

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 575**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

C12N 15/117 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2014 PCT/EP2014/002931**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15062738**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2014 E 14809289 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3062798**

54 Título: **ARN modificado con propiedades inmunoestimuladoras disminuidas**

30 Prioridad:

01.11.2013 WO PCT/EP2013/003293

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

18.02.2021

73 Titular/es:

**CUREVAC AG (100.0%)
Friedrich-Miescher-Straße 15
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHLAKE, THOMAS y
THESS, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

BUENO FERRÁN , Ana María

ES 2 806 575 T3

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

DESCRIPCIÓN

ARN modificado con propiedades inmunoestimuladoras disminuidas

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a un método como se define en las reivindicaciones adjuntas para proporcionar un ARNm con propiedades inmunoestimuladoras disminuidas, el cual codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo y su uso en la terapia de reemplazo de proteínas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Las moléculas de ARN terapéuticas representan una clase emergente de fármacos. Las terapias basadas en ARN incluyen moléculas de ARN mensajero (ARNm) que codifican antígenos para su uso como vacunas. Las vacunas de ARNm combinan propiedades inmunológicas deseables con la flexibilidad de las vacunas genéticas. Una de las varias ventajas de usar ARNm para la vacunación es que la misma molécula no solo proporciona una fuente de antígeno para la inducción de una respuesta inmune adaptativa, sino que puede unirse simultáneamente a receptores de reconocimiento de patrones, tales como los receptores tipo Toll (TLR) y así estimular la inmunidad innata. Previamente se ha informado de que una vacuna basada en ARNm de dos componentes con actividad dual induce respuestas inmunitarias adaptativas equilibradas dependientes de TLR-7 y proporciona una actividad antitumoral (Fotin-Mleczek et al., 2011. J. Immunother. 34(1):1-15). Además, se considera que el ARNm es un vector más seguro que los vectores basados en ADN, ya que el ARN no puede integrarse en el ADN genómico, posiblemente llevando a una mutagénesis de inserción.

- 20 Las moléculas de ARNm también pueden emplearse como terapéuticas en terapias de reemplazo, tales como, por ejemplo, terapias de reemplazo de proteínas en pacientes, para sustituir proteínas perdidas o mutadas, como factores de crecimiento o enzimas. Sin embargo, el desarrollo exitoso de terapias de reemplazo seguras y eficaces basadas en ARNm debe satisfacer diferentes requisitos en comparación con las vacunas. Cuando se aplica un ARNm para terapias de reemplazo de proteínas, el ARNm debe proporcionar la máxima expresión de la proteína de interés en términos de nivel de expresión y duración y una mínima estimulación del sistema inmunitario con el fin de evitar respuestas inmunes generales del paciente a tratar y respuestas inmunes específicas contra la molécula de ARNm administrado.

- 30 Mientras que las propiedades inmunoestimuladoras inherentes del ARNm se consideran una característica deseable para las vacunas, este efecto puede causar complicaciones no deseadas en las terapias de reemplazo. En ,especial, este es el caso del tratamiento de enfermedades crónicas en las que la terapia con ARNm debe administrarse repetidamente durante un período de tiempo prolongado a los pacientes. Aunque en estudios con animales se ha demostrado que el factor de crecimiento codificado con ARNm eritropoyetina (EPO) se puede expresar con éxito *in vivo*, resultando en un aumento biológicamente relevante de los reticulocitos (Schlake et al., 2012. RNA Biol. 9(11): 1319-30; Kariko et al., 2012. Mol. Ther. 20(5): 948-53; Kormann et al., 2011. Nat. Biotechnol. 29(2): 154-7), se ha reconocido que las propiedades inmunoestimuladoras del ARNm pueden provocar potenciales problemas durante la terapia. En consecuencia, tales propiedades deberían reducirse.

- 40 Las células de mamífero albergan un conjunto diverso de receptores de factores de reconocimiento de patrones de detección de ácido nucleico (PRR) que reconocen el ARN por diversos patrones de reconocimiento (Revisión: Desmet et al., 2012. Nat. Rev. Immunol. 12(7): 479-91). Los receptores tipo Toll (TLR) son el grupo mejor estudiado de factores de reconocimiento de patrones (PRR). De los 10 TLR humanos, cuatro TLR (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) son sensores de ácido nucleico que reconocen diversos ácidos nucleicos derivados de patógenos. Mientras que TLR3, TLR7 y TLR8 reconocen ARN, TLR9 se une a los motivos CpG en el ADN. TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 son TLR intracelulares y reconocen ácidos nucleicos que son absorbidos por la célula vía endocitosis y son transferidos a los endosomas. Con la excepción de TLR3, todos los TLR detectores de ácidos nucleicos usan la proteína adaptadora MYD88 para la señalización aguas abajo con el fin de activar los factores de transcripción AP1 y NF- κ B, que conducen a la expresión de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas median el reclutamiento y la activación de células inmunes. La señalización de TLR3 depende de la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR que induce IFN (TRIF), que conduce a la expresión de citocinas proinflamatorias, así como de interferones tipo I (IFN), que juegan un papel en la respuesta antiviral. Por ejemplo, después de la activación de TLR7 y TLR9, las células dendríticas plasmacitoides (pDC) pueden producir grandes cantidades de interferones tipo I (Desmet et al., 2012. Nat. Rev. Immunol. 12(7): 479-91).

Los receptores tipo RIG-I (RLR) son miembros de la superfamilia de las helicasas DExD/H-box que actúan como sensores de ARN citosólico. Miembros de esta familia son el gen inducible por ácido retinoico I (RIG-I),

la proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (MDA5) y la proteína laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2). Las RLR son ampliamente expresadas por las células inmunes y no inmunes. El ligando natural típico de RIG-I es un ARN corto con emparejamiento de bases de extremos romos y un extremo trifosfato 5' sin cap, pero también se ha demostrado que RIG-I se une a varios ligandos de ARN bicatenarios (ARNds) y monocatenarios ARN (ARNss). Generalmente, la MDA5 se une a moléculas de ARNds largas, pero también está involucrada en la discriminación de ARN propios y no propios en función del estado de metilación en 2'-O de la estructura cap (Züst et al., 2011. Nat. Immunol 12(2): 137-43, PMID 21217758). Además, RIG-I y MDA5 pueden activarse mediante ARN propios que se cortan mediante ARNasa L. La ARNasa L es una ribonucleasa que es inducida en respuesta a interferones de tipo I y degrada todo el ARN dentro de la célula. La señalización de RLR depende del adaptador IFNB-promotor estimulador 1 (IPS1) que conduce a la activación de los factores de transcripción IRF1, IRF3, IRF7 y NF-κB y, en consecuencia, a la expresión de IFN tipo I y citocinas proinflamatorias (Broz et al., 2013 Nat. Rev. Immunol. 13(8): 551-65).

Las 2'-5'-oligoadenilato-sintetasas (OAS) y la proteína quinasa regulada por ARN (PKR) son enzimas dependientes de ARNds inducidas por interferón ubicadas en el citosol que juegan un papel importante en la mediación de los efectos antivirales de los interferones. PKR es una proteína serina/treonina-quinasa que adquiere actividad enzimática después de la autofosforilación, un proceso mediado por ARNds. La activación de PKR permite a la quinasa fosforilar su sustrato natural, la subunidad alfa del factor de iniciación de la síntesis de proteínas eucariotas 2 (EIF2-alfa), lo que lleva a la inhibición de la síntesis proteica. Las 2'-5'-oligoadenilato-sintetasas también son activadas por ARNds y posteriormente polimerizan el ATP en oligoadenilatos unidos en 2'-5' (2'-5'(A)) de varias longitudes, que funcionan como activadores específicos de una endoribonucleasa latente, la RNasa L. Una vez activada por 2'-5'(A), la RNasa L degrada los ARN virales y celulares, lo que resulta en la inhibición de la síntesis proteica. Ambas enzimas, PKR y 2'-5'-oligoadenilato-sintetasa, son activadas por ARNss y ARNds que poseen una estructura secundaria extensa (Sharp et al., 1999. Virology 257 (2): 303-13).

Así, las moléculas de ARN pueden ejercer una respuesta inmune inespecífica en los pacientes, lo que debe evitarse o al menos reducirse. Se han descrito diversos enfoques para disminuir las propiedades inmunoestimuladoras del ARNm, incluyendo la incorporación de nucleósidos modificados de origen natural en ARNm transcrito *in vitro*. Se espera que la purificación de tales ARNm elimine contaminantes o ARN bicatenario. Alternativamente, también se ha previsto la síntesis y el uso de nuevos nucleósidos modificados de origen no natural con un menor potencial inmunoestimulador.

Kariko y col. demostraron que diferentes ARNm estimulaban la secreción de citocinas, como TNF, en diversos grados, mediante las células dendríticas humanas (DC), un efecto que se atribuyó al compromiso de TLR3, 7 y 8 (Kariko et al., 2005. Immunity 23(2): 165-75). Mientras que el ARNds sintético, el ARN transcrito *in vitro* y el ARN bacteriano y mitocondrial inducían una fuerte secreción de citocinas, el ARN citoplasmático de células de mamífero estimulaba las DC en un grado mucho menor. Además, se demostró que el ARN señala, mediante TLR3, TLR7 y TLR8 humanos. Sin embargo, la incorporación de nucleósidos modificados tales como 5-metilcitosina (m5C), N6-metiladenosina (m6A), 5-metiluridina (m5U), 2-tiouridina (s2U) o pseudouridina (ψ) eliminaba esta actividad. Las células dendríticas (DC) tratadas con ARN modificado expresaban significativamente menos citocinas y marcadores de activación que aquellas tratadas con ARN no modificado. Los autores concluyeron que las modificaciones de nucleósidos suprimen el potencial del ARN de activar las DC. Por tanto, se sugirió que los ARNm que contienen nucleósidos modificados que ocurren naturalmente pueden usarse en aplicaciones clínicas debido a sus propiedades inmunoestimulantes reducidas (Kariko et al., 2007. Curr. Opin. Drug Discov Devel. 10(5): 523-32; WO2007024708A1). El uso de ARN(m) modificado también está descrito en la WO2009/127230.

