meCψ5meCgψa5meCagaag5meCψaaψa5meCga5meCψ5meCa5
meCψaψagggaaaψaagagagaaaaaagagψaagaagaaψaagag5meC5meCa5meC5meCψgg5meC
5meCggψ5meC5meC5meCg5meCga5meC5meC5meCaaag5meC5meC5meC5meCψgaaa5meC
```

ψψαψgg5meC5meC5meCψg5meCagψψg5meCψg5meCψψψgg5meCa5meCψ5meCgg5meC5me
 C5meCψ5meCψgg5meCagψ5meC5meCaagaag5meCga5meCψ5meC5meCψ5meCψ5meCgga5
 meC5meCψg5meC5meCψ5meCαψ5meCgψψg5meC5meCg5meCagψ5meCαψψ5meC5meCψψψ
 ψgaagψgψ5meCψggag5meCaggψg5meCgaagaψψ5meCaggg5meCgaψggag5meC5meCg5meCa
 5meCψ5meC5meCaagagaag5meCψ5meCψg5meCg5meCga5meCαψa5meCaaa5meCψψψg5me
 C5meCαψ5meC5meC5meCgaggag5meCψ5meCgψa5meCψg5meCψ5meCggg5meCa5meCag5
 meCψψggggαψψ5meC5meC5meCψggg5meCψ5meC5meCψ5meCψ5meCψ5meCgψ5meC5meC
 ψgψ5meC5meCgψ5meCg5meCagg5meCψψψg5meCagψψg5meCagggψg5meC5meCψψψ5me
 C5meC5meCag5meCψ5meC5meCa5meCψ5meC5meCggψψψgψψ5meCψψgψαψ5meCaggga5m
 eCψg5meCψg5meCaag5meC5meC5meCψψgagggaψ5meCψ5meCg5meC5meCagaαψψggg5me
 C5meC5meCga5meCg5meCψgg5meCa5meCgψψg5meCag5meCψ5meCga5meCgψgg5meCgg
 αψψψ5meCg5meCaa5meCaa5meC5meCαψ5meCψgg5meCag5meCagaψggaggaa5meCψgggαψ
 gg5meCa5meC5meC5meCg5meCg5meCψg5meCag5meC5meC5meCa5meCg5meCaggggg5me
 Caαψg5meC5meCgg5meC5meCψψψg5meCgψ5meC5meCg5meCgψψψ5meCag5meCg5meCag
 gg5meCgggψggagψ5meC5meCψ5meCgψag5meCgag5meC5meCa5meC5meCψψ5meCaαψ5me
 Caψψψψggaagψ5meCψ5meCgψa5meC5meCgggψg5meCψgaga5meCαψ5meCψψg5meCg5me
 Cag5meC5meCgψgaag5meCg5meCψg5meC5meCψψ5meCψg5meCggg5meCψψg5meC5meC
 ψψ5meCψgg5meC5meCαψg5meC5meC5meCψψ5meCψψ5meCψ5meCψ5meC5meC5meCψψg
 5meCa5meC5meCψgψa5meC5meCψ5meCψψggψ5meCψψψgaaψaaag5meC5meCψgagψaggag
 g5meCgg5meC5meCg5meCψ5meCgag5meCαψg5meCαψ5meCψagagg5meC5meC5meCaαψψ
 5meCg5meC5meC5meCψαψψ5meCgaagψ5meCg (SEQ ID NO: 3)

La figura 1 muestra un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para factor estimulador de colonias de
 granulocitos (G-CSF) humano a partir de células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con ARNmod para
 G-CSF. Las células CHO se cultivaron en medio CD CHO con suplemento de L-glutamina, hipoxantina y timidina. Se
 transfectaron 2 x 10⁶ células con 24 ug de ARNmod en complejo con RNAiMax de Invitrogen en un matraz de cultivo
 de 75 cm² de Corning con 7 ml de medio. El complejo ARN:RNAiMAX se formó al incubar primero el ARN con medio
 CD CHO en una dilución volumétrica 5X durante 10 minutos a temperatura ambiente. En un segundo frasco, se
 incubó reactivo RNAiMAX con medio CD CHO en una dilución volumétrica 10X durante 10 minutos a temperatura
 ambiente. El frasco de ARN se mezcló después con el frasco de RNAiMAX y se incubó durante 20-30 minutos a
 temperatura ambiente antes de ser añadido a las células de una forma por goteo. La concentración de huG-CSF
 secretado en el medio de cultivo se midió 12 y 24 horas después de la transfección. Los sobrenadantes de células
 fueron almacenados a -20 °C. La secreción de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) humano a
 partir de células de riñón embrionario humanas se cuantificó usando un kit de ELISA de Invitrogen siguiendo las
 instrucciones recomendadas por los fabricantes. Estos datos muestran que ARNmod de huG-CSF (SEQ ID NO: 3)
 puede ser traducido en células CHO, y que huG-CSF es secretado fuera de las células y liberado en el ambiente
 extracelular. Además, estos datos demuestran que la transfección de células con huG-CSF de ARNmod para la
 producción de proteína secretada puede aumentarse de escala hasta un biorreactor o condiciones de cultivo de
 células grandes.

Ejemplo 3: Generación de novo de una línea de células de producción comercial de mamífero que expresan anticuerpos IgG humanizados (trastuzumab y rituximab) como un agente terapéutico de biorreactor modelo

La secuencia de ácido nucleico para la cadena pesada de rituximab se muestra en SEQ ID NO: 4:

CTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAA
ATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAG
AGCCACCATGGCCGTGATGGCGCCGAGGACCCTGG
TGCTCTTGCTCACGGGTGCCTTGGCCCTCACGCAA
ACATGGGCGGGACAGGCGTACTTGCAGCAGTCAGG
GGCAGAACTCGTAAGGCCCCGGAGCGTCGGTGAAGA
TGTCGTGTAAAGCGTCGGGCTATACTTTCACATCG
TACAACATGCACTGGGTCAAACAGACGCCCCGACA
AGGGCTGGAGTGGATTGGAGCTATCTACCCCGGTA
ACGGGGATACGTCGTACAACCAGAAGTTTAAGGGG
AAGGCGACTCTTACTGTGCGACAAGTCGTCCTCCAC
CGCCTATATGCAGCTGTGAGCCTGACTTCGGAAG
ATTCAGCGGTGTACTTTTGTGCGCGCGTGGTCTAT
TACTCAAATTCGTATTGGTATTTTCGATGTGTGGGG
TACGGGGACCACTGTGACCGTGTGAGGACCCTCGG
TATTCCCCCTCGCGCCTAGCTCAAAGTCCACCTCC
GGGGGAACAGCCGCCTTGGGTTGCTTGGTAAAGGA

CTATTTCCCCGAGCCCGTCACAGTGAGCTGGAAC
 CCGGGGCACTGACATCGGGAGTGCACACGTTTCCC
 GCGGTACTTCAGTCATCAGGACTCTACTCGCTGTC
 AAGCGTGGTCACGGTGCCTTCATCCTCCCTTGGAA
 CGCAGACTTACATCTGCAACGTGAATCATAAGCCT
 AGCAATACCAAGGTCGACAAGAAAGCCGAACCCAA
 ATCATGTGATAAAACACACACGTGTCTCCCTGCC
 CCGCACCGGAGCTTCTCGGGGGACCGAGCGTGTTT
 TTGTTTCCACCTAAGCCGAAAGATACGCTTATGAT
 CTCCCGGACCCCCGAAGTAACTTGCGTAGTAGTAG
 ACGTAAGCCACGAGGACCCCGAAGTGAAATTCAAT
 TGGTACGTCGACGGAGTGGAGGTCCATAATGCGAA
 AACAAAGCCGAGAGAGGAACAGTACAATTCCACAT
 ACCGCGTCGTAAGCGTCTTGACAGTATTGCATCAG
 GATTGGCTGAACGGAAAGGAATACAAGTGCAAAGT
 ATCAAACAAAGCACTTCCGGCACCGATTGAAAAGA
 CGATCTCAAAAGCAAAAGGGCAACCTCGGGAGCCA
 CAAGTCTATACTCTCCCGCCGTCGCGCGATGAATT
 GACCAAAAACCAGGTGTCCCTTACATGTCTCGTAA
 AGGGTTTTTACCCGTCAGACATCGCCGTCGAGTGG
 GAGTCAAACGGTCAGCCGGAGAATAACTATAAGAC
 GACCCCAACAGTCTTGACAGCGATGGCTCCTTCT
 TCTTGTATTCAAAGCTGACGGTGGACAAATCGAGA
 TGGCAGCAGGGTAATGTGTTTTTCGTGCAGCGTCAT
 GCACGAGGCGCTTCATAATCATTACACTCAAAAGT
 CCCTGTGCTGTGCGCCCGGAAAGCACCATCACAC
 CACCATGAAGCGCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCTT
 TCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGT
 ACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAG
 GCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA (SEQ ID NO: 4)

La secuencia de ácido nucleico para el ARNm para la cadena pesada de rituximab se muestra en SEQ ID NO: 5:

CUCGUACAGAAGCUAAUACGACUCACUAUAGGGAA
 AUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAG
 AGCCACCAUGGCCGUGAUGGCGCCGAGGACCCUGG
 UGCUCUUGCUCACGGGUGCCUUGGCCCUCACGCAA
 ACAUGGGCGGGACAGGCGUACUUGCAGCAGUCAGG
 GGCAGAACUCGUAAGGCCCCGAGCGUCGGUGAAGA
 UGUCGUGUAAAGCGUCGGGCUAUACUUUCACAUCG
 UACAACAUGCACUGGGUCAAACAGACGCCCCGACA
 AGGGCUGGAGUGGAUUGGAGCUAUCUACCCCGGUA
 ACGGGGAUACGUCGUACAACCAGAAGUUUAAGGGG
 AAGGCGACUCUACUGUCGACAAGUCGUCCUCCAC
 CGCCUAUAUGCAGCUGUCGAGCCUGACUUCGGAAG
 AUUCAGCGGUGUACUUUUGUGCGCGCGUGGUCUAU
 UACUCAAAUUCGUAUUGGUAAUUCGAUGUGUGGGG
 UACGGGGACCACUGUGACCGUGUCAGGACCCUCGG
 UAUUCCCCCUCGCGCCUAGCUCAAAGUCCACCUCC
 GGGGGAACAGCCGCCUUGGGUUGCUUGGUAAAGGA
 CUAUUUCCCCGAGCCCGUCACAGUGAGCUGGAACU
 CCGGGGCACUGACAUCGGGAGUGCACACGUUUCCC
 GCGGUACUUCAGUCAUCAGGACUCUACUCGCUGUC
 AAGCGUGGUCACGGUGCCUUCAUCCUCCCUUGGAA
 CGCAGACUUACAUCUGCAACGUGAAUCAUAAGCCU
 AGCAAUACCAAGGUCGACAAGAAAGCCGAACCCAA
 AUCAUGUGAUAAAACACACACGUGUCCUCCCUGCC
 CCGCACCGGAGCUUCUCGGGGGACCGAGCGUGUUC
 UUGUUUCCACCUAAGCCGAAAGAUACGCUUAUGAU
 CUCCCCGACCCCCGAAGUAACUUGCGUAGUAGUAG
 ACGUAAGCCACGAGGACCCCGAAGUGAAAUAUCAAU
 UGGUACGUCGACGGAGUGGAGGUCCAUAUUGCGAA

AACAAAGCCGAGAGAGGAACAGUACAAUUCCACAU
 ACCGCGUCGUAAGCGUCUUGACAGUAUUGCAUCAG
 GAUUGGCUGAACGGAAAGGAAUACAAGUGCAAAGU
 AUCAAACAAAGCACUUCCGGCACCGAUUGAAAAGA
 CGAUCUCAAAAGCAAAAGGGCAACCUCGGGAGCCA
 CAAGUCUAUACUCUCCCGCCGUCGCGCGAUGAAUU
 GACCAAAAACCAGGUGUCCCUUACAUGUCUCGUAA
 AGGGUUUUUACCCGUCAGACAUCGCCGUCGAGUGG
 GAGUCAAAACGGUCAGCCGGAGAAUAACUAUAAGAC
 GACCCACCAGUCUUGGACAGCGAUGGCUCUUUCU
 UCUUGUAUUCAAAGCUGACGGUGGACAAUUCGAGA
 UGGCAGCAGGGUAAUGUGUUUUCGUGCAGCGUCAU
 GCACGAGGCGCUUCAUAAUCAUUAACUCUAAAAGU
 CCCUGUCGCUGUCGCCCCGAAAGCACCAUCACCAC
 CACCAUUGAAGCGCUGCCUUCUGCGGGGCUUGCCU
 UCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGU
 ACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAG
 GCGGCCGCUUCGAGCAUGCAUCUAGA (SEQ ID NO: 5)

La secuencia de ácido nucleico para la secuencia de ácido nucleico para la cadena ligera de rituximab se muestra en SEQ ID NO: 6:

5

CTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAA
 ATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAG
 AGCCACCATGGCTGTCATGGCCCCGAGAACTTG
 TGCTGTTGTTGACAGGAGCGCTCGCACTCACACAG
 ACTTGGGCGGTCAGATTGTGCTCAGCCAGTCCGC
 AGCGATCCTTTCCGGCCTCCCCTGGTGAGAAAGTAA
 CGATGACGTGCCGAGCCTCCTCAAGCGTGTACATAC
 ATGCATTGGTATCAGCAGAAGCCTGGGTCGTGCGC
 CAAGCCCTGGATCTACGCCCCGTCCAATCTTGCGT
 CAGGGGTCCCGGCACGGTTCAGCGGATCGGGGTGCG
 GGTACATCGTATTCCTCACGATTAGCCGCGTAGA

GGCCGAGGACGCGGCGACTTACTACTGTCAGCAAT
 GGTCTTTTAATCCACCCACGTTTGGAGCGGGCACC
 AAGCTCGAACTTAAAAGAACGGTCGCCGCACCCTC
 AGTGTTTATCTTCCCGCCCTCGGACGAACAACCTTA
 AGTCGGGGACCGCTTCCGTGGTGTGCTTGCTGAAC
 AATTTCTATCCTCGGGAAGCTAAAGTGCAATGGAA
 AGTCGATAACGCATTGCAGAGCGGAAACTCACAAG
 AGTCGGTAACTGAGCAGGATAGCAAGGATTCGACA
 TACTCGCTGAGCAGCACGCTGACGTTGTCCAAGGC
 GGACTACGAGAAACACAAGGTATATGCGTGTGAAG
 TCACCCACCAGGGATTGTCATCGCCGGTCACCAA
 TCATTCAACAGGTGATAAAGCGCTGCCTTCTGCGG
 GGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCT
 TGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTG
 AGTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
 (SEQ ID NO: 6)

La secuencia de ácido nucleico para el ARNm de la cadena ligera de rituximab se muestra en SEQ ID NO: 7:

CUCGUACAGAAGCUAAUACGACUCACUAUAGGGAA
 AUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUUAAG
 AGCCACCAUGGCUGUCAUGGCCCCGAGAACACUUG
 UGCUGUUGUUGACAGGAGCGCUCGCACUCACACAG
 ACUUGGGCCGGUCAGAUUGUGCUCAGCCAGUCGCC
 AGCGAUCCUUUCGGCCUCCCCUGGUGAGAAAGUAA
 CGAUGACGUGCCGAGCCUCCUCAAGCGUGUCAUAC
 AUGCAUUGGUUAUCAGCAGAAGCCUGGGUCGUCGCC
 CAAGCCCUGGAUCUACGCCCCGUCCAAUCUUGCGU
 CAGGGGUCCCCGGCACGGUUCAGCGGAUCGGGGUCG
 GGUACAUCGUAAUUCACUCACGAUUAGCCGCGUAGA
 GGCCGAGGACGCGGCGACUUACUACUGUCAGCAAU
 5 GGUCCUUUAAUCCACCCACGUUUGGAGCGGGCACC

AAGCUCGAACUUA AAAAGAACGGUCGCCGCACCCUC
 AGUGUUUAUCU UCCCGCCCUCGGACGAACAACUUA
 AGUCGGGGACCGCU UCCGUGGUGUGCUUGCUGAAC
 AAUUUCUAUCCUCGGGAAGCUAAAAGUGCAAUGGAA
 AGUCGAUAACGCAUUGCAGAGCGGAAACUCACAAG
 AGUCGGUAACUGAGCAGGAUAGCAAGGAUUCGACA
 UACUCGCUGAGCAGCACGCUGACGUUGUCCAAGGC
 GGACUACGAGAAACACAAGGUAAU AUGCGUGUGAAG
 UCACCCACCAGGGAUUGUCAUCGCCGGUCACCAAA
 UCAUUCAACAGGUGAUAAAAGCGCUGCCUUCUGCGG
 GGUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCU
 UGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG
 AGUAGGAAGGCGGCCGCUCGAGCAUGCAUCUAGA

(SEQ ID NO: 7)

La secuencia de ácido nucleico para la secuencia de ácido nucleico para la cadena pesada de trastuzumab se muestra en SEQ ID NO: 8:

5

CTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAA
 ATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAG
 AGCCACCATGGCCGTGATGGCGCCGCGGACCCTGG
 TCCTCCTGCTGACCGGCGCCCTCGCCCTGACGCAG
 ACCTGGGGCCGGGGAGGTGCAGCTGGTCGAGAGCGG
 CGGGGGCCTCGTGCAGCCGGGCGGGTCGCTGCGGC
 TGAGCTGCGCCGCGAGCGGGTTCAACATCAAGGAC
 ACCTACATCCACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCAA
 GGGCCTCGAGTGGGTGCGCCGGATCTACCCACGA
 ACGGGTACACCCGCTACGCCGACAGCGTGAAGGGC
 CGGTTACCATCAGCGCGGACACCTCGAAGAACAC
 GGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAGG
 ACACCGCCGTGTACTACTGCAGCCGGTGGGGCGGC
 GACGGGTTCTACGCCATGGACTACTGGGGGCAGGG
 CACCCTCGTCACCGTGAGCAGCGCGTCGACGAAGG

GGCCCAGCGTGTTCCCGCTGGCCCCCAGCAGCAAG
 AGCACCAGCGGCGGGACCGCCGCCCTGGGCTGCCT
 CGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT
 CGTGGAACAGCGGCGCGCTGACGAGCGGGGTCCAC
 ACCTTCCCGGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTCTA
 CTCGCTGAGCAGCGTGGTACCGTGCCCAGCAGCA
 GCCTGGGGACCCAGACGTACATCTGCAACGTGAAC
 CACAAGCCCTCGAACACCAAGGTCGACAAGAAGGT
 GGAGCCCCCGAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCT
 GCCCCGCCCTGCCCCGCCCCCGAGCTCCTGGGCGGG
 CCCAGCGTGTTCTTCTTCCCGCCCAAGCCCAAGGA
 CACGCTCATGATCAGCCGCACCCCCGAGGTCACCT
 GCGTGGTGGTTCGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAG
 GTGAAGTTCAACTGGTACGTGACGGCGTGGAGGT
 GCACAACGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACAACTCGACGTACCGCGTTCGTGAGCGTGCTGACC
 GTCCTGCACCAGGACTGGCTCAACGGCAAGGAGTA
 CAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCGCGC
 CCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGGCAG
 CCCCCGGAGCCGCAGGTGTACACCCTGCCCCCAG
 CCGCGACGAGCTACGAAGAACCAGGTCAGCCTGA
 CCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCGGACATC
 CCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGGCAGCCGGAGAA
 CAACTACAAGACCACCCCGCCCGTCCTCGACAGCG
 ACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACGGTG
 GACAAGTCGCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAG
 CTGCAGCGTCATGCACGAGGCCCTCCACAACCACT
 ACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGGAAG
 CATCATCATCATCATCATTGAAGCGCTGCCTTCTG
 CGGGGCTTGCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTC
 CCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGC
 CTGAGTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTA

GA (SEQ ID NO: 8)

La secuencia de ácido nucleico del ARNm para la cadena pesada de trastuzumab se muestra en SEQ ID NO: 9:

CUCGUACAGAAGCUAAUACGACUCACUUAUAGGGAA
 AUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAG
 AGCCACCAUGGCCGUGAUGGCGCCGCGGACCCUGG
 UCCUCCUGCUGACCGGCGCCCUCGCCCUGACGCAG
 ACCUGGGCCGGGAGGUGCAGCUGGUCGAGAGCGG
 CGGGGGCCUCGUGCAGCCGGGCGGGUCGUCGCGG
 UGAGCUGCGCCGCGAGCGGGUUAACAUAAGGAC
 ACCUACAUCCACUGGGUGCGCCAGGCCCCCGGCAA
 GGGCCUCGAGUGGGUCGCCCAGAUCAACCCACGA
 ACGGGUACACCCGCUACGCCGACAGCGUGAAGGGC
 CGGUUCACCAUCAGCGCGGACACCUCGAAGAACAC
 GGCCUACCUGCAGAUGAACAGCCUGCGCGCCGAGG
 ACACCGCCGUGUACUACUGCAGCCGGUGGGGCGGC
 GACGGGUUCUACGCCAUGGACUACUGGGGGCAGGG
 CACCCUCGUCACCGUGAGCAGCGGUCGACGAAGG
 GGCCCAGCGUGUCCCCGCUGGCCCCCAGCAGCAAG
 AGCACCAGCGGCGGGACCGCCGCCCUGGGCUGCCU
 CGUCAAGGACUACUCCCCGAGCCCGUGACCGUGU
 CGUGGAACAGCGGCGCGCUGACGAGCGGGGUCCAC
 ACCUCCCCGGCCGUGCUGCAGAGCAGCGGCCUCUA
 CUCGCUGAGCAGCGUGGUCACCGUGCCCAGCAGCA
 GCCUGGGGACCCAGACGUACAUCUGCAACGUGAAC
 CACAAGCCCUCGAACACCAAGGUCGACAAGAAGGU
 GGAGCCCCCGAAGAGCUGCGACAAGACCCACACCU
 GCGCGCCUGCCCCGCCCCGAGCUCCUGGGCGGG
 CCCAGCGUGUUCUGUCCCCGCCAAGCCCAAGGA
 CACGCUCAUGAUCAGCCGCACCCCCGAGGUCACCU

GCGUGGUGGUCGACGUGAGCCACGAGGACCCCGAG
GUGAAGUUAACUGGUACGUCGACGGCGUGGAGGU
GCACAACGCCAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGU
ACAACUCGACGUACCGCGUCGUGAGCGUGCUGACC
GUCCUGCACCAGGACUGGCUCAACGGCAAGGAGUA
CAAGUGCAAGGUGAGCAACAAGGCCUGCCCCGCGC
CCAUCGAGAAGACCAUCAGCAAGGCCAAGGGGCAG
CCCCGGGAGCCGCAGGUGUACACCCUGCCCCCAG
CCGCGACGAGCUCACGAAGAACCAGGUCAGCCUGA
CCUGCCUGGUGAAGGGCUUCUACCCUCGGACAUC
GCGGUGGAGUGGGAGAGCAACGGGCAGCCGGAGAA
CAACUACAAGACCACCCCGCCCGUCCUCGACAGCG
ACGGCAGCUUCUCCUGUACAGCAAGCUGACGGUG
GACAAGUCGCGGUGGCAGCAGGGCAACGUGUUCAG
CUGCAGCGUCAUGCACGAGGCCCUCCACAACCACU
ACACCCAGAAGAGCCUGAGCCUGAGCCCCGGGAAG
CAUCAUCAUCAUCAUUGAAGCGCUGCCUUCUG
CGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUC
CCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGC
CUGAGUAGGAAGGCGGCCGCUCGAGCAUGCAUCUA
GA (SEQ ID NO: 9)

La secuencia de ácido nucleico para la secuencia de ácido nucleico para la cadena ligera de trastuzumab se muestra en SEQ ID NO: 10:

5

CTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTATAGGGAA
ATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAG
AGCCACCATGGCCGTGATGGCGCCGCGGACCCTGG
TCCTCCTGCTGACCGGCGCCCTCGCCCTGACGCAG
ACCTGGGCGGGGACATCCAGATGACCCAGAGCCC
GTCGAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGGGTCA
CGATCACCTGCCGCGCGAGCCAGGACGTGAACACC
GCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGAAGGC

CCCCAAGCTCCTGATCTACTCGGCGAGCTTCCTGT
ACAGCGGCGTCCCCAGCCGGTTCAGCGGGTCGCGC
AGCGGCACCGACTTCACGCTCACCATCAGCAGCCT
GCAGCCGGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC
AGCACTACACCACGCCCCCACCTTCGGGCAGGGC
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCC
CAGCGTCTTCATCTTCCCGCCCAGCGACGAGCAGC
TGAAGTCGGGCACGGCCAGCGTGGTGTGCCTCCTG
AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCGAAGGTCCAGTG
GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGGAACAGCC
AGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTCGAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGAGCAA
GGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTCTACGCCTGCG
AGGTGACCCACCAGGGGCTCTCGAGCCCCGTGACC
AAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTGAAGCGCTGC
CTTCTGCGGGGCTTGCCCTTCTGGCCATGCCCTTCT
TCTCTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAA
TAAAGCCTGAGTAGGAAGGCGGCCGCTCGAGCATG
CATCTAGA (SEQ ID NO: 10)

La secuencia de ácido nucleico para el ARNm de la cadena ligera de trastuzumab se muestra en SEQ ID NO: 11:

CUCGUACAGAAGCUAAUACGACUCACUAUAGGGAAAUAAGAGAGAAAA
GAAGAGUAAGAAGAAAUUAAGAGCCACCAUGGCCGUGAUGGCGCCGCGGACCC
UGGUCCUCCUGCUGACCGGCGCCUCGCCCUGACGCAGACCUGGGCCGGGGACAU
CCAGAUGACCCAGAGCCCGUCGAGCCUGAGCGCCAGCGUGGGCGACCGGGUCACG
AUCACCUGCCGCGCGAGCCAGGACGUGAACACCGCCGUGGCCUGGUACCAGCAGA
AGCCCCGGAAGGCCCCCAAGCUCCUGAUCUACUCGGCGAGCUUCCUGUACAGCGG
CGUCCCCAGCCGGUUCAGCGGGUCGCGCAGCGGCACCGACUUCACGCUCACCAUC
AGCAGCCUGCAGCCGGAGGACUUCGCCACCUACUACUGCCAGCAGCACUACACCA
CGCCCCCACCUCGCGGAGGGCACCAAGGUGGAGAUCAAGCGGACCGUGGCCGC
CCCCAGCGUCUUAUCUUCGCGCCAGCGACGAGCAGCUGAAGUCGGGCACGGCC
AGCGUGGUGUGCCUCCUGAACAAUCUUCUACCCCCGCGAGGCCGAAGGUCCAGUGGA
AGGUGGACAACGCCUGCAGAGCGGGAACAGCCAGGAGAGCGUGACCGAGCAGGA
CUCGAAGGACAGCACCUACAGCCUCAGCAGCACCCUGACGCUGAGCAAGGCCGAC
UACGAGAAGCACAAGGUCUACGCCUGCGAGGUGACCCACCAGGGGCUUCGAGCC
CCGUGACCAAGAGCUUAACCGGGGCGAGUGCUGAAGCGCUGCCUUCUGCGGGGC
UUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUUCUGGUCUUU
GAAUAAAGCCUGAGUAGGAAGGCGGCCGCUUCGAGCAUGCAUCUAGA (SEQ ID NO:
11)

La secuencia de ácido nucleico para la secuencia de nucleótidos de la proteína CERT tipo silvestre se muestra en SEQ ID NO: 12:

atgtcggata atcagagctg gaactcgtc ggctcggagg aggatccaga gacggagtct
gggccgcctg tggagcgtg cggggctctc agtaagtga caaactacat tcatgggtgg
caggatcgtt gggtagttt gaaaaataat gctctgagtt actacaaatc tgaagatgaa
acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat
tttgatgaat gtcgatttga tattagtgt aatgatagtg ttggatatct tcgtgctcag
gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga
tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggctcaatgg tgtccctggt gtctggagca
agtggctact ctgcaacatc cactcttca ttcaagaaag gccacagtgt acgtgagaag
ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag
tactttgatg cctgtgctga tgtgtctct aaggatgaac ttcaaggga taaagtggta
gaagatgatg aagatgactt tctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc
aacggcaata aagaaaagt attccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggatagac
tttaaagggg aagcgataac tttaaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct
cattgtattg aactaatgt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa
actgagaaga aaagaagaac agagggaagca tataaaatg caatgacaga acttaagaaa
aaatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa
gagtctttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca
cagagtgaag aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgcctttct
tctgtgggga cacatagatt tctccaaaag gttgaagaga tgggtgcagaa ccacatgact
tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa
5 atgaaggat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaagct
acctatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attattctg gaattgtgac
gttcgcaatg actgggaaac aactatagaa aactttcatg tgggtgaaac attagctgat
aatgcaatca tcatttatca aacacacaag aggtgtgtgc ctgcttctca gcgagacgta
ttatatcttt ctgtattcgc aaagatacca gccttgactg aaaatgaccc tgaacttgg
atagtttcta attttctgt ggtatcatgac agtgctctc taaacaaccg atgtgtccgt
gccaaaataa atgttctat gatttgtcaa accttggtta gccaccaga gggaaaccag
gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatatg tagctaatgt gaacctgga
ggatgggcac cagcctcagt gtaaggga gtggcaaac gagagtatcc taaatttcta
aaacgtttta ctcttacgt ccaagaaaa actgcaggaa agcctatttt gtctag
(SEQ ID NO: 12)

La secuencia de proteínas para la proteína CERT tipo silvestre se muestra en SEQ ID NO: 13:

Met Ser Asp Asn Gin Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gin Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
 Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 Leu Arg Ala Gin Asp Pro Asp His Arg Gin Gin Trp Ile Asp Ala Ile
 Glu Gin His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 Arg His Gly Ser Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gin Val Asp
 Thr Leu Gin Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 Glu Leu Gin Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 Trp Gin Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gin Asp Lys Ile
 Glu Glu Gin Ser Gin Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 Gin Lys Val Glu Glu Met Val Gin Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gin
 Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gin Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
 Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
 Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
 Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
 Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
 Ile Tyr Gin Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gin Arg Asp Val
 Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp
 Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
 Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
 Cys Gin Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gin Glu Ile Ser Arg
 (SEQ ID NO: 13)

La secuencia de ácido nucleico para la secuencia de nucleótidos del mutante Cert en Ser132A se muestra como
 SEQ ID NO: 14:

atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct
 gggccgcctg tggagcgtg cggggctctc agtaagtga caaactacat tcatgggtgg
 caggatcgtt gggtagttt gaaaaataat gctctgagtt actacaate tgaagatgaa
 acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat
 ttgatgaat gtogatttga tattagtgt aatgatatgt ttggtatct tctgtctcag
 gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga
 tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggcgcaatgg tctccctggt gtctggagca
 agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag
 ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag
 tactttgatg cctgtgctga tctgtctct aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta
 gaagatgatg aagatgaatt tctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc
 aacggcaata aagaaaagt atttccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggatagac
 tttaaagggg aagcgataac tttaaagca actactgctg gaatcctgc aacactttct
 cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa
 actgagaaga aaagaagaac agagggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa
 aaatcccact ttgaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa
 gagttcttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca
 cagagtgaag aggtgagatt acattggcct acatcctgc cctctggaga tgcctttct
 tctgtgggga cacatagatt tctccaaaag gttgaagaga tggtcagaa ccacatgact
 tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa
 atgaaggat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaagct
 acccatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attattctg gaatgttgac
 gttcgcaatg actgggaaac aactatagaa aactttcatg tggtggaac attagctgat
 aatgcaatca tcattttatc aacacacaag aggggtgtggc ctgcttctca gcgagacgta
 ttatatctt ctgtcattcg aaagatacca gccttgactg aaaatgacct tgaaacttgg
 atagtttga atttttctg ggatcatgac agtgcctc taaacaaccg atgtgtccgt
 gccaaaataa atgttctat gatttctcaa accttggtta gccaccaga gggaaaccag
 gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatag tagctaattg gaaccttga
 ggatgggcac cagcctcagt gtttaaggga gtggcaaagc gagagtatcc taaatttcta
 aaacgtttta cttcttacgt ccaagaaaaa actgcaggaa agcctatttt gttctag (SEQ ID NO: 14)

La secuencia de proteínas del mutante Cert en Ser132A se muestra como SEQ ID NO: 15:

Met Ser Asp Asn Gin Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
 Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
 Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gin Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
 Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
 Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
 Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
 Leu Arg Ala Gin Asp Pro Asp His Arg Gin Gin Trp Ile Asp Ala Ile
 Glu Gin His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
 Arg His Gly Ala Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
 Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
 Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gin Val Asp
 Thr Leu Gin Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 Glu Leu Gin Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 Trp Gin Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gin Asp Lys Ile
 Glu Glu Gin Ser Gin Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 Gin Lys Val Glu Glu Met Val Gin Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gin
 Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gin Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
 Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
 Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
 Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
 Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
 Ile Tyr Gin Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gin Arg Asp Val
 Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp
 Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
 Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
 Cys Gin Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gin Glu Ile Ser Arg
 Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly
 Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr
 Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gin Glu Lys Thr Ala
 Gly Lys Pro Ile Leu Phe (SEQ ID NO: 15)

Detección por ELISA de anticuerpos IgG humanos

La figura 2 y la figura 3 muestran un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para IgG humana de células de ovario de hámster chino (CHO) y de riñón embrionario humano (HEK, negativas para HER-2) 293 transfectadas con ARNmod de IgG humana, respectivamente. Las 293 de riñón embrionario humano (HEK) fueron cultivadas en medio CD 293 con suplemento de L-glutamina de Invitrogen hasta que alcanzaran una confluencia de 80-90 %. Las células CHO se cultivaron en medio CD CHO con suplemento de L-glutamina, hipoxantina y timidina. En la figura 2, 2×10^6 células fueron transfectadas con 24 ug de ARNmod en complejo con RNAiMax de Invitrogen en un matraz de cultivo de 75 cm² de Corning en 7 ml de medio. En la figura 3, se transfectaron 80 000 células con 1 ug de ARNmod en complejo con RNAiMax de Invitrogen en una placa de 24 pocillos. El complejo ARN:RNAiMAX se formó al incubar primero el ARN con medio CD 293 o CD CHO en una dilución volumétrica 5X durante 10 minutos a temperatura ambiente. En un segundo frasco, se incubó reactivo RNAiMAX con medio CD 293 o medio CD CHO en una dilución volumétrica 10X durante 10 minutos a temperatura ambiente. El frasco de ARN se mezcló después con el frasco de RNAiMAX y se incubó durante 20-30 a temperatura ambiente antes de ser añadido a las células por goteo. En la figura 2, la concentración de IgG humana secretada en el medio de cultivo se midió 12, 24, 36 horas después de la transfección. En la figura 3, IgG humana secretada se midió 36 horas después. Los sobrenadantes de cultivo se almacenaron a 4 grados. La secreción de trastuzumab a partir de células 293 de riñón embrionario humano transfectadas se cuantificó usando un kit de ELISA de Abcam siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. Estos datos muestran que un ARNmod de anticuerpo IgG humanizado (trastuzumab) (SEQ ID NO: 6 y 7) es capaz de ser traducido en células de riñón embrionario humano y que trastuzumab es secretado fuera de las células y liberado en el ambiente extracelular. Además, estos datos demuestran que la transfección de células con ARNmod que codifica para trastuzumab para la producción de proteínas secretadas puede aumentarse de escala hasta un biorreactor o condiciones de cultivos de células grandes.

Detección por Western de anticuerpo IgG humano producido por ARNmod

La figura 4 muestra una transferencia de Western de células CHO-K1 co-transfectadas con 1 µg cada una de cadena pesada y ligera de ARNmod de trastuzumab. Para detectar la traducción del producto de proteína, las células se cultivaron usando protocolos estándares en placas de 24 pocillos, y los sobrenadantes celulares o lisados de células se recogieron 24 horas después de la transfección y se separaron en un gel SDS-Page al 12 % y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa usando el iBlot por Invitrogen. Después de la incubación con un anticuerpo policlonal de conejo para IgG humana conjugada con DyLight® 594 (ab96904, abcam, Cambridge, MA) y un anticuerpo policlonal de cabra secundario contra IgG Rb que se conjugó con fosfatasa alcalina, el anticuerpo se detectó usando sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina Novex® por Invitrogen.

Tinción inmunológica celular de trastuzumab y rituximab producidos por ARNmod

La figura 5 muestra células CHO-K1 co-transfectadas con 500 ng cada uno de cadena pesada y ligera de trastuzumab o rituximab. Las células se cultivaron en medio F-12K de Gibco y 10 % de FBS. Las células fueron fijadas con 4 % de paraformaldehído en PBS y permeabilizadas con 0,1 % de Triton X-100 en PBS durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron después 3X con PBS a temperatura ambiente. La tinción de trastuzumab y rituximab se llevó a cabo usando anticuerpo policlonal de conejo contra IgG humana conjugada con DyLight® 594 (ab96904, Abcam, Cambridge, MA) de acuerdo con las diluciones recomendadas por el fabricante. La tinción de ADN nuclear se llevó a cabo con colorante DAPI de Invitrogen. La proteína para trastuzumab y rituximab es traducida y ubicada en el citoplasma después de la transfección de ARNmod. Las imágenes se tomaron 13 horas después de la transfección.

Ensayo de inmunotransferencia de unión para trastuzumab y rituximab producidos por ARNmod

La figura 6 muestra un ensayo de detección de inmunotransferencia de unión para trastuzumab y rituximab. Concentraciones variables del péptido ErbB2 (ab40048, abcam, Cambridge, MA), antígeno para trastuzumab y el péptido CD20 (ab97360, abcam, Cambridge, MA), antígeno para rituximab se llevaron a cabo en concentraciones variables (100 ng/ul a 0 ng/ul) en un gel SDS-Page al 12 % y se transfirieron a una membrana usando el iBlot de Invitrogen. Las membranas fueron incubadas durante 1 hora con sus sobrenadantes de células respectivos a partir de células CHO-K1 co-transfectadas con 500 ng cada uno de cadena pesada y ligera de trastuzumab o rituximab. Las membranas fueron bloqueadas con 1 % de BSA y un anticuerpo anti-IgG humana secundario conjugado con fosfatasa alcalina (abcam, Cambridge, MA). La detección de anticuerpo se llevó a cabo usando el sustrato cromogénico de fosfatasa alcalina Novex® por Invitrogen. Estos datos demuestran que anticuerpos IgG humanizados generados a partir de ARNmod son capaces de reconocer y unirse a sus antígenos respectivos.

Ensayo de proliferación celular

La línea de células SK-BR-3, una línea de células adherentes derivada de un adenocarcinoma de mama humano, que sobreexpresa el receptor HER2/neu puede usarse para comparar las propiedades antiproliferativas de trastuzumab generado por ARNmod. Pueden añadirse concentraciones variables de trastuzumab purificado generado a partir de ARNmod y trastuzumab a cultivos de células, y sus efectos en el crecimiento celular pueden

evaluarse en ensayos de citotoxicidad y viabilidad por triplicado.

Modelo de tumor SKOV-3

- 5 Los efectos antineoplásicos de trastuzumab generado por ARNmod pueden determinarse mediante inyecciones consecutivas de 1) trastuzumab de ARNmod, 2) trastuzumab y 3) trastuzumab de ARNmod + GCSF de ARNmod durante un periodo de 28 días en ratones de xenoinjerto SKOV-3. La reducción en el tamaño de crecimiento del tumor puede supervisarse con el tiempo.

10 Ejemplo 4: Sobreexpresión de proteína de transferencia de ceramida para incrementar la producción de proteínas de anticuerpos terapéuticos en líneas de células CHO establecidas

a) Cultivo discontinuo

- 15 Una línea de células CHO productora de anticuerpos (CHO DG44) que secreta un anticuerpo IgG terapéutico humanizado se transfecta una sola vez con agente de suministro catiónico lipídico solo (control) o un transcrito de ARNm sintético que codifica proteína de transferencia de ceramida tipo silvestre (CERT) o un mutante de CERT Ser132A competente de no fosforilación. CERT es una proteína citosólica esencial en células de mamífero que transfiere la ceramida de esfingolípidos del retículo endoplásmico al complejo de Golgi en donde se convierte en esfingomielinina (Hanada *et al.*, 2003). La sobreexpresión de CERT incrementa significativamente el transporte de proteínas secretadas a la membrana de plasma y mejora la producción de proteínas que son transportadas por medio de la vía secretora de células eucarióticas incrementando de esta manera la secreción de proteínas en el medio de cultivo. Se premezclan transcritos de ARNm sintéticos con un agente de suministro catiónico de lípidos a una relación de portador: ARN de 2-5:1. La densidad de siembra inicial es aproximadamente 2×10^5 células viables/ml. El transcrito de ARNm sintético se suministra después de la siembra de cultivo inicial durante la fase de cultivo de crecimiento exponencial para lograr un primer número de copias de ARNm sintético entre 10×10^2 y 10×10^3 por célula. El medio de cultivo de células basales usado para todas las fases de generación de inóculo celular y para crecimiento de cultivos en biorreactores es medio CD-CHO modificado que contiene glutamina, bicarbonato de sodio, insulina y metotrexato. El pH del medio se ajusta a 7,0 con HCl 1 N o NaOH 1 N después de la adición de todos los componentes. Los tiempos de ejecución de cultivo concluye en los días 7, 14, 21 o 28+. Pueden usarse reactores a escala de 50 l de nivel de producción (reactor de acero inoxidable con dos impulsores marinos) y son escalables a reactores de acero inoxidable de $>10\,000$ l (descritos en la solicitud de patente de asignación común n.º de serie de EE. UU. 60/436 050, presentada el 23 de diciembre de 2002, y n.º de serie de EE. UU. 10/740 645). Un sistema de adquisición de datos (Intellution Fix 32) registra temperatura, pH y el oxígeno disuelto (OD) a lo largo de los ciclos. Los flujos de gas se controlan por medio de rotámetros. Se burbujea aire en el reactor por medio de una frita sumergida (tamaño de poro de 5 μm) y a través del espacio superior del reactor para eliminación de CO_2 . Se burbujea oxígeno molecular a través de la misma frita para el control de OD. Se burbujea CO_2 a través de la misma frita según se usa para control de pH. Se eliminan muestras de células del reactor diariamente. Una muestra usada para el recuento de células se tiñe con azul tripano (Sigma, St. Louis, Mo). El recuento celular y determinación de viabilidad celular se llevan a cabo por medio de hemocitometría usando un microscopio. Para el análisis de metabolitos, se centrifugan muestras adicionales durante 20 minutos a 2000 rpm (4 °C) para separación celular. El sobrenadante se analiza para los siguientes parámetros: título, ácido siálico, glucosa, lactato, glutamina, glutamato, pH, pO_2 , pCO_2 , amoníaco y, opcionalmente, lactato deshidrogenasa (LDH). Muestras de respaldo adicionales se congelan a -20 °C. Para medir los títulos de anticuerpo IgG humanizados secretados, se toma sobrenadante de cultivos de abastecimiento de siembra de todos los fondos de células estables, el título de IgG se determina por ELISA y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica. Los valores más altos son los fondos de células con el mutante Ser132A CERT (SEQ ID NO: 14), seguido por CERT tipo silvestre (SEQ ID NO: 12). En ambos, la expresión de IgG es notablemente mayor en comparación con células de vehículo solo o no transfectadas.