Otros trabajos demostraron que el ARNm generado *in vitro* conteniendo uridina activaba la proteína quinasa dependiente de ARN (PKR), que luego fosforilaba el factor de iniciación de la traducción 2-alfa (eIF-2), e inhibía la traducción. Por el contrario, los ARNm transcritos *in vitro* conteniendo pseudouridina como nucleósido modificado activaban la PKR en un menor grado, mientras que la traducción de los ARNm conteniendo pseudouridina no se inhibía (Anderson et al., 2010. Nucleic Acids Res. 38(17):5884-92).

Además, el grupo Kariko demostró que el ARN transcrito *in vitro* no modificado activa la 2'-5'-oligoadenilato-sintetasa (OAS), inducía la escisión del ARN ribosómico (ARNr) mediada por ARNasa L y era rápidamente escindido por la ARNasa L. En contraste, el ARN que contenía nucleósidos modificados activaba la OAS de manera menos eficiente e inducía una escisión limitada de ARNr, demostrando así el papel de las modificaciones de nucleósidos en la supresión del reconocimiento inmunitario del ARN (Anderson et al., 2011. Nucleic Acids Res. 39(21):9329-38).

Se ha demostrado que la purificación de ARNm transcrito *in vitro* por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) reduce la activación inmune vía el ARNm transfectado. Se informó que los contaminantes, incluido el ARNds, del ARN transcrito *in vitro* modificado con nucleósidos eran responsables de la activación inmune

- innata y que su eliminación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) resultaba en ARNm que no inducía la producción de IFN ni de citocinas inflamatorias. Se tradujo a niveles de 10 a 1.000 veces superiores en células primarias. Aunque los ARNm no modificados se traducían significativamente mejor después de la purificación, todavía inducían niveles de secreción de citocinas significativos (Kariko et al., 2011. *Nucleic Acids Res.* 39(21): e142). El tratamiento de ratones con ARNm modificado con pseudouridina que codifica la eritropoyetina (EPO) dio lugar a una mayor expresión de proteínas y efectos biológicos más fuertes en comparación con el ARNm no modificado. Además, el ARNm modificado no inducía niveles detectables de interferón y anticuerpos anti-EPO en plasma. Además, se demostró que la inyección intraperitoneal de ARNm de EPO en macacos aumentaba los niveles de EPO en suero (Kariko et al., *Mol. Ther.* 20(5):948-53).
- 10 En otro estudio, usando una combinación de diferentes modificaciones de nucleótidos, se demostró en ratones una expresión mejorada y una inmunoestimulación reducida de un ARNm que codifica EPO. Además, en un modelo de ratón de una enfermedad pulmonar congénita letal causada por la falta de la proteína surfactante B (SP-B), la aplicación de un aerosol de ARNm de SP-B modificado en el pulmón demostró un efecto terapéutico (Kormann et al., 2011 *Nat. Biotechnol.* 29(2): 154-7; WO2011012316).
- 15 Se ha reportado la inducción de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) por transfección de células humanas con ARNm sintético modificado. Se observó una expresión mejorada y una inmunoestimulación reducida, indicada por una menor expresión de genes regulados por interferón, con ARNm modificados en sus bases conteniendo 5-metilcitosina y pseudouridina (Warren et al., 2010. *Cell Stem Cell.* 7(5):618-30; WO2011130624; WO2011071931).
- 20 La WO2013/052523 describe nuevos nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados que pueden exhibir una respuesta inmune innata reducida cuando se introducen en las células. Sin embargo, cualquier enfoque para reducir la estimulación inmune innata basada en un ARNm que contiene nucleósidos modificados no naturales es menos deseable. Cualquier modificación de este tipo, que generalmente no ocurre en pacientes, conlleva el riesgo de efectos secundarios no deseados.
- 25 En vista de lo anterior, existe una necesidad continua de nuevos métodos para reducir las propiedades inmunoestimuladoras del ARNm a la vez que se mantiene una expresión eficiente de proteínas y un buen perfil de seguridad, evitando cualquier riesgo de efectos secundarios no deseados.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 30 Los presentes inventores han identificado un método apropiado para proporcionar un ARNm con una inmunogenicidad y/o capacidad inmunoestimuladora reducida (respuesta inmune contra un ARNm), que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo, donde el método comprende las etapas de:
- 1) identificar una secuencia de ARNm de tipo natural diana que codifica para el polipéptido o la proteína biológicamente activos,
 - 35 2) modificar al menos el 70% de los codones de la secuencia de tipo natural que son optimizables en su contenido en citidina mediante el aumento del contenido en citidina del ARNm, de forma que el contenido en citidina de la zona de la región codificadora del ARNm es más grande que el contenido en citidina de la región codificante del ARNm de tipo natural, no cambiando la secuencia de aminoácidos codificada en comparación con la de tipo natural,
 - 40 3) opcionalmente modificar al menos el 70% de los codones para los aminoácidos que no son seleccionables para la optimización en C, pero que son optimizables en cuanto al contenido en guanosina, aumentando el contenido en guanosina, y
 - 4) sintetizar el ARNm modificado diana, comprendiendo la síntesis una etapa de síntesis química o de transcripción *in vitro*,
- 45 donde el ARNm modificado diana de menor inmunogenicidad y/o de menor capacidad inmunoestimuladora se selecciona de los ARNm modificados diana obtenibles mediante el método.
- El ARNm diana modificado se modifica de modo que se alcanza al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80%, o al menos el 90% del contenido máximo teórico de citidina o incluso un contenido máximo de citidina.
- 50 En una realización preferente, al menos el 70%, 80%, 90% o incluso el 100% de los codones de la secuencia de ARNm diana de tipo natural que son "optimizables para el contenido en citidina" se reemplazan por codones con un mayor contenido en citidina que el presente en la secuencia de tipo natural.

- En otra realización preferente, algunos de los codones de la secuencia de codificación de tipo natural pueden además modificarse de forma que un codón para un ARNt relativamente raro en la célula se intercambie por un codón para un ARNt relativamente frecuente en la célula, siempre que el codón sustituido para un ARNt relativamente frecuente lleve el mismo aminoácido que el codón del ARNt relativamente raro de tipo natural
- 5 original. Preferentemente, todos los codones para un ARNt relativamente raro se reemplazan por un codón para un ARNt relativamente frecuente en la célula, excepto los codones que codifican aminoácidos, que están codificados exclusivamente por codones que no contienen citidina, o excepto para glutamina (Gln), que está codificada por dos codones que contienen cada uno el mismo número de citidinas.
- 10 En una realización preferente adicional de la presente invención, el ARNm diana modificado se modifica de forma que se alcanza al menos el 80% o al menos el 90% del contenido máximo teórico de citidina o incluso el contenido máximo de citidina mediante codones que codifican ARNt relativamente frecuentes en la célula, permaneciendo la secuencia de aminoácidos sin cambio.
- 15 En consecuencia, los anteriores objetivos de la presente invención se resuelven mediante un método que proporciona un ARNm diana modificado que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo con inmunogenicidad y/o capacidad inmunoestimuladora disminuida en comparación con la secuencia de tipo natural, donde el contenido en C de la región de codificación del ARNm diana modificado se incrementa típicamente en al menos un 10%, preferiblemente en al menos un 12,5%, más preferiblemente en al menos un 15%, con respecto al contenido en citidina de la región de codificación del ARNm de tipo natural del polipéptido o proteína.
- 20 En una realización específica, la presente invención proporciona un método donde, además de aumentar el contenido en citidina, algunos codones, preferiblemente todos los codones de la secuencia de tipo natural, que no son optimizables para el contenido en citidina o que no codifican para la glutamina y que reflejan un codón relativamente raro en la célula se reemplazan por codones que codifican un ARNt relativamente frecuente en la célula que porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.
- 25 Preferiblemente, el índice de adaptación de codones (CAI) de la región del ARNm inmunológicamente modulado que codifica el polipéptido o proteína de acuerdo con la invención se incrementa en al menos un 0,05, preferiblemente en al menos 0,1, preferiblemente en al menos 0,125, con total preferencia en al menos un 0,15 en comparación con el CAI de la región de codificación del ARNm de tipo natural que codifica el polipéptido o la proteína. Así, el ARNm modificado muestra preferiblemente un mayor nivel de expresión en
- 30 comparación con el ARNm de tipo natural.
- El método según la presente invención puede comprender además la etapa de analizar la inmunogenicidad y/o la capacidad inmunoestimuladora del ARNm diana modificado que codifica para el al menos un polipéptido o proteína. Preferentemente, la inmunogenicidad y/o la capacidad inmunoestimuladora del ARNm diana modificado que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo se analiza transfectando *in vitro* monocitos de sangre periférica (PBMC) con el ARNm diana modificado de la invención, cultivando las
- 35 células durante al menos 8 horas, preferiblemente durante al menos 12 horas, más preferiblemente durante al menos 20 horas, y determinando la cantidad de citocinas proinflamatorias en el sobrenadante celular. El resultado de dicho ensayo puede compararse, en un paso opcional adicional, con el resultado de experimentos paralelos llevados a cabo para la secuencia de tipo natural (wt) subyacente.
- 40 De acuerdo con la invención, el ARNm diana que codifica para al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo de menor inmunogenicidad y/o capacidad inmunoestimuladora en comparación con la secuencia de tipo natural se selecciona de todos los ARNm diana modificados obtenibles mediante un método de la invención. Opcionalmente, el método de la invención de acuerdo con las realizaciones anteriores se puede reiterar para disminuir aún más la inmunogenicidad y/o la capacidad inmunoestimuladora del ARNm diana que
- 45 codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo. Así, se pueden producir y probar ARNm diana modificados alternativos que exhiben las propiedades estructurales de la invención.
- Según una realización de la presente invención, la modulación dirigida de la respuesta inmune contra un ARNm que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo se lleva a cabo mediante la ejecución de al menos un algoritmo de optimización de citidina en un ordenador con la ayuda de un software adecuado.
- 50 También se describe aquí un ARNm modificado de inmunogenicidad y/o capacidad inmunoestimuladora reducida que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo según una o más realizaciones de la presente invención, donde el ARNm modificado se obtiene mediante síntesis química o biológica. Preferentemente, el ARNm modificado se obtiene por transcripción *in vitro*, preferiblemente por transcripción *in vitro* mediada por polimerasa de bacteriófago, por ejemplo por transcripción *in vitro* de polimerasa Sp6 y/o
- 55 transcripción *in vitro* mediada por polimerasa T3, preferiblemente por transcripción *in vitro* mediada por polimerasa T7.