b) Cultivo continuo o semicontinuo

- Una línea de células CHO productora de anticuerpos (CHO DG44) que secreta anticuerpo IgG humanizado se transfecta con agente de suministro catiónico lipídico solo (control) o un transcrito de ARNm sintético que codifica proteína de transferencia de ceramida tipo silvestre o un mutante Ser132A CERT no competente para fosforilación. Los transcritos de ARNm sintéticos son pre-mezclados con un agente de suministro catiónico lipídico a una relación de portador:ARN de 2-5:1. La densidad de siembra inicial fue aproximadamente 2×10^5 células viables/ml. Se suministra transcrito de ARNm sintético después de siembra de cultivo inicial durante la fase de crecimiento de cultivo exponencial para lograr un número de copias de ARNm sintético final de entre 10×10^2 y 10×10^3 por célula. El medio de cultivo de células basales usado para todas las fases de generación de inóculos celulares y para crecimiento de cultivos en biorreactores fue medio CD-CHO modificado que contenía glutamina, bicarbonato de sodio, insulina y metotrexato. El pH del medio se ajusta a 7,0 con HCl 1 N o NaOH 1 N después de la adición de todos los componentes. Los biorreactores de escala de 5 l (reactor de vidrio con un impulsor marino) se usa para obtener producción de proteína CERT máxima y curvas de anticuerpo IgG humanizado secretado. Para cultivos continuos o discontinuos, el tiempo de ejecución de cultivo se incrementa al complementar el medio de cultivo una o más veces al día (o continuamente) con medio nuevo durante la ejecución. En los regímenes de alimentación

continua y discontinua, los cultivos reciben medio de alimentación como una infusión suministrada continuamente, u otra adición automática al cultivo, de una manera sincronizada, regulada y/o programada para lograr así y mantener la cantidad adecuada de ARNm sintético:portador en el cultivo. El método típico es un régimen de alimentación de una vez al día de alimentación de embolada con medio de alimentación que contiene ARNm sintético:portador en cada día del ciclo de cultivo, a partir del inicio del ciclo de cultivo hasta el día de cosechar las células. La cantidad de alimentación diaria se registra en hojas de lotes. Se usaron reactores de escala de 50 l a nivel de producción (reactor de acero inoxidable con dos propulsores marinos) y se pueden cambiar de escala a reactores de acero inoxidable de >10 000 l. Un sistema de adquisición de datos (Intellution Fix 32) registra la temperatura, pH y oxígeno disuelto (DO) a lo largo de los ciclos. Los flujos de gas se controlan por medio de rotámetros. Se burbujea aire en el reactor por medio de una fritta sumergida (tamaño de poro de 5 µm) y a través del espacio superior del reactor para eliminación de CO₂. Se burbujeó oxígeno molecular a través de la misma fritta para control de DO. Se burbujea CO₂ a través de la misma fritta según se usa para control de pH. Las muestras de células se eliminan del reactor diariamente. Una muestra usada para el recuento celular se tiñe típicamente con azul tripano (Sigma, St. Louis, Mo.). Se llevan a cabo recuento celular y determinación de la viabilidad celular mediante hemocitometría usando un microscopio. Para análisis de metabolitos, se centrifugan muestras adicionales durante 20 minutos a 2000 rpm (4 °C) para separación de células. El sobrenadante se analiza para los siguientes parámetros: título, ácido siálico, glucosa, lactato, glutamina, glutamato, pH, pO₂, pCO₂, amoníaco y, opcionalmente, lactato deshidrogenasa (LDH). Se congelan muestras de respaldo adicionales a -20 °C. Para medir títulos de anticuerpo IgG humanizados secretados, se toma sobrenadante de cultivos de abastecimiento de siembra de todos los fondos de células estables, el título de IgG se determina por ELISA y se divide entre el número medio de células para calcular la productividad específica. Los valores más altos son los fondos de células con el mutante Ser132A CERT (SEQ ID NO: 14), seguido por CERT de tipo silvestre (SEQ ID NO: 10 o 12). En ambos, la expresión de IgG es marcadamente mayor en comparación con vehículo solo o células no transfectadas.

Equivalentes y alcance

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de evaluar usando nada más que experimentación de rutina, muchos equivalentes de las modalidades específicas, descritas en la presente. No se pretende que el alcance de la presente invención esté limitado a la descripción anterior, sino más bien que sea como se muestra en las reivindicaciones anexas.

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán evaluar usando nada más que experimentación de rutina, muchos equivalentes de las modalidades específicas de acuerdo con la invención descrita en la presente. No se pretende que el alcance de la presente invención esté limitado a la descripción anterior, sino que más bien sea como el mostrado en las reivindicaciones anexas.

En las reivindicaciones los artículos tales como "uno", "una", "el" y "la" pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o sea de otra manera evidente por el contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyan "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en, o de otra manera son relevantes para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otra forma en el contexto. La divulgación incluye casos en los cuales exactamente un miembro del grupo está presente en, empleado en, o es de otra manera relevante para un producto o proceso dado. La divulgación incluye casos en los cuales más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en o de otra manera son relevantes para un producto o proceso dado. Además, se debe entender que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las cuales una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones listadas se introduzcan a otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que dependa de otra reivindicación puede modificarse para incluir una o más limitaciones encontradas en cualquier otra reivindicación que dependa de la misma reivindicación base. Además, cuando las reivindicaciones describan una composición, se debe entender que se incluyen métodos para usar la composición para cualquiera de los propósitos descritos aquí, y que se incluyen métodos para hacer la composición de acuerdo con cualquiera de los métodos para elaboración descritos en la presente u otros métodos conocidos en la técnica, a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto en la técnica de que se originaría una contradicción o inconsistencia.

Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupos de Markush, se debe entender que cada subgrupo de los elementos también se describe, y que cualquier elemento puede retirarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se haga referencia a que la divulgación, o aspectos de la divulgación, comprenden elementos, características particulares, etc., ciertos casos de la divulgación o aspectos de la divulgación consisten, o consisten esencialmente en, estos elementos, características, etc. Para efectos de simplicidad los casos no se han mostrado específicamente de manera extensa en la presente. Debe notarse que se pretende que la expresión "que comprende" sea abierta y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales.

Cuando se dan intervalos, se incluyen los puntos finales. Más aún, se debe entender que a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otra forma por el contexto y entendimiento de un experto en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor o subintervalo específico dentro de los intervalos

indicados en diferentes casos de la divulgación, hasta la décima de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto claramente dicte lo contrario.

Otras modalidades están en las reivindicaciones.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MODERNATX, INC.

10 <120> ÁCIDOS NUCLEICOS MANIPULADOS Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> P47882EP-D3-PCT

<140> Aún no asignada

15 <141> 03-10-2011

<150> US 61/404 413

<151> 01-10-2010

20 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

25 <211> 852

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

30 agcttttgga ccctcgtaca gaagctaata cgactcacta tagggaaata agagagaaaa 60
gaagagtaag aagaaatata agagccacca tggcgggtcc cgcgacccaa agcccatga 120
aacttatggc cctgcagttg ctgctttggc actcggccct ctggacagtc caagaagcga 180
ctcctctcgg acctgcctca tcgttgccgc agtcattcct tttgaagtgt ctggagcagg 240
tgcgaaagat tcagggcgat ggagccgcac tccaagagaa gctctgcgcg acatacaaac 300
tttgccatcc cgaggagctc gtactgctcg ggcacagctt ggggattccc tgggctcctc 360
tctcgtcctg tccgtcgcag gctttgcagt tggcagggtg cctttcccag ctccactccg 420
gtttgttctt gtatcagggg ctgctgcaag cccttgaggg aatctcgcca gaattgggcc 480
cgacgctgga cacgttgca ctcgacgtgg cggatttcgc aacaaccatc tggcagcaga 540
tggaggaact ggggatggca cccgcgctgc agcccacgca gggggcaatg ccggcctttg 600
cgtccgcgtt tcagcgcag ggggtggag tcctcgtagc gagccacctt caatcatttt 660
tggaagtctc gtaccgggtg ctgagacatc ttgcgcagcc gtgaagcgct gccttctgcg 720
gggcttgccct tctggccatg cccttcttct ctcccttgca cctgtacctc ttggtctttg 780
aataaagcct gagtaggaag gggccgctc gagcatgcat ctagagggcc caattcgccc 840
tattcgaagt cg 852

<210> 2

<211> 852

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

40 agcuuuugga ccucguaca gaagcuaaua cgacucacua uagggaaaua agagagaaaa 60

gaagaguaag aagaaauaia agagccacca uggccggucc cgcgacccaa agccccauga 120
aacuuauaggc ccugcaguug cugcuuuggc acucggcccu cuggacaguc caagaagcga 180
cuccucucgg accugccuca ucguugccgc agucauuccu uuugaagugu cuggagcagg 240
ugcgaagau ucagggcgau ggagccgcac uccaagagaa gcucugcgcg acauacaaac 300
uuugccaucc cgaggagcuc guacugcucg ggcacagcuu ggggauuccc ugggcuccuc 360
ucucgucucg uccgucgcag gcuuugcagu uggcagggug ccuuucccag cuccacucg 420
guuuguucuu guaucaggga cugcugcaag ccuugaggg aaucucgcca gaauugggcc 480
cgacgcugga cacguugcag cugcagcugg cggaauucgc aacaaccauc uggcagcaga 540
uggaggaacu ggggauggca cccgcgcucg agcccacgca gggggcaaug ccggccuuug 600
cguccgcguu ucagcgcagg ggggugggag uccucguagc gagccaccuu caucauuuu 660
uggaagucuc guaccgggug cugagacauc uugcgcagcc gugaagcgcg gccuucugcg 720
gggcuugccu ucugggccaug ccuucuuucu cucccuugca ccuguaccuc uuggucuuug 780
aauaaagccu gaguaggaag gggccgcuc gagcaugcau cuagagggcc caauucgccc 840
uauucgaagu cg 852

<210> 3

<211> 852

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

10

<220>

<221> base_modificada

<222> (3)..(3)

<223> 5-metil-citidina

15

<220>

<221> base_modificada

<222> (4)..(7)

<223> Pseudouridina

20

<220>

<221> base_modificada

<222> (11)..(13)

<223> 5-metil-citidina

25

<220>

<221> base_modificada

<222> (14)..(14)

<223> Pseudouridina

30

<220>

<221> base_modificada

<222> (15)..(15)

<223> 5-metil-citidina

35

<220>

<221> base_modificada

<222> (17)..(17)

<223> Pseudouridina

40

<220>

<221> base_modificada

	<222> (19)..(19)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
5	<221> base_modificada
	<222> (25)..(25)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
10	<221> base_modificada
	<222> (26)..(26)
	<223> Pseduouridine
	<220>
15	<221> base_modificada
	<222> (29)..(29)
	<223> Pseduouridine
	<220>
20	<221> base_modificada
	<222> (31)..(31)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
25	<221> base_modificada
	<222> (34)..(34)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
30	<221> base_modificada
	<222> (35)..(35)
	<223> Pseudouridina
	<220>
35	<221> base_modificada
	<222> (36)..(36)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
40	<221> base_modificada
	<222> (38)..(38)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
45	<221> base_modificada
	<222> (39)..(39)
	<223> Pseudouridina
	<220>
50	<221> base_modificada
	<222> (41)..(41)
	<223> Pseudouridina
	<220>
55	<221> base_modificada
	<222> (49)..(49)
	<223> Pseudouridina
	<220>
60	<221> base_modificada
	<222> (67)..(67)
	<223> Pseudouridina
	<220>
65	<221> base_modificada
	<222> (77)..(77)

	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
5	<222> (79)..(79)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
10	<222> (85)..(86)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
15	<222> (88)..(89)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
20	<222> (91)..(91)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
25	<222> (94)..(95)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
30	<222> (98)..(98)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
35	<222> (99)..(101)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
40	<222> (103)..(103)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
45	<222> (106)..(108)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
50	<222> (113)..(116)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
55	<222> (118)..(118)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
60	<222> (123)..(123)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
65	<222> (124)..(125)
	<223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (127)..(127)
 5 <223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (130)..(132)
 10 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (133)..(133)
 15 <223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (135)..(135)
 20 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (138)..(139)
 25 <223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (141)..(141)
 30 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (144)..(144)
 35 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (145)..(147)
 40 <223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (150)..(150)
 45 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (152)..(152)
 50 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (153)..(153)
 55 <223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (154)..(154)
 60 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (157)..(159)
 65 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (160)..(160)
 <223> Pseudouridina
 5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (161)..(161)
 <223> 5-metil-citidina
 10
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (162)..(162)
 <223> Pseudouridina
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (166)..(166)
 <223> 5-metil-citidina
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (169)..(169)
 <223> Pseudouridina
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (170)..(171)
 <223> 5-metil-citidina
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (178)..(178)
 <223> 5-metil-citidina
 35
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (181)..(181)
 <223> 5-metil-citidina
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (182)..(182)
 <223> Pseudouridina
 45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (183)..(184)
 <223> 5-metil-citidina
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (185)..(185)
 <223> Pseudouridina
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (186)..(186)
 <223> 5-metil-citidina
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (187)..(187)
 <223> Pseudouridina
 65
 <220>

	<221> base_modificada
	<222> (188)..(188)
	<223> 5-metil-citidina
5	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (192)..(193)
	<223> 5-metil-citidina
10	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (194)..(194)
	<223> Pseudouridina
15	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (196)..(197)
	<223> 5-metil-citidina
20	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (198)..(198)
	<223> Pseudouridina
25	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (199)..(199)
	<223> 5-metil-citidina
30	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (201)..(201)
	<223> Pseudouridina
35	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (202)..(202)
	<223> 5-metil-citidina
40	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (204)..(205)
	<223> Pseudouridina
45	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (207)..(208)
	<223> 5-metil-citidina
50	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (210)..(210)
	<223> 5-metil-citidina
55	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (213)..(213)
	<223> Pseudouridina
60	<220>
	<221> base_modificada
	<222> (214)..(214)
	<223> 5-metil-citidina
65	<220>
	<221> base_modificada

<222> (216)..(217)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (218)..(219)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (220)..(223)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (228)..(228)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (230)..(230)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 25 <221> base_modificada
 <222> (231)..(231)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (232)..(232)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 35 <221> base_modificada
 <222> (237)..(237)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (241)..(241)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 45 <221> base_modificada
 <222> (243)..(243)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (250)..(250)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 55 <221> base_modificada
 <222> (252)..(252)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 60 <221> base_modificada
 <222> (257)..(257)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 65 <221> base_modificada
 <222> (260)..(260)

<223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (265)..(266)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (268)..(268)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (270)..(270)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (271)..(271)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (272)..(273)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 30 <222> (282)..(282)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (283)..(283)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 40 <222> (284)..(284)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (285)..(285)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 50 <222> (287)..(287)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (289)..(289)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 60 <222> (292)..(292)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 65 <222> (294)..(294)
 <223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (296)..(296)
 5 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (300)..(300)
 10 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (301)..(303)
 15 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (305)..(306)
 20 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (308)..(308)
 25 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (309)..(311)
 30 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (318)..(318)
 35 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (319)..(319)
 40 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (320)..(320)
 45 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (322)..(322)
 50 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (325)..(325)
 55 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (327)..(327)
 60 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (328)..(328)
 65 <223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (329)..(329)
 <223> 5-metil-citidina
 5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (333)..(333)
 <223> 5-metil-citidina
 10
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (335)..(335)
 <223> 5-metil-citidina
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (338)..(338)
 <223> 5-metil-citidina
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (339)..(340)
 <223> Pseudouridina
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (346)..(347)
 <223> Pseudouridina
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (348)..(350)
 <223> 5-metil-citidina
 35
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (351)..(351)
 <223> Pseudouridina
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (355)..(355)
 <223> 5-metil-citidina
 45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (356)..(356)
 <223> Pseudouridina
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (357)..(358)
 <223> 5-metil-citidina
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (359)..(359)
 <223> Pseudouridina
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (360)..(360)
 <223> 5-metil-citidina
 65
 <220>

<221> base_modificada
 <222> (361)..(361)
 <223> Pseudouridina

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (362)..(362)
 <223> 5-metil-citidina

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (363)..(363)
 <223> Pseudouridina

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (364)..(364)
 <223> 5-metil-citidina

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (366)..(366)
 <223> Pseudouridina

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (367)..(368)
 <223> 5-metil-citidina

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (369)..(369)
 <223> Pseudouridina

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (371)..(371)
 <223> Pseudouridina

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (372)..(373)
 <223> 5-metil-citidina

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (375)..(375)
 <223> Pseudouridina

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (376)..(376)
 <223> 5-metil-citidina

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (378)..(378)
 <223> 5-metil-citidina

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (382)..(382)
 <223> 5-metil-citidina

65 <220>
 <221> base_modificada

<222> (383)..(385)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (387)..(387)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (390)..(391)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (394)..(394)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (399)..(399)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 25 <221> base_modificada
 <222> (403)..(405)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (406)..(408)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 35 <221> base_modificada
 <222> (411)..(411)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (412)..(412)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 45 <221> base_modificada
 <222> (413)..(414)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (416)..(416)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 55 <221> base_modificada
 <222> (417)..(417)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 60 <221> base_modificada
 <222> (418)..(419)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 65 <221> base_modificada
 <222> (422)..(424)

	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
5	<222> (426)..(427)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
10	<222> (428)..(428)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
15	<222> (429)..(430)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
20	<222> (432)..(432)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
25	<222> (434)..(434)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
30	<222> (435)..(435)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
35	<222> (441)..(441)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
40	<222> (442)..(442)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
45	<222> (444)..(444)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
50	<222> (445)..(445)
	<223> Pseudouridina
	<220>
	<221> base_modificada
55	<222> (447)..(447)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
60	<222> (451)..(453)
	<223> 5-metil-citidina
	<220>
	<221> base_modificada
65	<222> (454)..(455)
	<223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (463)..(463)
 5 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (464)..(464)
 10 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (465)..(465)
 15 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (466)..(466)
 20 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (468)..(469)
 25 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (474)..(475)
 30 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (479)..(481)
 35 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (484)..(484)
 40 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (486)..(486)
 45 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (487)..(487)
 50 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (491)..(491)
 55 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (493)..(493)
 60 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (495)..(496)
 65 <223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (498)..(498)
 <223> 5-metil-citidina
 5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (501)..(501)
 <223> 5-metil-citidina
 10
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (502)..(502)
 <223> Pseudouridina
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (503)..(503)
 <223> 5-metil-citidina
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (506)..(506)
 <223> 5-metil-citidina
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (508)..(508)
 <223> Pseudouridina
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (511)..(511)
 <223> 5-metil-citidina
 35
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (515)..(517)
 <223> Pseudouridina
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (518)..(518)
 <223> 5-metil-citidina
 45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (520)..(520)
 <223> 5-metil-citidina
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (523)..(523)
 <223> 5-metil-citidina
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (526)..(527)
 <223> 5-metil-citidina
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (529)..(529)
 <223> Pseudouridina
 65
 <220>

<221> base_modificada
 <222> (530)..(530)
 <223> 5-metil-citidina

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (531)..(531)
 <223> Pseudouridina

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (534)..(534)
 <223> 5-metil-citidina

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (537)..(537)
 <223> 5-metil-citidina

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (541)..(541)
 <223> Pseudouridina

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (549)..(549)
 <223> 5-metil-citidina

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (550)..(550)
 <223> Pseudouridina

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (556)..(556)
 <223> Pseudouridina

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (559)..(559)
 <223> 5-metil-citidina

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (561)..(563)
 <223> 5-metil-citidina

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (565)..(565)
 <223> 5-metil-citidina

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (567)..(567)
 <223> 5-metil-citidina

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (568)..(568)
 <223> Pseudouridina

65 <220>
 <221> base_modificada

<222> (570)..(570)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (573)..(575)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (577)..(577)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (579)..(579)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (586)..(586)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 25 <221> base_modificada
 <222> (589)..(589)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (591)..(592)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 35 <221> base_modificada
 <222> (595)..(596)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (597)..(599)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 45 <221> base_modificada
 <222> (601)..(601)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (603)..(603)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 55 <221> base_modificada
 <222> (604)..(604)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 60 <221> base_modificada
 <222> (607)..(607)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 65 <221> base_modificada
 <222> (609)..(611)

<223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (612)..(612)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (615)..(615)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (617)..(617)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (622)..(622)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (626)..(626)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 30 <222> (631)..(631)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (632)..(633)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 40 <222> (634)..(634)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (635)..(635)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 50 <222> (637)..(637)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (640)..(640)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 60 <222> (644)..(645)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 65 <222> (647)..(648)
 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (649)..(650)
 5 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (651)..(651)
 10 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (654)..(654)
 15 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (655)..(655)
 20 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (657)..(661)
 25 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (667)..(667)
 30 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (668)..(668)
 35 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (669)..(669)
 40 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (670)..(670)
 45 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (672)..(672)
 50 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (674)..(675)
 55 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (679)..(679)
 60 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (681)..(681)
 65 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (682)..(682)
 <223> Pseudouridina
 5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (687)..(687)
 <223> 5-metil-citidina
 10
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (689)..(689)
 <223> Pseudouridina
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (690)..(690)
 <223> 5-metil-citidina
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (691)..(692)
 <223> Pseudouridina
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (694)..(694)
 <223> 5-metil-citidina
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (696)..(696)
 <223> 5-metil-citidina
 35
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (699)..(700)