También se describe aquí un ARNm modificado de inmunogenicidad y/o capacidad inmunoestimuladora reducida que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo obtenible por métodos de acuerdo con la invención.

5 En este contexto, se prefiere particularmente que el ARNm modificado de inmunogenicidad y/o capacidad inmunoestimuladora reducida que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo tenga al menos un 10%, 20% o al menos un 30% menos inmunogenicidad y/o capacidad inmunoestimuladora en comparación con el ARNm de tipo natural respectivo.

10 El ARNm modificado de inmunogenicidad y/o capacidad inmunoestimuladora reducida se caracteriza típicamente por una afinidad más baja, por ejemplo al menos reducida en un 20% a uno o más, a TLR3, TLR7, TLR8, PKR, MDA5, RIG-I, LGP2 o 2'-5'-oligoadenilato-sintetasa en comparación con el ARNm de tipo natural que codifica al menos un polipéptido o proteína

Además, el ARNm modificado según una o más de las realizaciones anteriores comprende una estructura 5'-CAP y/o al menos una 3'- y/o 5'-UTR (región no traducida) y/o una cola poli-A de al menos 60 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 70 nucleótidos, y/o una secuencia estabilizadora 3'.

15 Por consiguiente, la presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende un ARNm modificado según una o más de las realizaciones anteriores, que opcionalmente comprende uno o más excipientes, vehículos, diluyentes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 Más específicamente, la presente descripción refiere una composición farmacéutica según la realización anterior o el ARNm modificado según una o más de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de la terapia de reemplazo proteico, preferiblemente para su uso en el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades hereditarias o endocrinológicas.

25 Además, la presente descripción describe el ARNm modificado para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que necesita una terapia de reemplazo proteico, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad farmacéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de acuerdo con una o más de las realizaciones anteriores o de una cantidad efectiva del ARNm modificado de acuerdo con una o más de las realizaciones anteriores.

30 Más específicamente, la presente descripción refiere el uso en un método de acuerdo con la realización anterior donde la enfermedad a tratar mediante terapia de reemplazo proteico se selecciona del grupo consistente en trastornos hereditarios o endocrinológicos, tales como trastornos del metabolismo de aminoácidos, trastornos del metabolismo de carbohidratos, trastornos de la biosíntesis de colesterol, defectos de la oxidación de ácidos grasos y trastornos del metabolismo de las grasas, acidosis láctica, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, trastornos mitocondriales, trastornos de ácidos orgánicos, trastornos del ciclo de la urea, trastornos de la enfermedad de almacenamiento lisosomal.

35 Más preferiblemente, la presente descripción proporciona el ARNm modificado para su uso en un método para expresar un polipéptido o proteína biológicamente activo en un tejido *in vivo*, comprendiendo el método poner en contacto al paciente con una composición farmacéutica de acuerdo con una o más de las realizaciones anteriores o poner en contacto al paciente con el ARNm modificado según cualquiera de las realizaciones anteriores, donde la administración de la composición farmacéutica o del ARNm modificado resulta en una respuesta inmune innata reducida por parte del paciente en relación con un paciente, preferiblemente el mismo paciente, en contacto con la molécula de ARNm de tipo natural que codifica el mismo polipéptido o proteína. Opcionalmente, el nivel de expresión de ARNm *in vivo* se incrementa gracias al ARNm diana modificado en comparación con el ARNm de tipo natural.

45 Según otra realización, la presente descripción proporciona un ARNm modificado que codifica para al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo, donde el contenido en citidina de la región codificante del ARNm modificado es mayor que el contenido en citidina de la región codificante del ARNm de tipo natural que codifica el polipéptido o la proteína, permaneciendo la secuencia de aminoácidos codificada sin cambiar en comparación con la secuencia de tipo natural. En este contexto, es preferente que, si no hay citidina presente en ninguno de los al menos un codón que codifica el aminoácido, al menos un codón de la secuencia de tipo natural que codifica un ARNt relativamente raro en la célula se cambia por un codón que codifica un ARNt relativamente frecuente en la célula que porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La presente invención se describe mediante las figuras y ejemplos siguientes, que se usan solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. En base a la descripción y los ejemplos, también se incluyen en la invención otras realizaciones que son accesibles para el experto.

- 5 Figura 1: Secuencia de ARNm de tipo natural R873 que codifica para luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc), correspondiente a la SEQ ID NO: 1. El ARNm se transcribió *in vitro* a partir de un vector que contenía un promotor T7 seguido de una secuencia que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc (wt) y una secuencia poli(A) de 70 nucleótidos de adenosina (A70). Esta secuencia se usó posteriormente como secuencia diana para modular la inmunogenicidad y/o la capacidad inmunoestimuladora de acuerdo con el método de la invención.
- 10 Figura 2: Secuencia de ARNm enriquecida en G/C R875 obtenida mediante enriquecimiento en G/C que codifica solo para la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc), correspondiente a la SEQ ID NO: 2. R875 se obtuvo por enriquecimiento en G/C de la secuencia R873.
- Figura 3: Secuencia de ARNm enriquecida en C R2103 obtenida por enriquecimiento en G/C y posterior enriquecimiento en C que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc), correspondiente a la SEQ ID NO: 3. R2103 se obtuvo por enriquecimiento en C de la secuencia R873.
- 15 Figura 4: Secuencia de ARNm enriquecida en G/C R2349 que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc), correspondiente a la SEQ ID NO: 4. El ARNm se transcribió *in vitro* a partir de un vector que contiene un promotor T7 seguido de una secuencia enriquecida en G/C que codifica la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc (GC) III) y una secuencia poli(A) de 64 nucleótidos de adenosina.
- 20 Figura 5: Secuencia de ARNm enriquecida en C R2350 que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc), correspondiente a la SEQ ID NO: 5. La plantilla para la transcripción *in vitro* se obtuvo modificando el vector que comprende la secuencia enriquecida en G/C mediante reemplazo de la secuencia de codificación G/C-optimizada de PpLuc (GC)III (Figura 4) por una secuencia enriquecida en C. El ARNm obtenido de este vector por transcripción *in vitro* se denomina "PpLuc (GC) III - A64" (R2350).
- 25 Figura 6: Secuencia de ARNm enriquecida en G/C R2791 que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc), correspondiente a la SEQ ID NO: 6. El vector utilizado para la transcripción *in vitro* comprendía una 5'-TOP-UTR derivada de la proteína ribosómica 32L, seguida de una secuencia estabilizadora derivada de la 3'-UTR-albúmina, un tramo de 64 nucleótidos de adenosina (secuencia poli(A)), un tramo de 30 citidinas (secuencia poli(C)) y un tallo-bucle de histona.
- 30 Figura 7: Secuencia de ARNm enriquecida en C R2793 que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc), correspondiente a la SEQ ID NO: 7. El vector utilizado para la transcripción *in vitro* comprende una 5'-TOP-UTR derivada de la proteína ribosómica 32L, seguido de una secuencia estabilizadora derivada de 3'-UTR-albúmina, un tramo de 64 adenosinas (secuencia poli(A)), un tramo de 30 citidinas (secuencia poli(C)) y un tallo-bucle de histona.
- 35 Figura 8: Secreción de TNF α de PBMC tratadas con ARNm R2793 y R2791. Las PBMC humanas se trataron con 10 μ g/ml de ARNm enriquecido en GC o en C durante 20 horas y se determinó la concentración de TNF α en el sobrenadante mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 2. Como puede verse, el tratamiento con ARNm enriquecido en C (R2793) da como resultado una secreción de TNF α significativamente menor que el tratamiento con ARNm enriquecido con GC (R2791). La significación estadística se evaluó mediante la prueba de Mann Whitney ($p = 0,03$).
- 40 Figura 9: Actividad de luciferasa expresada por ARNm de tipo natural o modificado. Ambos ARN se transfectoron por separado en células HeLa y se midió la actividad de luciferasa (unidades relativas de luz, URL) 6 h, 24 h y 48 h después de la transfección como se describe en el Ejemplo 2.
- 45 (A) La actividad luciferasa del ARNm enriquecido con GC (R875) y el ARNm optimizado con C (R2103) fue comparable tanto en términos de nivel máximo como de cinética, lo que indica un nivel de expresión comparable de los ARNm transfectorados en función del tiempo.
- (B) La actividad luciferasa del ARNm enriquecido en GC (R875) fue mucho mayor que la del constructo de tipo natural (R873), lo que indica un nivel de expresión significativamente mayor del ARNm enriquecido en G/C modificado.
- 50 Figura 10: Relación dosis-respuesta para la secreción de TNF α de PBMC humanas tratadas con diferentes ARNm modificados. Las PBMC humanas se trataron con diferentes concentraciones de ARNm (40 y 20 μ g/ml) durante 20 horas. La concentración de TNF α como parámetro que indica la respuesta inmune provocada por el ARNm transfectorado en las PBMC inmunológicamente competentes se determinó mediante ELISA en los sobrenadantes como se describe en el Ejemplo 3. El tratamiento con ARNm optimizado en C produce menos secreción de TNF α que el tratamiento con ARNm optimizado en GC. Se muestra la media y el error estándar de la media de triplicados.
- 55 Figura 11: Relación dosis-respuesta para la secreción de IFN α de PBMC humanas tratadas con diversos ARNm modificados. Los PBMC humanos se trataron con diferentes concentraciones de ARNm (40 y 20 μ g/ml) como se indica durante 20 horas. La concentración de IFN α se determinó mediante ELISA en los sobrenadantes como se describe en el Ejemplo 3. La transfección de las PBMC con ARNm optimizado en C produce menos secreción de IFN α que la transfección con ARNm optimizado en GC. Se muestra la media y el error estándar de la media de triplicados.
- 60