 <223> 5-metil-citidina
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (702)..(702)
 <223> Pseudouridina
 45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (707)..(707)
 <223> 5-metil-citidina
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (709)..(709)
 <223> 5-metil-citidina
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (710)..(710)
 <223> Pseudouridina
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (712)..(713)
 <223> 5-metil-citidina
 65
 <220>

<221> base_modificada
 <222> (714)..(715)
 <223> Pseudouridina

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (716)..(716)
 <223> 5-metil-citidina

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (717)..(717)
 <223> Pseudouridina

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (719)..(719)
 <223> 5-metil-citidina

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (724)..(724)
 <223> 5-metil-citidina

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (725)..(726)
 <223> Pseudouridina

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (728)..(729)
 <223> 5-metil-citidina

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (730)..(731)
 <223> Pseudouridina

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (732)..(732)
 <223> 5-metil-citidina

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (733)..(733)
 <223> Pseudouridina

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (736)..(737)
 <223> 5-metil-citidina

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (739)..(739)
 <223> Pseudouridina

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (741)..(743)
 <223> 5-metil-citidina

65 <220>
 <221> base_modificada

<222> (744)..(745)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (746)..(746)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (747)..(748)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (749)..(749)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (750)..(750)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 25 <221> base_modificada
 <222> (751)..(751)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (752)..(752)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 35 <221> base_modificada
 <222> (753)..(755)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (756)..(757)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 45 <221> base_modificada
 <222> (759)..(759)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 50 <221> base_modificada
 <222> (761).. (762)
 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 55 <221> base_modificada
 <222> (763)..(763)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 60 <221> base_modificada
 <222> (765)..(765)
 <223> Pseudouridina

 <220>
 65 <221> base_modificada
 <222> (767)..(768)

<223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (769)..(769)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (770)..(770)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (771)..(772)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (775)..(775)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (776)..(776)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 30 <222> (777)..(779)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (783)..(783)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 40 <222> (788)..(789)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (790)..(790)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 50 <222> (794)..(794)
 <223> Pseudouridina
 <220>
 <221> base_modificada
 55 <222> (802)..(802)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 60 <222> (805)..(806)
 <223> 5-metil-citidina
 <220>
 <221> base_modificada
 65 <222> (808)..(808)
 <223> 5-metil-citidina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (809)..(809)
 5 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (810)..(810)
 10 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (814)..(814)
 15 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (816)..(816)
 20 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (818)..(818)
 25 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (820)..(820)
 30 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (821)..(821)
 35 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (822)..(822)
 40 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (829)..(831)
 45 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (834)..(835)
 50 <223> Pseudouridina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (836)..(836)
 55 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (838)..(840)
 60 <223> 5-metil-citidina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (841)..(841)
 65 <223> Pseudouridina

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (843)..(844)
 <223> Pseudouridina
 5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (845)..(845)
 <223> 5-metil-citidina
 10
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (850)..(850)
 <223> Pseudouridina
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (851)..(851)
 <223> 5-metil-citidina
 20
 <400> 3
 agcuuuugga cccucguaca gaagcuaaia cgacucacua uagggaaia agagagaaa 60
 gaagaguag aagaaia agagccacca uggccggucc cgcgaccaa agcccauga 120
 aacuauggc ccugcaguug cugcuuuggc acucggcccu cuggacaguc caagaagcga 180
 cuccucucgg accugccuca ucguugccgc agucauuccu uuugaagugu cuggagcagg 240
 ugcgaaagau ucagggcgau ggagccgcac uccaagagaa gcucugcgcg acauacaaac 300
 uuugccaucc cgaggagcuc guacugcucg ggcacagcuu ggggauuccc ugggcuccuc 360
 ucucguccug uccgucgcag gcuuugcagu uggcagggug ccuuucccag cuccacuccg 420
 guuuguucuu guaucaggga cugcugcaag ccuugaggg aaucucgcca gaauugggcc 480
 cgacgcugga cagguugcag cugcagcugg cggauuucgc aacaaccauc uggcagcaga 540
 uggaggaacu ggggauggca cccgcgcugc agcccacgca gggggcaaug ccggccuuug 600
 cguccgcguu ucagcgcgag ggggugggag uccucguagc gagccaccuu caaucauuu 660
 uggaagucuc guaccgggug cugagacauc uugcgcagcc gugaagcgcu gccuucugcg 720
 gggcuugccu ucuggccaug ccuucuuuc cucccuugca ccuguaccuc uggguuuug 780
 aauaaagccu gaguaggaag gggccgcuc gagcaugcau cuagagggcc caaucgccc 840
 uauucgaagu cg 852
 <210> 4
 <211> 1635
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético
 30
 <400> 4

ES 2 862 955 T3

```

ctcgtacaga agctaatacg actcactata gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa      60
gaaatataag agccaccatg gccgtgatgg cgcgaggac cctggtgctc ttgctcacgg      120
gtgccttggc cctcacgcaa acatgggcgg gacaggcgta cttgcagcag tcaggggcag      180
aactcgtaag gcccgagcg tcgggtgaaga tgtcgtgtaa agcgtcgggc tatactttca      240
catcgtacaa catgcactgg gtcaaacaga cgcctcgaca agggctggag tggattggag      300
ctatctaccc cgtaacggg gatacgtcgt acaaccagaa gtttaagggg aaggcgactc      360
ttactgtcga caagtgcgc tccaccgcct atatgcagct gtcgagcctg acttcggaag      420
attcagcggg tacttttgt gcgcgcgtgg tctattactc aaattcgtat tggattttcg      480
atgtgtgggg tacggggacc actgtgaccg tgtcaggacc ctcggtattc cccctcgcgc      540
ctagctcaaa gtccacctcc gggggaacag ccgccttggg ttgcttggtg aaggactatt      600
tccccgagcc cgtcacagtg agctggaact ccggggcact gacatcggga gtgcacacgt      660
ttcccgcggt acttcagtca tcaggactct actcgtctgc aagcgtggtc acggtgcctt      720
catcctccct tggaacgcag acttacatct gcaacgtgaa tcataagcct agcaatacca      780
aggtcgacaa gaaagccgaa cccaaatcat gtgataaac acacacgtgt cctccctgcc      840
ccgcaccgga gcttctcggg ggaccgagcg tgttcttgtt tccacctaa gcgaaagata      900
cgcttatgat ctcccgacc cccgaagtaa cttgcgtagt agtagacgta agccacgagg      960
accccgaggt gaaattcaat tggtagctcg acggagtgga ggtccataat gcgaaaacaa     1020
agccgagaga ggaacagtag aattccacat accgcgtcgt aagcgtcttg acagtattgc     1080
atcaggattg gctgaacgga aaggaataga agtgcaaagt atcaaacaaa gcacttccgg     1140
caccgattga aaagacgagc tcaaaagcaa aagggcaacc tcgggagcca caagtctata     1200
ctctcccgcc gtcgcgcgat gaattgacca aaaaccagggt gtcccttaca tgtctcgtaa     1260
aggggtttta cccgtcagac atcgccgtcg agtgggagtc aaacggtcag ccggagaata     1320
actataagac gacccacca gtcttgaca gcgatggctc cttcttcttg tattcaaagc     1380
tgacggtgga caaatcgaga tggcagcagg gtaatgtgtt ttcgtgcagc gtcatgcacg     1440
aggcgcttca taatcattac actcaaaagt ccctgtcgct gtcgcccgga aagcaccatc     1500
accaccacca ttgaagcgtc gccttctgcg gggcttgccct tctggccatg cccttctctc     1560
ctcccttgca cctgtacctc ttgggtctttg aataaagcct gagtaggaag gcggccgctc     1620
gagcatgcat ctaga                                             1635

```

5 <210> 5
 <211> 1635
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético
 <400> 5

ES 2 862 955 T3

cucguacaga agcuaauacg acucacuaua gggaaaauag agagaaaaga agaguaagaa 60
gaaaauuaag agccaccaug gccgugaugg cgccgaggac ccuggugcuc uugcucacgg 120
gugccuuggc ccucacgcaa acaugggagg gacaggcgua cuugcagcag ucaggggag 180
aacucguaag gcccgaggcg ucgguagaag ugucguguaa agcgucgggc uauacuuuca 240
caucguacaa caugcacugg gucaaacaga cggcccgaca agggcuggag uggauuggag 300
cuaucuaacc cguaacggg gauacgucgu acaaccagaa guuuagggg aaggcgacuc 360
uuacugucga caagucgucc uccaccgccu auaugcagcu gucgagccug acuucggaag 420
auucagcggg guacuuuugu gcgcgcgugg ucuauuacuc aaauucguau ugguauuucg 480
augugugggg uacggggacc acugugaccg ugucaggacc cucgguauuc cccucgcgc 540
cuagcuaaa guccaccucc gggggaacag ccgccuuggg uugcuuggua aaggacuauu 600
uccccgagcc cgucacagug agcuggaacu ccggggcacu gacaucggga gugcacacgu 660
uucccgcggu acuuacaguc ucaggacucu acucgcuguc aagcgugguc acggugccuu 720
cauccucccu uggaacgcag acuuacauu gcaacgugaa ucauaagccu agcaauacca 780
aggucgacaa gaaagccgaa cccaaaucau gugauaaaac acacacgugu ccuccugcc 840
ccgcaccgga gcuucucggg ggaccgagcg uguucuuugu uccaccuaag ccgaaagaua 900
cgcuuaugau cucccgagcc cccgaagua cuugcguagu aguagacgua agccacgagg 960
accccgaagu gaaaaucaau ugguacgucg acggagugga gguccauaa gcgaaaacaa 1020
agccgagaga ggaacaguac aaauccacau accgcgucgu aagcgucuuu acaguauugc 1080
aucaggauug gcugaacgga aaggaauaca agugcaaagu aucaaaacaa gcacuuccgg 1140
caccgauuga aaagcgauu ucaaaagcaa aagggcaacc ucgggagcca caagcuaua 1200
cucucccgcc gucgcgcgau gaauugacca aaaaccaggu gucccuuaca ugucucguaa 1260
aggguuuuua cccgucagac aucgccgucg agugggaguc aaacggucag ccggagaaua 1320
acuuaagac gacccacca gucuuggaca gcgauggcuc cuucuuuug uauucaagc 1380
ugacggugga caaaucgaga uggcagcagg guaauguguu uucgugcagc gucaugcacg 1440
agggcguuca uaaucuuac acuaaaaagu ccugucgcu gucgcccga aagcaccuac 1500
accaccacca uugaagcgcu gccuucugcg gggcuugccu ucuggccaug cccuucuuu 1560
cucccuugca ccuguaccuc uuggucuuug auaaaagccu gaguaggaag gcggccgcuc 1620
gagcaugcau cuaga 1635

5 <210> 6
<211> 909
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético
<400> 6

ES 2 862 955 T3

ctcgtacaga agctaatacg actcactata gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa	60
gaaatataag agccaccatg gctgtcatgg ccccgagaac acttgtgctg ttgttgacag	120
gagcgctcgc actcacacag acttgggccg gtcagattgt gctcagccag tcgccagcga	180
tccttttcggc ctcccctggt gagaaagtaa cgatgacgtg ccgagcctcc tcaagcgtgt	240
catacatgca ttggtatcag cagaagcctg ggtcgtcgcc caagccctgg atctacgcc	300
cgtccaatct tgcgtcaggg gtcccggcac ggttcagcgg atcggggctcg ggtacatcgt	360
attcactcac gattagccgc gtagaggccg aggacgcggc gacttactac tgtcagcaat	420
ggtcctttaa tccaccacag tttggagcgg gcaccaagct cgaacttaaa agaacggtcg	480
ccgcaccctc agtggtttatc ttcccgcctt cggacgaaca acttaagtcg gggaccgctt	540
ccgtggtgtg cttgctgaac aattttctatc ctcggaagc taaagtgcaa tggaaagtcg	600
ataacgcatt gcagagcggc aactcacaag agtcggtaac tgagcaggat agcaaggatt	660
cgacatactc gctgagcagc acgctgacgt tgtccaaggc ggactacgag aaacacaagg	720
tatatgcgtg tgaagtcacc caccagggat tgtcatcgcc ggtcaccaaa tcattcaaca	780
ggtgataaag cgctgccttc tgcggggcctt gccttctggc catgcccttc ttctctccct	840
tgcacctgta cctcttggtc tttgaataaa gcctgagtag gaaggcgcc gctcgagcat	900
gcctctaga	909

<210> 7

<211> 909

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

10

<400> 7

cucguacaga agcuaauacg acucacuaua gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa	60
gaaauauaag agccaccaug gcugucaugg ccccgagaac acuugugcug uuguugacag	120

gagcgucgcg acucacacag acuuugggccg gucagauugu gcucagccag ucgccagcga 180
uccuuucggc cuccccuggu gagaaaguaa cgaugacgug ccgagccucc ucaagcgugu 240
cauacaugca uugguaucag cagaagccug ggucgucgcc caagcccugg aucuacgccc 300
cguccaaucu ugcgucaggg gucccggcac gguucagcgg aucgggggucg gguacaucgu 360
auucacucac gauuagccgc guagaggccg aggacgcggc gacuuacuac ugucagcaau 420
gguccuuuaa uccacccacg uuuggagcgg gcaccaagcu cgaacuuaaa agaacggucg 480
ccgcaccuc aguguuuau ucccgcgccu cggacgaaca acuaagucg gggaccgcuu 540
ccguggugug cuugcugaac aaauucuauc cucgggaagc uaaagugcaa uggaaagucg 600
auaacgcauu gcagagcgga aacucacaag agucgguaac ugagcaggau agcaaggauu 660
cgacauacuc gcugagcagc acgcugacgu uguccaaggc ggacuacgag aaacacaagg 720
uauaugcgug ugaagucacc caccagggau ugucaucgcc ggucaccaa ucauuaaca 780
ggugauaaag cgcugccuuc ugcggggcuu gccuucuggc caugcccuuc uucucucccu 840
ugcaccugua ccuucugguc uuugaauaaa gccugaguag gaaggcggcc gcucgagcau 900
gcaucuaga 909

<210> 8

<211> 1647

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

10

<400> 8

ctcgtacaga agctaatacg actcactata gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa 60
gaaatataag agccaccatg gccgtgatgg cggcgcgac cctggtcctc ctgctgaccg 120
gcgccctcgc cctgacgcag acctgggccc gggagggtgca gctggtcgag agcgggcggg 180
gcctcgtgca gccggggcgg tgcgtgcggc tgagctgcgc cgcgagcggg ttcaacatca 240
aggacacctt catccactgg gtgcgccagg ccccgccgaa gggcctcgag tgggtcgccc 300
ggatctaccc cacgaacggg tacacccgct acgcccagag cgtgaagggc cggttcacca 360
tcagcgcgga cacctcgaag aacacggcct acctgcagat gaacagcctg cgcgccgagg 420
acaccgccgt gtactactgc agccgggtgg ggcgcgacgg gttctacgcc atggactact 480
gggggcaggg caccctcgtc accgtgagca gcgcgtcgac gaagggggcc agcgtgttcc 540
cgctggcccc cagcagcaag agcaccagcg gcgggaccgc cgccctgggc tgcctcgtea 600
aggactactt ccccgagccc gtgaccgtgt cgtggaacag cggcgcgctg acgagcgggg 660
tccacacctt cccggccgtg ctgcagagca gcggcctcta ctgcgtgagc agcgtggtca 720
ccgtgcccag cagcagcctg gggaccaga cgtacatctg caacgtgaac cacaagccct 780

ES 2 862 955 T3

cgaacaccaa	ggtcgacaag	aaggtggagc	ccccgaagag	ctgcgacaag	accacacact	840
gccccgcctg	ccccgcccc	gagctcctgg	gcgggcccag	cgtgttcctg	ttccccccca	900
agcccaagga	cacgctcatg	atcagccgca	cccccgaggt	cacctgcgtg	gtggtcgacg	960
tgagccacga	ggacccccgag	gtgaagttca	actggtagct	cgacggcgtg	gaggtgcaca	1020
acgccaagac	caagccgcgg	gaggagcagt	acaactcgac	gtaccgcgtc	gtgagcgtgc	1080
tgaccgtcct	gcaccaggac	tggctcaacg	gcaaggagta	caagtgcaag	gtgagcaaca	1140
agggcctgcc	cgcgcccata	gagaagacca	tcagcaaggc	caaggggag	ccccgggagc	1200
cgcaggtgta	cacctgccc	cccagccgcg	acgagctcac	gaagaaccag	gtcagcctga	1260
cctgcctggt	gaagggcttc	tacctcctcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaacgggc	1320
agccggagaa	caactacaag	accacccgc	ccgtcctcga	cagcgacggc	agcttcttcc	1380
tgtacagcaa	gctgacgggt	gacaagtcgc	ggtggcagca	gggcaacgtg	ttcagctgca	1440
gcgtcatgca	cgaggccctc	cacaaccact	acaccagaa	gagcctgagc	ctgagccccg	1500
ggaagcatca	tcacatcat	cattgaagcg	ctgccttctg	cggggcttgc	cttctggcca	1560
tgcccttctt	ctctcccttg	cacctgtacc	tcttggtctt	tgaataaagc	ctgagtagga	1620
aggcgccgc	tcgagcatgc	atctaga				1647

<210> 9

<211> 1647

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 9

cucguacaga	agcuaauacg	acucacuaua	gggaaaauag	agagaaaaga	agaguaagaa	60
gaaauauaag	agccaccaug	gccgugaugg	cgccgcggac	ccugguccuc	cugcugaccg	120
gcgcccucgc	ccugacgcag	accuggggcg	gggaggugca	gcuggucgag	agcggcgggg	180
gccucgugca	gccggggcgg	ucgcugcgcc	ugagcugcgc	cgcgagcggg	uucaacauca	240
aggacaccua	cauccacugg	gugcgccagg	cccccgga	gggccucgag	ugggucgccc	300