Tabla 1: Lista de constructos de luciferasa utilizados para la producción de constructos de ARNm modificado enriquecido con G/C o C de tipo natural (R873).

Tabla 2: Resumen de la composición de nucleótidos y el uso de codones de los constructos utilizados en los presentes ejemplos.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos aquí, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología aquí utilizada tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la materia.

10

15

20

A continuación, se describirán los elementos de la presente descripción. Estos elementos se citan con realizaciones específicas; sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos y las realizaciones preferentes descritos de diversas maneras no deben interpretarse como limitativos de la presente descripción solo a las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción soporta y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferentes. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse como descritos por la descripción de la presente solicitud, a menos que el contexto indique lo contrario.

25

A lo largo de esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que el término "comprende" y variaciones tales como "comprendiendo" y "que comprende" implican la inclusión de un miembro, número entero o paso establecido, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, entero o paso no especificado. El término "consistir en" es una realización particular del término "comprender", en el que se excluye cualquier otro miembro, número entero o paso no especificado. En el contexto de la presente invención, el término "comprender" abarca el término "consistir en".

30

35

Los términos "un" y "una" y "el" y referencias similares utilizados en el contexto de la descripción (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique aquí lo contrario o se contradiga claramente en el contexto. La indicación aquí de rangos de valores solo pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango. A menos que se indique aquí lo contrario, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se mencionara individualmente en este documento. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como indicando ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta especificación. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de una invención anterior.

40

45

50

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la respuesta inmune frente a un ARNm diana que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activa puede modularse, es decir, reducirse, mediante el método inventivo para aumentar el contenido de citidina de la región codificante del ARNm. El método de la presente invención comprende la etapa de identificar una secuencia de tipo natural diana que codifica para al menos un péptido, polipéptido o proteína biológicamente activo. Como segunda etapa, se modifica la secuencia de tipo natural diana, donde al menos el 70% de los codones o al menos el 80% de los codones o, más preferiblemente, al menos el 90% o, con total preferencia, el 100% de los codones de tipo natural de la región de codificación que son optimizables para el contenido en citidina, se modifica de modo que el contenido en citidina global de la región del ARNm modificado que codifica el péptido, polipéptido o proteína se incrementa con respecto al contenido de citidina de la región de codificación del ARNm de tipo natural que codifica para el al menos un péptido, polipéptido o proteína. Mediante esa modificación, la secuencia de aminoácidos codificada por el ARNm modificado no cambia en comparación con la secuencia de tipo natural.

55

Debido a la degeneración natural del código genético, más de un codón puede codificar un aminoácido particular. En consecuencia, 18 de los 20 aminoácidos naturales están codificados por más de 1 codón (con Tryp y Met como excepción), por ejemplo por 2 codones (por ejemplo Cys, Asp, Glu), por tres codones (por ejemplo Ile), por 4 codones (por ejemplo Al, Gly, Pro) o por 6 codones (por ejemplo Leu, Arg, Ser). Sin embargo, no todos los codones que codifican el mismo aminoácido se utilizan con la misma frecuencia en *condiciones in*

vivo. Dependiendo de cada organismo, se establece un perfil típico de uso de codones. El uso de secuencias de ácido nucleico con codones optimizados ya ha sido descrito (véase, por ejemplo, Galiger et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(7): 3046-3059; Wei et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(13): 9549-9562).

- 5 El término "codón optimizable para el contenido en citidina" tal como se usa dentro del contexto de la presente descripción se refiere a codones que exhiben un número menor de citidinas que otros codones que codifican el mismo aminoácido. Así, cualquier codón de tipo natural que puede reemplazarse por otro codón que codifica para el mismo aminoácido y que tenga un mayor número de citidinas dentro de ese codón se considera optimizable en citidina (optimizable en C). Cualquiera de tales sustituciones de un codón de tipo natural optimizable en C por el codón optimizado en C específico dentro de una región de codificación de tipo natural aumenta su contenido general en C y refleja una secuencia de ARNm modificada enriquecida en C. Una secuencia de ARNm maximizada en C contiene codones optimizados en C para todos los codones potencialmente optimizables en C. En consecuencia, el 100% o la totalidad de los codones optimizables en C teóricamente reemplazables se reemplazan en tales condiciones por codones optimizados en C en toda la longitud de la región de codificación.

- 20 Dentro del contexto de la presente invención, la célula preferente es una célula de mamífero, más preferiblemente una célula humana. La frecuencia de uso de codones para los codones individuales se proporciona en la Tabla 2 de los ejemplos adjuntos. El término "región de codificación" tal como se usa en la presente descripción, es decir, la región en la que se incrementa el contenido en citidina mediante el uso de codones optimizados en contenido de citidina, corresponde a esa porción de un ARN, tal como, por ejemplo, un ARNm, que codifica un péptido, polipéptido o proteína. La región de codificación del ARNm puede estar limitada por las cinco regiones principales no traducidas (5'-UTR) y las tres regiones principales no traducidas (3'-UTR).

- 25 En la presente descripción, los codones optimizables en su contenido en citidina son codones que contienen un número menor de citidinas que otros codones que codifican el mismo aminoácido. Cualquiera de los codones GCG, GCA, GCU codifica el aminoácido Ala, que puede intercambiarse por el codón GCC que codifica el mismo aminoácido, y/o el codón UGU que codifica Cys puede intercambiarse por el codón UGC que codifica el mismo aminoácido, y/o el codón GAU que codifica para Asp puede intercambiarse por el codón GAC que codifica el mismo aminoácido, y/o el codón que UUU que codifica para Phe puede intercambiarse por el codón UUC que codifica el mismo aminoácido, y/o cualquiera de los codones GGG, GGA, GGU que codifican Gly pueden intercambiarse por el codón GGC que codifica el mismo aminoácido, y/o el codón CAU que codifica His pueden intercambiarse por el codón CAC que codifica el mismo aminoácido, y/o cualquiera de los codones AUA, AUU que codifican para Ile puede intercambiarse por el codón AUC, y/o cualquiera de los codones UUG, UUA, CUG, CUA, CUU que codifican para Leu puede intercambiarse por el codón CUC que codifica el mismo aminoácido y/o el codón AAU que codifica Asn puede intercambiarse por el codón AAC que codifica el mismo aminoácido, y/o cualquiera de los codones CCG, CCA, CCU que codifican Pro pueden intercambiarse por el codón CCC que codifica el mismo aminoácido, y/o cualquiera de los codones AGG, AGA, CGG, CGA, CGU que codifican Arg pueden intercambiarse por el codón CGC que codifica el mismo aminoácido, y/o cualquiera de los codones AGU, AGC, UCG, UCA, UCU que codifican Ser pueden intercambiarse por el codón UCC que codifica el mismo aminoácido, y/o cualquiera de los codones ACG, ACA, ACU que codifican para Thr puede intercambiarse por el codón ACC que codifica el mismo aminoácido, y/o cualquiera de los codones GUG, GUA, GUU que codifican Val puede intercambiarse por el codón GUC que codifica el mismo aminoácido, y/o el codón UAU que codifica para Tyr puede intercambiarse por el codón UAC que codifica el mismo aminoácido.

- 55 En cualquiera de los casos anteriores, el número de citidinas se incrementa en 1 por cada codón intercambiado. El intercambio de todos los codones no optimizados en C (correspondientes a los codones optimizables en C) de la región de codificación resulta en una secuencia de codificación maximizada en C. De acuerdo con la invención, al menos el 70% de los codones no optimizados en C se reemplazan por codones optimizados en C de la secuencia de tipo natural se reemplazan por codones optimizados en C, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, dentro de la codificación región.

Puede ser preferente que para algunos aminoácidos el porcentaje de codones optimizados en C reemplazados por codones optimizados en C sea inferior al 70%, mientras que para otros aminoácidos el porcentaje de codones reemplazados sea superior al 70% para cumplir con el porcentaje general de optimización-C de al

menos el 70% de todos los codones de tipo natural optimizables en C de la región de codificación. Preferiblemente, en los ARNm C-optimizados de la invención, al menos el 50% de los codones de tipo natural C-optimizables para cualquier aminoácido dado se reemplazan por codones C-optimizados, por ejemplo cualquier ARNm enriquecido en C modificado contiene preferiblemente al menos un 50% de codones optimizados en C en las posiciones de los codones de tipo natural optimizables en C que codifican cualquiera de los aminoácidos mencionados anteriormente Ala, Cys, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val y Tyr, preferiblemente al menos 60%.

Según el método de la invención, los codones que codifican aminoácidos que no son optimizables para el contenido en citidina y que, sin embargo, están codificados por al menos dos codones, pueden usarse sin ningún proceso de selección adicional. Sin embargo, en una realización preferente de la invención, el codón de la secuencia de tipo natural que codifica un ARNt relativamente raro en la célula, por ejemplo una célula humana, se intercambia por un codón que codifica un ARNt relativamente frecuente en la célula, codificando ambos el mismo aminoácido. Así, el codón GAA relativamente raro que codifica Glu puede intercambiarse por el codón GAG relativamente frecuente que codifica el mismo aminoácido y/o el codón AAA relativamente raro que codifica Lys puede intercambiarse por el codón AAG relativamente frecuente que codifica para el mismo aminoácido y/o el codón CAA relativamente raro que codifica Gln se intercambia por el codón CAG relativamente frecuente que codifica el mismo aminoácido.

De acuerdo con la presente descripción, los aminoácidos Met (AUG) y Trp (UGG), que están codificados por un solo codón en cada caso, permanecen sin cambios. Los codones de parada no están optimizados para el contenido en citidina, sin embargo, los codones de parada relativamente raros ámbar, ocre (UAA, UAG) pueden intercambiarse por el codón de parada ópalo relativamente frecuente (UGA).

Obviamente, las sustituciones citadas anteriormente pueden usarse individualmente, pero también en todas las combinaciones posibles para optimizar el contenido en citidina del ARNm modificado en comparación con la secuencia de ARNm de tipo natural.

Así, la región del ARNm modificado que codifica el polipéptido o la proteína cambia en comparación con la región codificante del polipéptido o proteína del ARNm de tipo natural de manera que un aminoácido codificado por al menos dos o más codones, de los cuales uno comprende una citidina adicional, dicho codón puede intercambiarse por el codón C-optimizado que comprende una citidina adicional, por lo que el aminoácido no se altera en comparación con la secuencia de tipo natural.

En una realización preferente, el ARNm modificado tiene, además de un mayor contenido en C como se definió anteriormente, un mayor contenido en guanosina (contenido en G). En analogía con las modificaciones descritas anteriormente, que dan como resultado un mayor contenido en C, pueden introducirse adicionalmente las modificaciones correspondientes, dando como resultado un mayor contenido en G del ARNm modificado. Allí, un codón en el ARNm que es optimizable en su contenido en guanosina se reemplaza por un codón con un mayor contenido en guanosina. En general, las definiciones y explicaciones proporcionadas anteriormente con respecto a los codones optimizables en citidina y al contenido aumentado de C se aplican a codones optimizables con guanosina y al contenido en G de manera análoga. En el contexto de la presente descripción, los codones optimizables en guanosina son codones que contienen un número menor de guanosinas que otros codones que codifican el mismo aminoácido.

De acuerdo con el método aquí descrito, el ARNm modificado se modifica de modo que al menos un 70%, 80% o 90%, preferiblemente al menos un 70% de los codones, que no son elegibles para la optimización en C, pero que son optimizables para el contenido en guanosina, se reemplazan por un codón con un contenido en guanosina más alto, aumentando así el contenido en G del ARNm modificado.

Alternativamente, el ARNm modificado se puede obtener mediante el siguiente enfoque: como primer paso, se puede aumentar su contenido en G/C, por ejemplo mediante la sustitución de codones de tipo natural que tienen un contenido más bajo de nucleótidos G y C. Al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, o con total preferencia el 100% de todos los codones de tipo natural que son optimizables en G/C, pueden reemplazarse con ese enfoque. La optimización de G/C se lleva a cabo como se describe en el documento WO2002098443 A2. Como segundo paso, el enriquecimiento o maximización de G/C es seguido por un paso de mayor optimización de C. Por consiguiente, los codones optimizados para G/C y/o los codones inalterados dentro de la región de codificación se optimizan en C seleccionando codones que tienen un mayor número de citidinas en comparación con los codones que se producen en el ARNm enriquecido en G/C. Al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, con total preferencia el 100% de esos codones optimizados y no alterados por GC, que son optimizables en C, se reemplazan en ese segundo paso. El segundo paso coincide con el primer paso (como se describió anteriormente para la realización que comienza con el enriquecimiento en C), pero comienza con un patrón de codón que es diferente del patrón de codón de tipo natural. Como resultado, la maximización de G/C y la

posterior maximización de C en toda la longitud de la región de codificación generalmente da como resultado la misma secuencia de codificación que la realización alternativa que comienza con la maximización de C y la maximización de G posterior como se describió anteriormente.

5 De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, el contenido de citidina de la región de codificación del ARNm diana que codifica el polipéptido o la proteína se modifica de manera que se logra un contenido máximo de citidina mediante la introducción de codones que codifican ARNt que son relativamente frecuentes dentro de esa célula particular, tal como una célula de mamífero, más específicamente una célula humana.

10 De acuerdo con el método de la invención para proporcionar un ARNm con una inmunogenicidad y/o capacidad estimuladora reducida, el contenido en citidina del ARNm modificado que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo se incrementa en al menos 1 - 15%, preferiblemente 5 - 10%, preferiblemente al menos 10 - 15%, preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 12,5%, más específicamente al menos 15% en comparación con el contenido en citidina de la secuencia de tipo natural.

15 Así, de acuerdo con la presente invención, es particularmente preferente aumentar el contenido de citidina del ARNm modificado en la cantidad máxima posible, en particular en la región de codificación para el al menos un péptido o polipéptido, en comparación con la secuencia de tipo natural.

20 Preferiblemente, los nucleósidos, que se introducen en el ARNm modificado para aumentar el contenido en G y/o C se seleccionan del grupo consistente en adenosina, citidina, guanosina y uridina. Preferiblemente, el ARNm modificado se modifica solo con respecto a su contenido en G y/o C como se describe aquí, donde la citidina o la guanosina (no modificada) reemplaza otros nucleósidos para aumentar el contenido en G y/o C como se describe aquí. Por tanto, no se usan análogos de los nucleósidos adenosina, citidina, guanosina y uridina, preferiblemente no se usan análogos de nucleósidos o ribonucleósidos como se definen aquí.

25 Preferiblemente, el ARNm modificado no se modifica con una modificación química en la posición 4-, 5- o 6- de la base pirimidínica de los nucleósidos citidina y/o uridina; una modificación química en la posición 2-, 6-, 7- u 8- de la base púrica de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosina; y/o una modificación química en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos de adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina.

Más preferiblemente, el ARNm modificado no se modifica con una modificación química en la posición 2-, 6-, 7- u 8- de la base purina de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosina; y no con una modificación química en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina.

30 Incluso más preferiblemente, el ARNm modificado no se modifica con una modificación química en la posición 4-, 5- o 6- de la base pirimidina de los nucleósidos citidina y/o uridina; ni con una modificación química en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina.

35 Preferiblemente, el ARNm modificado no se modifica con una modificación química en la posición 5- o 6- de la base pirimidina de los nucleósidos citidina y/o uridina, seleccionándose la modificación química preferiblemente del grupo consistente en 4-tio, 5-yodo-/(5-I-), 5-bromo-/(5-Br-), 5-aminoalil-, 5-fluor-/(5-F-), 5-hidroxi-, 5-hidro-/(5-H-), 5-nitro-, 5-propinil-/(5-(C-C-CH₃)-), 5-metil-, 5-metil-2-tio-, 5-formil-, 5-hidroximetil-, 5-metoxi-, 5-metil oxiacetato, ácido 5-oxiacético-, 5-carboxihidroximetil-, metil 5-(carboxihidroximetil)pirimidina éster, 5-metoxicarbonilmetil-, 5-metoxicarbonilmetil-2-tio, 5-aminometil-, 5-aminometil-2-tio-, 5-aminometil-2-selenio-, 5-metilaminometil-, 5-carbamoilmetil-, 5-carboximetilaminometil-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-, 5-carboximetil, 40 5-metildihidro-, 5-taurinometil-, 5-taurinometil-2-tiouridina, 5-isopentenilaminometil-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-, 5-aminopropil-/(5-(C₃H₆NH₃)-), 5-metoxietoximetil-/(5-(CH₂-O-C₂H₄-O-CH₃)-) y 6-aza-.

Además, el ARNm modificado no se modifica con una modificación química en la posición 2-, 6-, 7- u 8- de la base purina de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosina, donde la modificación química se selecciona preferiblemente de grupo consistente en 2-amino-, 7-deaza-, 8-aza- y 8-azido-.

45 Además o alternativamente, el ARNm modificado no se modifica con una modificación química en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina cuando se incorpora en la secuencia de ARN, donde tales modificaciones químicas en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina se pueden seleccionar del grupo consistente en 2'-desoxi-, 2'-amino-2'-desoxi-/2' -amino-, 2'-fluoro-2'-desoxi-/2'-fluor- y 2'-O-metil-2'-desoxi-/2'-O-metil-.