ggaucuaccc	cacgaacggg	uacacccgcu	acgcccagac	cgugaagggc	cgguucacca	360
ucagcgcgga	caccucgaag	aacacggccu	accugcagau	gaacagccug	cgcgcccagg	420
acaccgccgu	guacuacugc	agccgguggg	gcggcgacgg	guucuacgcc	auggacuacu	480
gggggcaggg	caccucguc	accgugagca	gcgcgucgac	gaagggggcc	agcguguucc	540
cgcugggccc	cagcagcaag	agcaccagcg	gcgggaccgc	cgcggggggc	ugccucguca	600
aggacuacuu	ccccgagccc	gugaccgugu	cguggaacag	cggcgcgug	acgagcgggg	660

ES 2 862 955 T3

uccacaccuu cccggccgug cugcagagca gcgccucua cucgcugagc agcgugguca 720
 ccgugcccag cagcagccug gggaccaga cguacaucug caacgugaac cacaagcccu 780
 cgaacaccaa ggucgacaag aagguggagc ccccgaagag cugcgacaag acccacaccu 840
 gcccgcuccug ccccgccccc gagcuccug gcgggcccag cguguuccug uucccgccca 900
 agcccaagga cagcucaug aucagccgca ccccagaggu caccugcgug guggucgacg 960
 ugagccacga ggaccccgag gugaaguca acugguacgu cgacggcgug gaggugcaca 1020
 acgccaagac caagccgagg gaggagcagu acaacucgac guaccgaguc gugagcgugc 1080
 ugaccguccu gcaccaggac uggcucaacg gcaaggagua caagugcaag gugagcaaca 1140
 agggccugcc cgcgccauc gagaagacca ucagcaaggc caaggggag ccccgggagc 1200
 cgcaggugua caccugccc cccagccgag acgagcucac gaagaaccag gucagccuga 1260
 ccugccuggu gaaggguuc uacccucgg acaucgccc ggagugggag agcaacgggc 1320
 agccggagaa caacuacaag accacccgc ccgucccga cagcgacggc agcuucucc 1380
 uguacagcaa gcugacggug gacaagucgc gguggcagca gggcaacgug uucagcugca 1440
 ggcucaugca cgaggccuc cacaaccacu acaccagaa gagccugagc cugagccccg 1500
 ggaagcauca ucaucaucau cauugaagcg cugccuucug cggggcuugc cuucuggcca 1560
 ugcccuuccu cucuccuug caccuguacc ucuuggucuu ugaauaagc cugaguagga 1620
 aggcggccgc ucgagcaugc aucuaga 1647

<210> 10

<211> 918

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

10

<400> 10

ctcgtacaga agctaatacg actcactata gggaaataag agagaaaaga agagtaagaa 60
 gaaatataag agccaccatg gccgtgatgg cgccgaggac cctggtcctc ctgctgaccg 120
 ggcgcctcgc cctgacgcag acctgggccc gggacatcca gatgaccag agcccgctga 180
 gcctgagcgc cagcgtgggc gaccgggtca cgatcacctg ccgcgcgagc caggacgtga 240
 acaccgccgt ggccgtgtac cagcagaagc ccgggaaggc ccccaagctc ctgatctact 300
 cggcgagctt cctgtacagc ggcgtcccca gccggttcag cgggtcgcgc agcggcacccg 360
 acttcacgct caccatcagc agcctgcagc cggaggactt cgccacctac tactgccagc 420
 agcactacac cagccccc accttcgggc agggacacaa ggtggagatc aagcggaccg 480
 tggccgcccc cagcgtcttc atcttcccgc ccagcgacga gcagctgaag tcgggcacgg 540
 ccagcgtggt gtgcctcctg aacaacttct accccgcga ggcgaaggct cagtgaagga 600

ES 2 862 955 T3

	tggacaacgc cctgcagagc gggaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gactcgaagg	660
	acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa ggccgactac gagaagcaca	720
	aggtctacgc ctgcgaggtg acccaccagg ggctctcgag ccccgtagacc aagagcttca	780
	accggggcga gtgctgaagc gctgccttct gcggggcttg ccttctggcc atgcccttct	840
	tctctccctt gcacctgtac ctcttggtct ttgaataaag cctgagtagg aaggcggccg	900
	ctcgagcatg catctaga	918
	<210> 11	
	<211> 918	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético	
10	<400> 11	
	cucguacaga agcuaauacg acucacuaua gggaaauaag agagaaaaga agaguaagaa	60
	gaaauauaag agccaccaug gccgugaugg cgccgcggac ccugguccuc cugcugaccg	120
	gcgcccucgc ccugacgcag accuggggccg gggacaucca gaugaccagc agcccugcga	180
	gccugagcgc cagcgugggc gaccggguca cgaucaccug ccgcgcgagc caggacguga	240
	acaccgccgu ggccugguac cagcagaagc ccgggaaggc cccaagcuc cugaucuacu	300
	cggcgagcuu ccuguacagc ggcgucccca gccgguucag cgggucgcgc agcggcacccg	360
	acuucacgcu caccaucagc agccugcagc cggaggacuu cgccaccuac uacugccagc	420
	agcacuacac cagcccccc accuucgggc agggcaccaa gguggagauc aagcggaccg	480
	uggccgcccc cagcgucuuc aucuucccgc ccagcgacga gcagcugaag ucgggcacgg	540
	ccagcguggu gugccuccug aacaacuucu acccccgcga ggcgaagguc caguggaagg	600
	uggacaacgc ccugcagagc gggaacagcc aggagagcgu gaccgagcag gacucgaagg	660
	acagcaccua cagccucagc agcaccuga cgcuagcaa ggccgacuac gagaagcaca	720
	aggucuacgc cugcgaggug acccaccagg ggcucucgag ccccgugacc aagagcuuca	780
	accggggcga gugcugaagc gcugccuucu gcggggcuug ccuucuggcc augcccuucu	840
	ucucucccuu gcaccuguac cucuuggucu uugaauaaag ccugaguagg aaggcggccg	900
	cucgagcaug caucuaga	918
15	<210> 12	
	<211> 1797	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 12	
	atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct	60

ES 2 862 955 T3

```

gggccgcctg tggagcgctg cggggtcctc agtaagtgga caaactacat tcatgggtgg 120
caggatcggt gggtagtttt gaaaaataat gctctgagtt actacaaatc tgaagatgaa 180
acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat 240
tttgatgaat gtcgatttga tattagtgtg aatgatagtg tttggtatct tcgtgctcag 300
gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga 360
tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggctcaatgg tgtccctggg gtctggagca 420
agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag 480
ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag 540
tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta 600
gaagatgatg aagatgactt tcctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc 660
aacggcaata aagaaaagtt atttccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggatatagac 720
tttaaagggg aagcgataac ttttaaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct 780
cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa 840
actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa 900
aaatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa 960
gagttctttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca 1020
cagagtgaag aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgccttttct 1080
tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag gttgaagaga tgggtgcagaa ccacatgact 1140
tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa 1200
atgaaggat acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaaagct 1260
acccatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attatttctg gaatgttgac 1320
gttcgcaatg actgggaaac aactatagaa aactttcatg tgggtggaaac attagctgat 1380
aatgcaatca tcatttatca aacacacaag aggggtgtggc ctgcttctca gcgagacgta 1440
ttatatcttt ctgtcattcg aaagatacca gccttgactg aaaatgacct tgaaacttgg 1500
atagtttgta atttttctgt ggatcatgac agtgcctctc taaacaaccg atgtgtccgt 1560
gccaaaataa atgttgctat gatttgtcaa accttggtaa gccaccaga gggaaaccag 1620
gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatatg tagctaattg gaaccctgga 1680
ggatgggcac cagcctcagt gttaagggca gtggcaaagc gagagtatcc taaatttcta 1740
aaacgtttta cttcttacgt ccaagaaaaa actgcaggaa agcctatttt gttctag 1797

```

<210> 13

<211> 544

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 862 955 T3

Met	Ser	Asp	Asn	Gln	Ser	Trp	Asn	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Glu	Asp	Pro	1	5	10	15
Glu	Thr	Glu	Ser	Gly	Pro	Pro	Val	Glu	Arg	Cys	Gly	Val	Leu	Ser	Lys	20	25	30	
Trp	Thr	Asn	Tyr	Ile	His	Gly	Trp	Gln	Asp	Arg	Trp	Val	Val	Leu	Lys	35	40	45	
Asn	Asn	Ala	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Glu	Asp	Glu	Thr	Glu	Tyr	Gly	50	55	60	
Cys	Arg	Gly	Ser	Ile	Cys	Leu	Ser	Lys	Ala	Val	Ile	Thr	Pro	His	Asp	65	70	75	80
Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Phe	Asp	Ile	Ser	Val	Asn	Asp	Ser	Val	Trp	Tyr	85	90	95	
Leu	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Asp	His	Arg	Gln	Gln	Trp	Ile	Asp	Ala	Ile	100	105	110	
Glu	Gln	His	Lys	Thr	Glu	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ser	Glu	Ser	Ser	Leu	Arg	115	120	125	
Arg	His	Gly	Ser	Met	Val	Ser	Leu	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	130	135	140	
Ala	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	Phe	Lys	Lys	Gly	His	Ser	Leu	Arg	Glu	Lys	145	150	155	160
Leu	Ala	Glu	Met	Glu	Thr	Phe	Arg	Asp	Ile	Leu	Cys	Arg	Gln	Val	Asp	165	170	175	
Thr	Leu	Gln	Lys	Tyr	Phe	Asp	Ala	Cys	Ala	Asp	Ala	Val	Ser	Lys	Asp	180	185	190	
Glu	Leu	Gln	Arg	Asp	Lys	Val	Val	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Phe	Pro	195	200	205	
Thr	Thr	Arg	Ser	Asp	Gly	Asp	Phe	Leu	His	Ser	Thr	Asn	Gly	Asn	Lys	210	215	220	
Glu	Lys	Leu	Phe	Pro	His	Val	Thr	Pro	Lys	Gly	Ile	Asn	Gly	Ile	Asp	225	230	235	240

ES 2 862 955 T3

Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 245 250 255
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 260 265 270
 Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 275 280 285
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
 290 295 300
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 305 310 315 320
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 325 330 335
 Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 340 345 350
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 355 360 365
 Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln
 370 375 380
 Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
 385 390 395 400
 Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp
 405 410 415
 Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val
 420 425 430
 Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr
 435 440 445
 Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile
 450 455 460
 Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val
 465 470 475 480
 Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp
 485 490 495
 Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala
 500 505 510
 Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile
 515 520 525
 Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg
 530 535 540

ES 2 862 955 T3

<210> 14
 <211> 1797
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

atgtcggata atcagagctg gaactcgtcg ggctcggagg aggatccaga gacggagtct	60
gggccgcctg tggagcgctg cggggtcctc agtaagtgga caaactacat tcatgggtgg	120
caggatcggtt gggtagtttt gaaaaataat gctctgagtt actacaaatc tgaagatgaa	180
acagagtatg gctgcagagg atccatctgt cttagcaagg ctgtcatcac acctcacgat	240
tttgatgaat gtcgatttga tattagtgtg aatgatagtg tttggatatct tcgtgctcag	300
gatccagatc atagacagca atggatagat gccattgaac agcacaagac tgaatctgga	360
tatggatctg aatccagctt gcgtcgacat ggcgcaatgg tgtccctggt gtctggagca	420
agtggctact ctgcaacatc cacctcttca ttcaagaaag gccacagttt acgtgagaag	480
ttggctgaaa tggaaacatt tagagacatc ttatgtagac aagttgacac gctacagaag	540
tactttgatg cctgtgctga tgctgtctct aaggatgaac ttcaaaggga taaagtggta	600
gaagatgatg aagatgactt tctacaacg cgttctgatg gtgacttctt gcatagtacc	660
aacggcaata aagaaaagtt atttccacat gtgacaccaa aaggaattaa tggatatagac	720
tttaaaaggg aagcgataac ttttaagca actactgctg gaatccttgc aacactttct	780
cattgtattg aactaatggt taaacgtgag gacagctggc agaagagact ggataaggaa	840
actgagaaga aaagaagaac agaggaagca tataaaaatg caatgacaga acttaagaaa	900
aaatcccact ttggaggacc agattatgaa gaaggcccta acagtctgat taatgaagaa	960
gagttctttg atgctgttga agctgctctt gacagacaag ataaaataga agaacagtca	1020
cagagtgaaa aggtgagatt acattggcct acatccttgc cctctggaga tgccttttct	1080
tctgtgggga cacatagatt tgtccaaaag gttgaagaga tgggtgcagaa ccacatgact	1140
tactcattac aggatgtagg cggagatgcc aattggcagt tggttgtaga agaaggagaa	1200
atgaaggatg acagaagaga agtagaagaa aatgggattg ttctggatcc tttaaaagct	1260
acctatgcag ttaaaggcgt cacaggacat gaagtctgca attatttctg gaatgttgac	1320
gttcgcaatg actgggaaac aactatagaa aactttcatg tgggtgaaac attagctgat	1380
aatgcaatca tcatttatca aacacacaag aggggtgtggc ctgcttctca gcgagacgta	1440
ttatatcttt ctgtcattcg aaagatacca gccttgactg aaaatgacct tgaaacttgg	1500
atagtttgta atttttctgt ggatcatgac agtgctctc taaacaaccg atgtgtccgt	1560
gccaaaataa atgttgctat gatttgctca accttggtta gccaccaga gggaaaccag	1620
gaaattagca gggacaacat tctatgcaag attacatatg tagctaatgt gaaccctgga	1680
ggatgggcac cagcctcagt gttaagggca gtggcaaaag gagagtatcc taaatttcta	1740
aaacgtttta cttcttacgt ccaagaaaaa actgcaggaa agcctatttt gttctag	1797

10

<210> 15
 <211> 598
 <212> PRT

ES 2 862 955 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Met Ser Asp Asn Gln Ser Trp Asn Ser Ser Gly Ser Glu Glu Asp Pro
1 5 10 15

Glu Thr Glu Ser Gly Pro Pro Val Glu Arg Cys Gly Val Leu Ser Lys
20 25 30

Trp Thr Asn Tyr Ile His Gly Trp Gln Asp Arg Trp Val Val Leu Lys
35 40 45

Asn Asn Ala Leu Ser Tyr Tyr Lys Ser Glu Asp Glu Thr Glu Tyr Gly
50 55 60

Cys Arg Gly Ser Ile Cys Leu Ser Lys Ala Val Ile Thr Pro His Asp
65 70 75 80

Phe Asp Glu Cys Arg Phe Asp Ile Ser Val Asn Asp Ser Val Trp Tyr
85 90 95

Leu Arg Ala Gln Asp Pro Asp His Arg Gln Gln Trp Ile Asp Ala Ile
100 105 110

Glu Gln His Lys Thr Glu Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Ser Ser Leu Arg
115 120 125

Arg His Gly Ala Met Val Ser Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ser
130 135 140

Ala Thr Ser Thr Ser Ser Phe Lys Lys Gly His Ser Leu Arg Glu Lys
145 150 155 160

5

ES 2 862 955 T3

Leu Ala Glu Met Glu Thr Phe Arg Asp Ile Leu Cys Arg Gln Val Asp
 165 170 175
 Thr Leu Gln Lys Tyr Phe Asp Ala Cys Ala Asp Ala Val Ser Lys Asp
 180 185 190
 Glu Leu Gln Arg Asp Lys Val Val Glu Asp Asp Glu Asp Asp Phe Pro
 195 200 205
 Thr Thr Arg Ser Asp Gly Asp Phe Leu His Ser Thr Asn Gly Asn Lys
 210 215 220
 Glu Lys Leu Phe Pro His Val Thr Pro Lys Gly Ile Asn Gly Ile Asp
 225 230 235 240
 Phe Lys Gly Glu Ala Ile Thr Phe Lys Ala Thr Thr Ala Gly Ile Leu
 245 250 255
 Ala Thr Leu Ser His Cys Ile Glu Leu Met Val Lys Arg Glu Asp Ser
 260 265 270
 Trp Gln Lys Arg Leu Asp Lys Glu Thr Glu Lys Lys Arg Arg Thr Glu
 275 280 285
 Glu Ala Tyr Lys Asn Ala Met Thr Glu Leu Lys Lys Lys Ser His Phe
 290 295 300
 Gly Gly Pro Asp Tyr Glu Glu Gly Pro Asn Ser Leu Ile Asn Glu Glu
 305 310 315 320
 Glu Phe Phe Asp Ala Val Glu Ala Ala Leu Asp Arg Gln Asp Lys Ile
 325 330 335
 Glu Glu Gln Ser Gln Ser Glu Lys Val Arg Leu His Trp Pro Thr Ser
 340 345 350
 Leu Pro Ser Gly Asp Ala Phe Ser Ser Val Gly Thr His Arg Phe Val
 355 360 365
 Gln Lys Val Glu Glu Met Val Gln Asn His Met Thr Tyr Ser Leu Gln
 370 375 380
 Asp Val Gly Gly Asp Ala Asn Trp Gln Leu Val Val Glu Glu Gly Glu
 385 390 395 400
 Met Lys Val Tyr Arg Arg Glu Val Glu Glu Asn Gly Ile Val Leu Asp

ES 2 862 955 T3

405	410	415
Pro Leu Lys Ala Thr His Ala Val Lys Gly Val Thr Gly His Glu Val		
420	425	430
Cys Asn Tyr Phe Trp Asn Val Asp Val Arg Asn Asp Trp Glu Thr Thr		
435	440	445
Ile Glu Asn Phe His Val Val Glu Thr Leu Ala Asp Asn Ala Ile Ile		
450	455	460
Ile Tyr Gln Thr His Lys Arg Val Trp Pro Ala Ser Gln Arg Asp Val		
465	470	475
Leu Tyr Leu Ser Val Ile Arg Lys Ile Pro Ala Leu Thr Glu Asn Asp		
485	490	495
Pro Glu Thr Trp Ile Val Cys Asn Phe Ser Val Asp His Asp Ser Ala		
500	505	510
Pro Leu Asn Asn Arg Cys Val Arg Ala Lys Ile Asn Val Ala Met Ile		
515	520	525
Cys Gln Thr Leu Val Ser Pro Pro Glu Gly Asn Gln Glu Ile Ser Arg		
530	535	540
Asp Asn Ile Leu Cys Lys Ile Thr Tyr Val Ala Asn Val Asn Pro Gly		
545	550	555
Gly Trp Ala Pro Ala Ser Val Leu Arg Ala Val Ala Lys Arg Glu Tyr		
565	570	575
Pro Lys Phe Leu Lys Arg Phe Thr Ser Tyr Val Gln Glu Lys Thr Ala		
580	585	590
Gly Lys Pro Ile Leu Phe		
595		

REIVINDICACIONES

1. Un kit para administración de dos construcciones de ARNm modificado *in vivo* para provocar la traducción intracelular de las construcciones de ARNm en cadenas pesadas y ligeras de una proteína de inmunoglobulina, comprendiendo el kit un primer ácido nucleico aislado que es ARNm traducible que i) codifica una cadena pesada de inmunoglobulina o una cadena ligera de inmunoglobulina y ii) comprende un nucleósido modificado; en donde el primer ácido nucleico es capaz de evadir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la cual se introduzca el primer ácido nucleico aislado, en donde el ARNm traducible está desprovisto de nucleótidos de citidina o uracilo.