50 Preferiblemente, el ARNm modificado no se modifica con una modificación química en la posición 4-, 5- o 6- de la base pirimidina de los nucleósidos citidina y/o uridina y en la posición 2' del azúcar ribosa como se definió anteriormente, seleccionándose la modificación química preferiblemente del grupo consistente en 4-tio-2'-desoxi-, 4-tio-2'-amino-, 4-tio-2'-fluor-, 4-tio-2'-O-metil-, 5-iodo-2'-desoxi-, 5-iodo-2'-amino-, 5-iodo-2'-fluor-, 5-

iodo-2'-O-metil-, 5-bromo-2'-desoxi-, 5-bromo-2'-amino-, 5-bromo-2'-fluor-, 5-bromo-2'-O-metil-, 5-aminoalil-2'-
 desoxi-, 5-aminoalil-2'-amino-, 5-aminoalil-2'-fluor-, 5-aminoalil-2'-O-metil-, 5-fluor-2'-desoxi-, 5-fluor-2'-amino-,
 5-fluor-2'-fluor-, 5-fluor-2'-O-metil-, 5-hidroxi-2'-desoxi-, 5-hidroxi-2'-amino-, 5-hidroxi-2'-fluor-, 5-hidroxi-2'-O-
 5 metil-, 5-hidro-2'-desoxi-, 5-hidro-2'-amino-, 5-hidro-2'-fluor-, 5-hidro-2'-O-metil-, 5-nitro-2'-desoxi-, 5-nitro-2'-
 5 amino-, 5-nitro-2'-fluor-, 5-nitro-2'-O-metil-, 5-propinil-2'-desoxi-, 5-propinil-2'-amino-, 5-propinil-2'-fluor-, 5-
 propinil-2'-O-metil-, 5-metil-2'-desoxi-, 5-metil-2'-amino-, 5-metil-2'-fluor-, 5-metil-2'-O-metil- (5,2'-O-dimetil)-, 5-
 10 metil-2-tio-2'-desoxi-, 5-metil-2-tio-2'-amino-, 5-metil-2-tio-2'-fluor-, 5-metil-2-tio-2'-O-metil-, 5-formil-2'-desoxi-,
 5-formil-2'-amino-, 5-formil-2'-fluor-, 5-formil-2'-O-metil-, 5-hidroximetil-2'-desoxi-, 5-hidroximetil-2'-amino-, 5-
 hidroximetil-2'-fluor-, 5-hidroximetil-2'-O-metil-, 5-metoxi-2'-desoxi-, 5-metoxi-2'-amino-, 5-metoxi-2'-fluor-, 5-
 10 metoxi-2'-O-metil-, 5-oxiacetato de metilo-2'-desoxi-, 5-oxiacetato de metilo-2'-amino-, 5-oxiacetato de metilo-
 2'-fluor-, 5-oxiacetato de metilo-2'-O-metil-, 5-oxiacético-2'-desoxi-, 5-oxiacético-2'-amino-, 5-oxiacético-2'-
 fluor-, 5-oxiacético-2'-O-metil-, 5-carboxihidroximetil-2'-desoxi-, 5-carboxihidroximetil-2'-amino-, 5-
 carboxihidroximetil-2'-fluor-, 5-carboxihidroximetil-2'-O-metil-, 5-(carboxihidroximetil)pirimidina metil éster-2'-
 desoxi-, 5-(carboxihidroximetil)pirimidina metil éster-2'-amino-, 5-(carboxihidroximetil)pirimidina metil éster-2'-
 15 fluor-, 5-(carboxihidroximetil)pirimidina metil éster-2'-O-metil-, 5-metoxicarbonilmetil-2'-desoxi-, 5-
 metoxicarbonilmetil-2'-amino-, 5-metoxicarbonilmetil-2'-fluor-, 5-metoxicarbonilmetil-2'-O-metil-, 5-
 metoxicarbonilmetil-2-tio-2'-desoxi-, 5-metoxicarbonilmetil-2-tio-2'-amino-, 5-metoxicarbonilmetil-2-tio 2'-fluor-,
 5-metoxicarbonilmetil-2-tio-2'-O-metil-, 5-aminometil-2'-desoxi-, 5-aminometil-2'-amino-, 5-aminometil-2'-fluor-,
 5-aminometil-2'-O-metil-, 5-aminometil-2-tio-2'-desoxi-, 5-aminometil-2-tio-2'-amino-, 5-aminometil-2-tio-2'-
 20 fluor-, 5-aminometil-2-tio-2'-O-metil-, 5-aminometil-2-selenio-2'-desoxi-, 5-aminometil-2-selenio-2'-amino-, 5-
 aminometil-2-selenio-2'-fluor-, 5-aminometil-2-selenio-2'-O-metil-, 5-metilaminometil-2'-desoxi-, 5-
 metilaminometil-2'-amino-, 5-metilaminometil-2'-fluor-, 5-metilaminometil-2'-O-metil-, 5-carbamoilmetil-2'-
 desoxi-, 5-carbamoilmetil-2'-amino-, 5-carbamoilmetil-2'-fluor-, 5-carbamoilmetil-2'-O-metil-, 5-
 25 carboximetilaminometil-2'-desoxi-, 5-carboximetilaminometil-2'-amino-, 5-carboximetilaminometil-2'-fluor-, 5-
 carboximetilaminometil-2'-O-metil-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-2'-desoxi-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-
 2'-amino-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-2'-fluor-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-2'-O-metil-, 5-carboximetil-2'-
 desoxi-, 5-carboximetil-2'-amino-, 5-carboximetil-2'-fluor-, 5-carboximetil-2'-O-metil-, 5-metildihidro-2'-desoxi-,
 5-metildihidro-2'-amino-, 5-metildihidro-2'-fluor-, 5-metildihidro-2'-O-metil-, 5-taurinometil-2'-desoxi-, 5-
 30 taurinometil-2'-amino-, 5-taurinometil-2'-fluor-, 5-taurinometil-2'-O-metil-, 5-taurinometil-2-tiouridina-2'-desoxi-,
 5-taurinometil-2-tiouridina-2'-amino-, 5-taurinometil-2-tiouridina-2'-fluor-, 5-taurinometil-2-tiouridina-2'-O-metil-,
 5-isopentenilaminometil-2'-desoxi-, 5-isopentenilaminometil-2'-amino-, 5-isopentenilaminometil-2'-fluor-, 5-
 isopentenilaminometil-2'-O-metil-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-2'-desoxi-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-2'-
 amino-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-2'-fluor-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-2'-O-metil-, 5-aminopropil-2'-
 desoxi-, 5-aminopropil-2'-amino-, 5-aminopropil-2'-fluor-, 5-aminopropil-2'-O-metil-, 5-metoxi-etoxi-metil-2'-
 35 desoxi-, 5-metoxi-etoxi-metil-2'-amino-, 5-metoxi-etoxi-metil-2'-fluor-, 5-metoxi-etoxi-metil-2'-O-metil-, 6-aza-2'-
 desoxi-, 6-aza-2'-amino-, 6-aza-2'-fluor- y 6-aza-2'-O-metil-.

Más preferiblemente, el ARNm modificado no se modifica con una modificación química en la posición 2-, 6-,
 7- u 8- de la base purina de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosina y en la posición 2' del azúcar
 40 ribosa como se definió anteriormente, seleccionándose la modificación química del grupo consistente en 2-
 amino-2'-desoxi-, 2-amino-2'-amino-, 2-amino-2'-fluor-, 2-amino-2'-O-metil-, 7-deaza-2'-desoxi-, 7-deaza-2'-
 amino-, 7-deaza-2'-fluor-, 7-deaza-2'-O-metil-, 8-aza-2'-desoxi-, 8-aza-2'-amino-, 8-aza-2'-fluor-, 8-aza-2'-O-
 metil-, 8-azido-2'-desoxi-, 8-azido-2'-amino-, 8-azido-2'-fluor- y 8-azido-2'-O-metil-.

De acuerdo con la presente descripción, el término polipéptido o proteína se refiere a un péptido que tiene al
 45 menos 20 y preferiblemente más de 50 aminoácidos. Puede referirse a una proteína monomérica o multimérica.
 Se entiende que un péptido contiene típicamente menos de 20 aminoácidos.

De acuerdo con la primera realización aquí descrita, el término "péptido, polipéptido o proteína biológicamente
 activo" se refiere a un polipéptido o proteína que tiene la capacidad de realizar una o más funciones biológicas
 o un conjunto de actividades normalmente atribuidas al polipéptido en un contexto biológico. La actividad
 50 biológica puede ser, por ejemplo, una actividad de unión a receptor, por ejemplo como un ligando, una actividad
 catalítica, una actividad transportadora o una actividad inducida en proteínas de la estructura celular o
 modificaciones de proteínas celulares, por ejemplo fosforilación. La actividad biológica del péptido, polipéptido
 o proteína codificada por el ARNm de tipo natural o modificado aquí descrito puede determinarse mediante
 cualquier método disponible en la técnica. Por ejemplo, la actividad biológica de los miembros de la familia de
 55 proteínas interferón puede determinarse mediante cualquiera de varios métodos, incluida su interacción con
 anticuerpos específicos de interferón, su capacidad para aumentar la resistencia a la infección viral o su
 capacidad para modular la transcripción de dianas genéticas reguladas por interferón.

En una realización preferente, el péptido, polipéptido o proteína biológicamente activo no comprende el
 producto génico de un gen reporter o un gen marcador. En el contexto de la presente descripción, el ARNm
 60 preferiblemente no codifica, por ejemplo, luciferasa; proteína verde fluorescente (GFP) y sus variantes (como
 eGFP, RFP o BFP); α -globina; hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT); β -galactosidasa;

galactocquinasa; fosfatasa alcalina; fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP)) o un gen de resistencia (como un gen de resistencia frente a neomicina, puromicina, higromicina y zeocina). En una realización preferente, el ARNm no codifica luciferasa. En otra realización, el ARNm no codifica GFP o una variante del mismo.

- 5 En otra realización preferente, el péptido, polipéptido o proteína biológicamente activo no comprende una proteína (o un fragmento de una proteína) derivada de un virus, preferiblemente de un virus que pertenece a la familia de Orthomyxoviridae. Preferiblemente, el ARNm no codifica una proteína que se deriva de un virus de la gripe, más preferiblemente un virus de la gripe A. Preferiblemente, el ARNm no codifica una proteína de la gripe A seleccionada del grupo consistente en hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP),
 10 proteína de matriz M1, proteína de matriz M2, NS1, NS2 (NEP: proteína de exportación nuclear), PA, PB1 (polimerasa básica 1), PB1-F2 y PB2. En otra realización preferente, el ARNm no codifica ovoalbúmina (OVA) o un fragmento de la misma. Preferiblemente, el ARNm no codifica una proteína de gripe A u ovoalbúmina.

- 15 Mediante el método según la invención, por una parte se logra un equilibrio óptimo de mayor estabilidad de ARNm y, por otra parte, propiedades inmunoestimuladoras reducidas. El mayor contenido en C del ARNm modificado reduce la inmunogenicidad y/o la capacidad inmunoestimuladora del ARNm, mientras que el mayor contenido en C y G contribuye a una mayor estabilidad del ARNm. Mayor estabilidad de ARNm significa, por ejemplo, mayor estabilidad funcional *in vivo*, que resulta en un mayor nivel de proteína expresada con el tiempo. Por consiguiente, el AUC *in vivo* (área bajo la curva) de proteína detectable tras la administración de ARNm aumenta significativamente para el ARNm modificado en comparación con su equivalente de tipo natural.
 20 Simultáneamente, se evoca una respuesta inmune reducida en el paciente (como se determina, por ejemplo, por cantidades reducidas de citocinas secretadas tras la administración de ARNm). El nivel de expresión de citocinas (secreción), por ejemplo TNF- α e IFN- α (por ejemplo, por PBMC) se reduce en al menos un 20%, preferiblemente en al menos un 40%, en comparación con la respuesta inmune desencadenada por el equivalente de tipo natural. Tal reducción es medible en condiciones *in vivo* e *in vitro*.

- 25 De acuerdo con el método de la presente invención, el índice de adaptación del codón del ARNm diana modificado que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo se incrementa en al menos 0,05 – 0,5, o en al menos 0,1 – 0,4, o en al menos 0,2 – 0,3, o en al menos 0,075 – 0,2, o en al menos 0,1 – 0,2, o al menos en 0,05, o al menos en 0,1, o al menos en 0,2, preferiblemente en al menos 0,125, más preferiblemente al menos 0,15, en comparación con el CAI del ARNm de tipo natural.

- 30 El Índice de Adaptación de Codones (CAI) es la técnica más extendida para analizar el sesgo de uso de codones. El CAI proporciona una indicación del nivel de expresión génica bajo el supuesto de que hay una selección de traducción para optimizar las secuencias génicas de acuerdo con sus niveles de expresión.

- El índice de adaptación de codones como se usa en la presente descripción puede calcularse de acuerdo con el método publicado por Sharp y Li (Nucleic Acids Res. 1987, 11 de febrero; 15(3): 1281-95). Las soluciones
 35 implementadas por software para el cálculo del CAI también se conocen en la técnica anterior, por ejemplo "The CAI Analyzer Package" (Ramazotti et al, In Silico Biol. 2007; 7(4-5): 507-26) y, por tanto, están fácilmente disponibles para el experto. CAI se define simplemente como la media geométrica del peso asociado a cada codón a lo largo de la secuencia del gen (medido en codones). Para cada aminoácido, el peso de cada uno de sus codones, en CAI, se calcula como la relación entre la frecuencia observada del codón y la frecuencia del codón sinónimo para ese aminoácido. El CAI utiliza un conjunto de referencia de genes altamente expresados de una especie para determinar el mérito relativo de cada codón para calcular una puntuación para un gen a partir de la frecuencia de uso de todos los codones en dicho gen. Este índice es útil para predecir el nivel de expresión de un gen e indica el éxito probable de la expresión del gen heterólogo en un sistema celular dado.
 40

- Dentro del alcance de la presente descripción, el término índice de adaptación de codones (CAI) como se usa
 45 aquí se refiere a la frecuencia de uso de codones de los genes que codifican al menos un polipéptido o proteína. La adaptación del codón es la adaptación de los codones de un marco de lectura abierto a los codones sinónimos preferidos en genes humanos/mamíferos evitando a la vez la introducción de funciones de secuencia secundaria no deseadas que impiden la expresión de los marcos de lectura abiertos resultantes.

- Dentro del contexto de la presente descripción, una puntuación CAI de 1 significa que se usa el codón óptimo para cada aminoácido en cada posición de codón. Por tanto, de acuerdo con los métodos de la presente
 50 invención, la región de codificación del ARNm tiene un CAI que es mayor que el CAI de la secuencia de codificación de tipo natural correspondiente y el CAI del ARNm modificado está suficientemente cerca de 1, al menos 0,6, más preferiblemente al menos 0,7, más preferiblemente al menos 0,8 y más preferiblemente al menos 0,9, de modo que se logra el nivel deseado de expresión del al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo. En consecuencia, el CAI del ARNm modificado es al menos mayor en 0,05 – 0,5, o al
 55 menos mayor en 0,1 – 0,4, o al menos mayor en 0,2 – 0,3, o al menos mayor en 0,075 – 0,2, o al menos mayor en 0,1 – 0,2, o al menos mayor en 0,05, o al menos mayor en 0,1, o al menos mayor en 0,2, preferiblemente al

menos mayor en 0,125, más preferiblemente al menos mayor en 0,15, que el CAI de la región de ARNm de tipo natural que codifica el al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo.

5 También se describe aquí un ARNm modificado que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo, que se puede obtener o se obtiene mediante al menos una o más realizaciones del método inventivo de la presente invención y donde el ARNm modificado se caracteriza por una inmunogenicidad y/o capacidad de inmunostimulación reducida en comparación con el ARNm de tipo natural y también puede caracterizarse por una mayor estabilidad, en particular una mayor estabilidad funcional, en comparación con el equivalente de tipo natural.

10 En una realización especialmente preferente de la presente invención, el ARNm obtenible puede someterse además a una etapa de determinación de la inmunogenicidad y/o de la capacidad inmunostimuladora del ARNm modificado de la invención. Tal paso comprende, por ejemplo, sub-pasos *in vitro* de transfectar células competentes, por ejemplo PBMC, con el ARNm modificado de acuerdo con una o más realizaciones del método inventivo, cultivar las células, por ejemplo durante 8 h - 24 h, preferiblemente durante 12 h - 48 h, preferiblemente durante 18 h - 24 h, preferiblemente durante 24 - 48 h, preferiblemente durante al menos 12
15 horas, preferiblemente durante al menos 18 h, más preferiblemente durante al menos 20 h, y determinar la cantidad de citocinas proinflamatorias en el sobrenadante celular. La cantidad de citocinas proinflamatorias presentes en el sobrenadante de las células transfectadas con el ARNm modificado aquí descrito se compara con la cantidad de citocinas proinflamatorias presentes en el sobrenadante de células transfectadas con el ARNm equivalente de tipo natural.

20 Técnicas apropiadas para determinar la inmunogenicidad y/o la capacidad inmunostimuladora de un ácido nucleico, tal como la de, por ejemplo, los ARNm modificados aquí descritos, son conocidas en la técnica y están fácilmente disponibles para los expertos (Robbins et al., 2009. Oligonucleotides 19(2):89-102). La naturaleza y el alcance de la respuesta de las citocinas al ARN depende de varios factores, incluyendo el momento, el tipo de célula, el vehículo de suministro y la vía de administración. La ausencia de inmunostimulación en un solo punto de tiempo para una sola citocina no demuestra necesariamente la ausencia de inmunostimulación en general, de modo que puede ser necesaria la evaluación de varias respuestas de citocina en múltiples puntos de tiempo. Están disponibles comercialmente anticuerpos y kits ELISA para la determinación de interferones (por ejemplo IFN α e IFN β) y diversas citocinas proinflamatorias, por ejemplo TNF α , TGF β , IL-1 e IL-6.

30 Si se deseara llevar a cabo estudios *in vivo* para analizar IFN α y/o citocinas proinflamatorias adecuadas, por ejemplo TNF α e IL-6, su presencia en el plasma de animales tratados puede usarse para controlar la activación sistémica de la respuesta inmune. La medida de la respuesta inmune en un momento apropiado después de la administración de ARNm es crítica para una evaluación válida. La administración sistémica de formulaciones de ARNm a ratones conduce a una elevación detectable de las citocinas séricas en 1 a 2 horas, dependiendo del tipo de vehículo de suministro y la citocina de interés. Típicamente, el aumento de los niveles de citocinas en el suero es transitorio y puede disminuir nuevamente después de 12 a 24 horas de tratamiento. Por ejemplo, a los ratones se les puede inyectar ARNm complejo y se pueden medir los niveles séricos de, por ejemplo, IFN α , TNF α e IL-6, 6 horas después de la inyección utilizando ensayos ELISA adecuados (Kariko et al., 2012. Mol. Ther. 20(5):948-53).