2. El kit de la reivindicación 1, en donde el ARNm comprende 5-metil-citidina y pseudouridina.
3. Una preparación farmacéutica para la administración de dos construcciones de ARNm modificado *in vivo* para provocar la traducción intracelular de las construcciones de ARNm en cadenas pesadas y ligeras de una proteína de inmunoglobulina, comprendiendo la preparación una cantidad eficaz de un primer ácido nucleico que es un ARNm traducible que i) codifica una cadena pesada de inmunoglobulina o una cadena ligera de inmunoglobulina y ii) comprende un nucleósido modificado, en donde el primer ácido nucleico presenta reducción de la degradación por una nucleasa celular y es capaz de evitar una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el primer ácido nucleico, en donde el ARNm traducible está desprovisto de nucleótidos de citidina o uracilo.

Figura 1

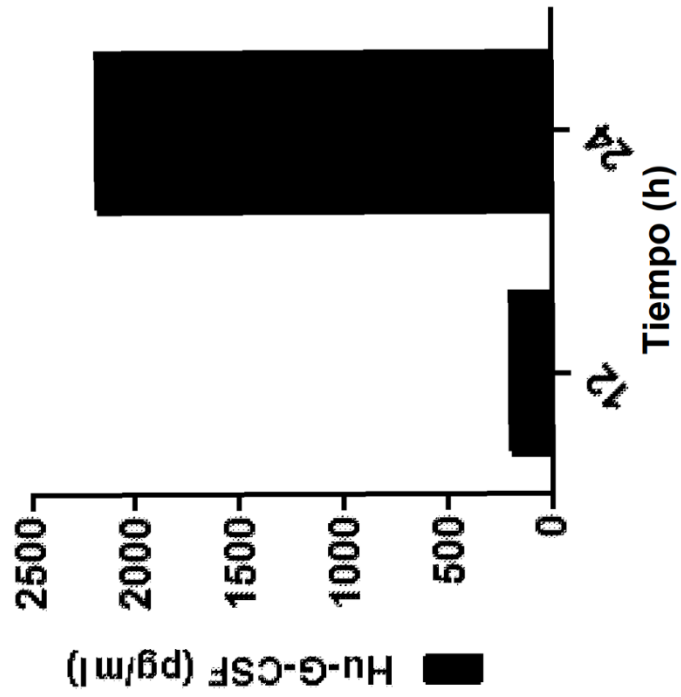


Figura 2

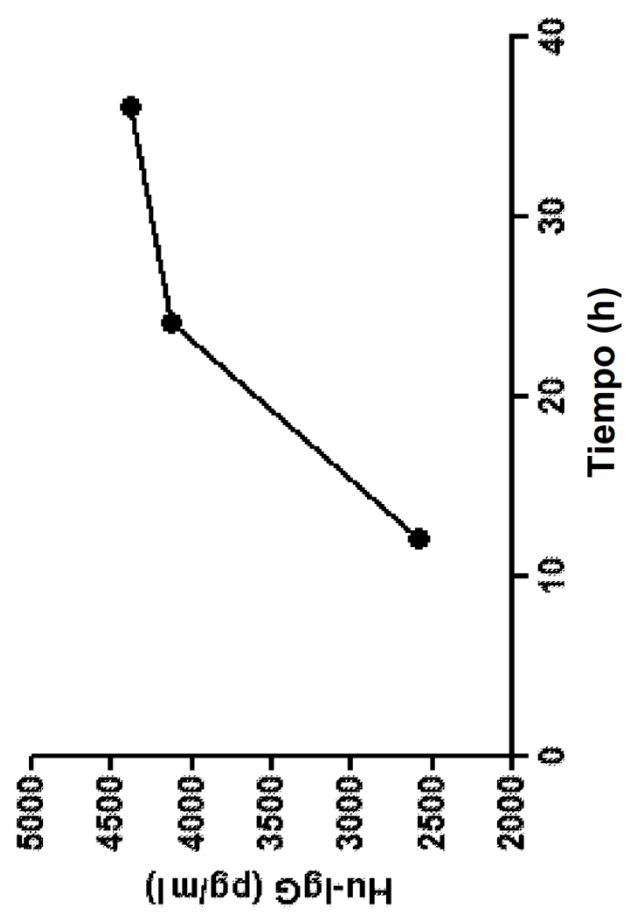


Figura 3

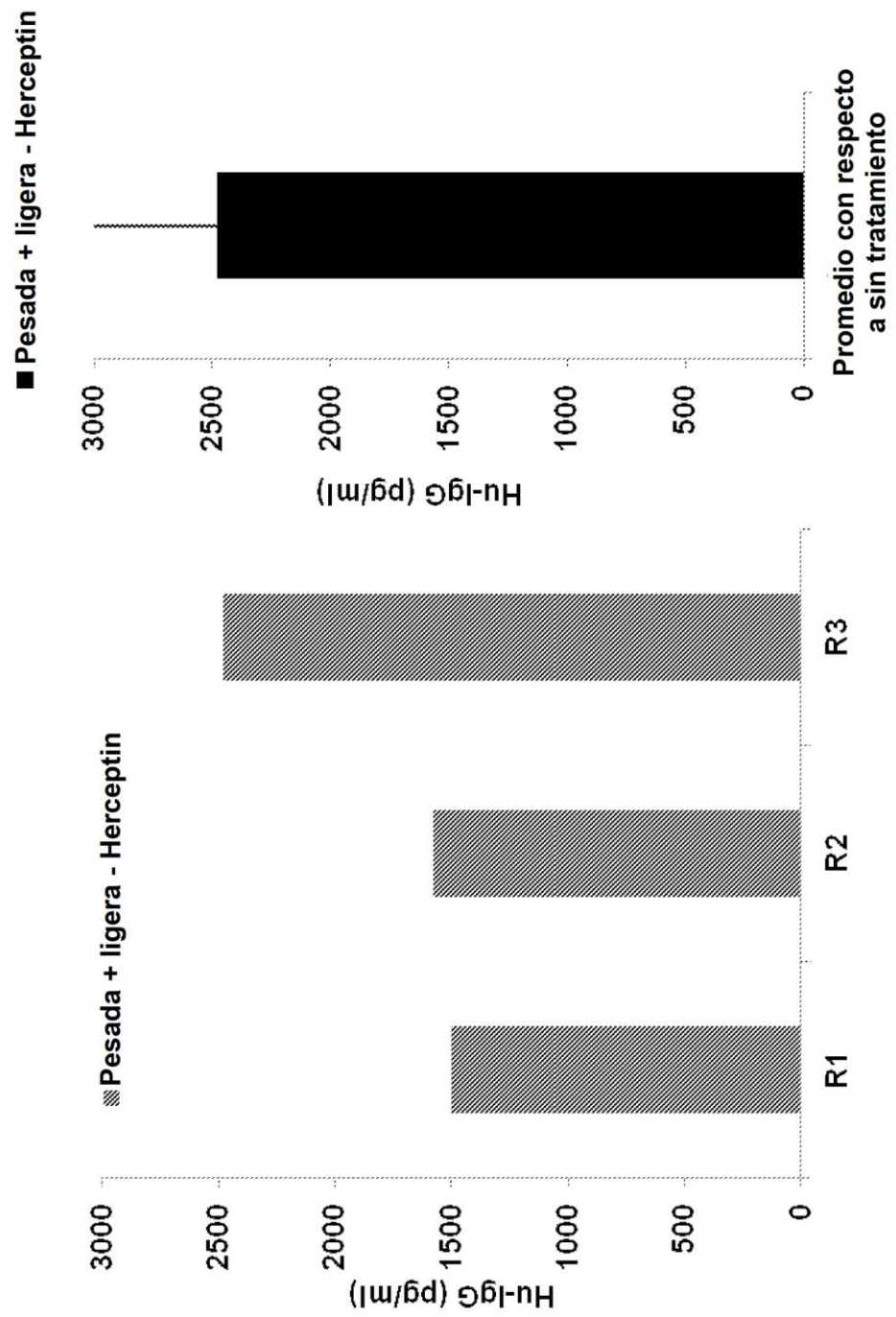


Figura 4

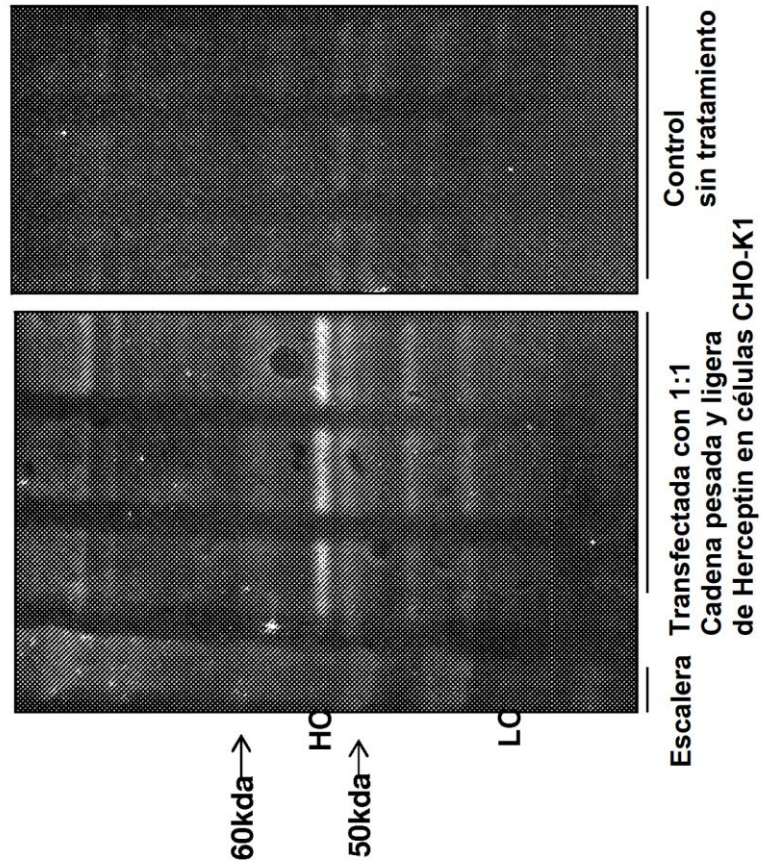


Figura 5

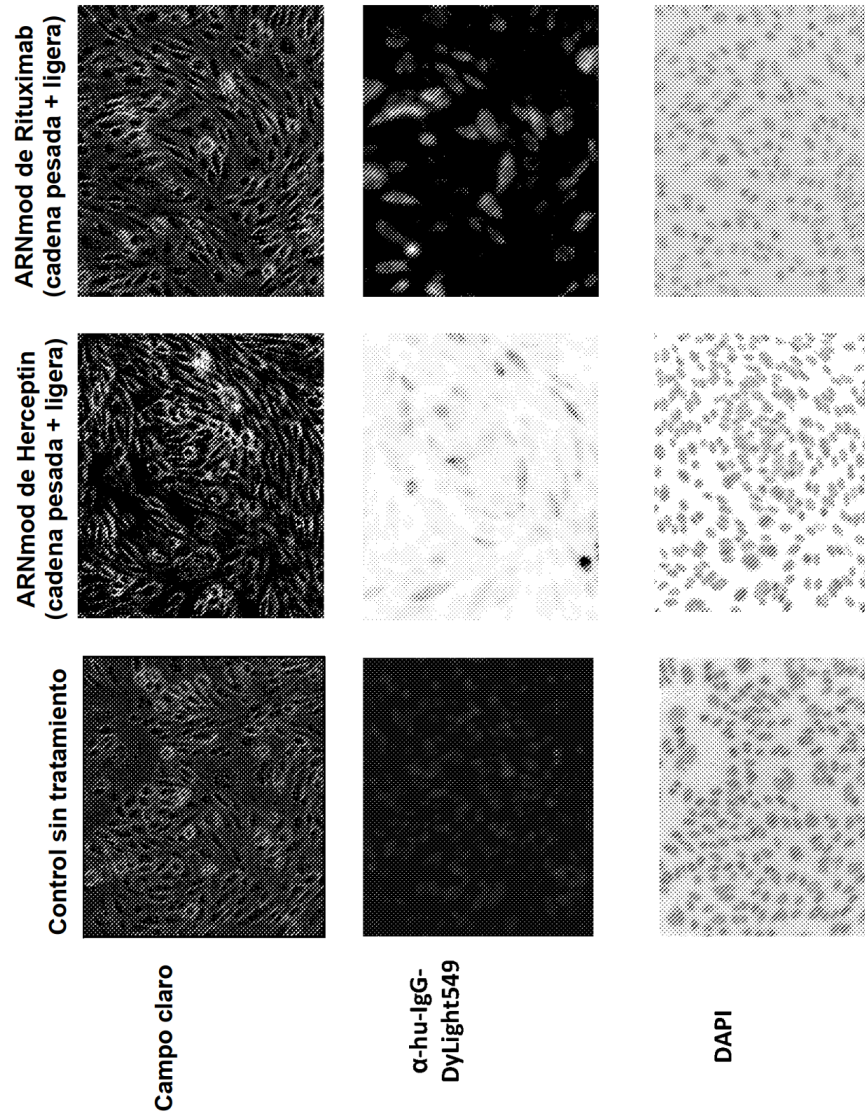


Figura 6