40 Para estudios *in vitro*, se puede emplear un panel de citocinas similar para evaluar la estimulación de cultivos de células inmunes primarias después del tratamiento con el ARNm aquí descrito. La secreción de citocinas depende del tipo de célula y, por tanto, es posible que se requieran analizar diversas citocinas. La evaluación de la respuesta de las citocinas de cultivos celulares *in vitro* es menos crítica con el tiempo en comparación con los estudios *in vivo* debido a que las citocinas secretadas tienden a acumularse en el sobrenadante del cultivo celular. Por tanto, la medida de citocinas en un único punto de tiempo, como entre 8h - 24h, o entre 16
45 - 24 h, o entre 12h - 48h, o entre 18h - 24h, o entre 24 - 48h, preferiblemente 12 horas, preferiblemente 18h, más preferiblemente 20 h después de la administración de ARNm, por ejemplo el tratamiento con el ARNm modificado como se describe aquí a menudo es suficiente para detectar una respuesta inmune. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de sangre total humana *in vitro* (WBA) o un ensayo basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para evaluar la respuesta a las citocinas obtenida por el tratamiento con moléculas de ARNm modificadas de la invención (Coch et al., 2013. PLoS One 8(8):e71057), como se ilustra en los ejemplos adjuntos, en particular en el Ejemplo 2. Alternativamente, Pueden aislarse células dendríticas mieloides primarias y plasmacitoides (pDC) de sangre periférica usando kits de aislamiento celular comerciales y tratarse con el ARNm de la invención, tal como el ARNm modificado aquí descrito, en un cultivo celular. Después de 8 a 20 horas de incubación, los niveles de citocinas (por ejemplo IFN α , TNF α y/o IL-8) en el medio
50 de cultivo celular se pueden determinar con ensayos ELISA. Además, el estado de activación de las DC puede analizarse midiendo la expresión en la superficie celular de los marcadores de activación (por ejemplo CD80, CD83, CD86 y MHC clase II) por citometría de flujo (Kariko et al., 2005. Immunity 23 (2): 165-75).

Alternativamente, puede evaluarse en células la activación del sensor de ARN citosólico RIG-I tratando las células con el ARNm modificado aquí descrito, generando lisados celulares, separando proteínas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y ensayando la fosforilación de PKR por transferencia Western. La fosforilación de PKR en la posición 446 de la treonina (pT446) es necesaria para activar de PKR y, por tanto, representa un marcador de activación. Además, la fosforilación de la subunidad alfa del factor de iniciación de la síntesis de proteínas eucariotas 2 (EIF2-alfa), que es un sustrato fisiológico para PKR, se puede evaluar con un anticuerpo dirigido a la serina fosforilada en la posición 51 (pS51) (Anderson et al., 2010. *Nucleic Acids Res.* 38(17):5884-92).

Se puede comprobar la activación de la 2'-5'-oligoadenilato-sintetasa (OAS) por ARN en un ensayo enzimático. El ensayo para OAS se puede llevar a cabo midiendo los productos 2-5(A). Usando [³H]ATP en la reacción de sintetasa, la conversión de 2-5 (A) se mide por digestión de los productos de reacción con fosfatasa alcalina. Esto convierte [³H]2-5 (A) en el núcleo (A2'p)_nA, que está cargado negativamente y se une al papel de celulosa-DEAE. El [³H]ATP residual se convierte en adenosina, que no está cargada y se elimina por lavado. Este ensayo es adecuado para medir la actividad de OAS en extractos de células crudas, así como la de OAS purificada (Sharp et al., 1999. *Virology* 257 (2): 303-13; Anderson et al., 2011. *Nucleic Acids Res.* 39(21):9329-38).

Típicamente, el ARNm modificado obtenible de acuerdo con una o más realizaciones del método de la invención se caracteriza por una menor afinidad a uno o más de TLR3, TLR7, TLR8, MDA5, RIG-I, LGP2 o 2'-5'-oligoadenilato-sintetasa en comparación con el ARNm de tipo natural que codifica el mismo péptido, polipéptido o proteína.

El término "afinidad" tal como se usa aquí se refiere a la capacidad de un ARN, por ejemplo el ARNm modificado aquí descrito, para unirse y/o funcionar como un ligando y/o para activar eventos de señalización por uno o más de TLR3, TLR7, TLR8, MDA5, RIG-I, LGP2 o 2'-5'-oligoadenilato-sintetasa. Así, el ARN, tal como el ARNm modificado aquí descrito, que se caracteriza por una menor afinidad a uno o más de TLR3, TLR7, TLR8, MDA5, RIG-I, LGP2 o 2'-5'-oligoadenilato-sintetasa, resulta en una producción reducida de citocinas proinflamatorias, por ejemplo TNF α , TGF β , IL-1 o IL-6. La afinidad puede reducirse en al menos un 50%, preferentemente en al menos un 60%, en comparación con la afinidad del equivalente de tipo natural.

Por tanto, la afinidad del ARNm modificado aquí descrito a uno o más de TLR3, TLR7, TLR8, MDA5, RIG-I, LGP2 o 2'-5'-oligoadenilato-sintetasa está relacionada con la cantidad de citocinas proinflamatorias producidas en cualquiera de los ensayos anteriores, es decir, una afinidad y/o activación de uno o más de TLR3, TLR7, TLR8, MDA5, RIG-I, LGP2 o 2'-5'-oligoadenilato-sintetasa reducida se relaciona con una cantidad reducida de citocinas proinflamatorias liberadas en el sobrenadante celular en comparación con la cantidad de citocinas proinflamatorias, por ejemplo TNF α , TGF β , IL-1 o IL-6, producidas en respuesta a la transfección del ARNm de tipo natural correspondiente que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo.

En una realización preferente, el método inventivo para proporcionar un ARNm con una inmunogenicidad y/o una capacidad estimuladora reducida puede ser ejecutado por un ordenador con ayuda de un software adecuado mediante la ejecución de al menos un algoritmo respectivo.

El software informático para el análisis de secuencias y/o para la optimización de codones es conocido en la técnica anterior y es fácilmente accesible para los expertos. Los programas de ordenador que pueden usarse para ejecutar el al menos un algoritmo del método inventivo pueden incluir, por ejemplo, CodonW, GCUA, INCA, etc. Además, se pueden emplear diversos paquetes de software disponibles en línea, por ejemplo "JCat" disponible de <http://www.jcat.de/>. El al menos un algoritmo puede comprender, por ejemplo, los siguientes pasos:

1. Proporcionar la secuencia de ARNm diana de tipo natural, por ejemplo el ARNm completo o una parte del mismo. Ve al paso 2.
2. Generar una nueva secuencia de ARNm modificada modificando la secuencia diana de acuerdo con el método que se proporciona en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11. Ve al paso 3.
3. Evaluar la secuencia de ARNm modificada y determinar si tiene una propiedad predeterminada, por ejemplo que al menos el 70% de los codones de la secuencia de ARNm de tipo natural que son optimizables para el contenido en citidina se han modificado para el contenido máximo en C posible sin alterar la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo natural. Si la secuencia de ARNm modificada tiene la propiedad predeterminada, continuar al paso 4; de lo contrario, ir al paso 2.
4. Proporcionar la secuencia de ARNm modificada como un ARNm optimizado y modificado.

La secuencia de ARNm modificada obtenida por el algoritmo anterior se puede usar como plantilla, por ejemplo para la síntesis química de ARN o la transcripción *in vitro*.

De acuerdo con una realización adicional, el ARNm modificado que codifica para al menos un péptido, polipéptido o proteína biológicamente activo puede obtenerse por síntesis, por ejemplo por síntesis química.

La síntesis química definida del ARNm modificado como se describe aquí en la dirección 3'→5' está bien establecida en la técnica anterior. La tecnología utiliza un ribonucleósido con un grupo protector de N adecuado: generalmente grupo protector 5', siendo el más popular dimetoxitriphenilo, es decir, un grupo DMT; un grupo protector T, siendo el más popular t-butildimetilsilil éter; y una 3'-fosforamidita, siendo la más popular cianoetil diisopropilo (componente 1). Este componente se acopla luego a un nucleósido con un grupo protector de N adecuado, 2' o 3' succinato de un ribonucleósido unido a un soporte sólido (componente 2). El acoplamiento del componente 1 y el nucleósido protegido 5'-OH-n-2',3'-protegido (componente 3) también se obtiene en la fase de solución en presencia de un activador que conduce a dímeros y oligoribonucleótidos, seguido de oxidación (dirección de síntesis 3'→5'), llevando también a un dinucleótido protegido con un enlace internucleotídico 3'-5' (Ogilvie, KK, Can. J. Chem., 58, 2686, 1980). De la técnica anterior son conocidas otras tecnologías de síntesis química de ARN, esto es para la síntesis del ARN modificado aquí descrito, por ejemplo el método descrito en la US 20110275793 A1.

Según una realización especialmente preferente, el ARNm modificado según el método inventivo de la presente invención puede obtenerse por transcripción *in vitro*, preferiblemente por transcripción *in vitro* mediada por bacteriófagos, preferiblemente por transcripción *in vitro* de polimerasa Sp6 y/o mediada por transcripción *in vitro* de polimerasa T3, con especial preferencia por transcripción *in vitro* mediada por polimerasa T7.

En la técnica anterior se han desarrollado sistemas de transcripción *in vitro* altamente eficientes, en particular aquellos que usan polimerasas de fago, tales como T7, SP6 y T3. Las ADN-polimerasas de fago T7, T3 y SP6 dependientes de ADN son ampliamente empleadas para sintetizar una gran cantidad de ARN. Estas enzimas son altamente procesivas y, por tanto, son capaces de generar moléculas de ARN largas, de hasta miles de nucleótidos de longitud, con una baja probabilidad de decaer en plantillas de ADN durante la transcripción y, así, pueden emplearse para la transcripción *in vitro* en la presente invención. Las ARN polimerasas de fago reconocen específicamente sus secuencias promotoras de 18 pb (T7, 5'-TAATACGACTCACTATAG; T3, 5'-AATTAACCCCTCACTAAAG; y SP6, 5'-ATTTAGGTGACACTATAG) e inician la transcripción precisamente en el 18º nucleótido guanosina. Con un promotor T7, T3 o SP6 fusionado en el extremo 5' de una plantilla de ADN, se espera que la reacción de transcripción genere una molécula de ARN con la secuencia predicha.

En este método, se transcribe *in vitro* una molécula de ADN correspondiente al ARNm modificado aquí descrito para la producción del ARNm. Esta matriz de ADN tiene un promotor adecuado para la transcripción *in vitro*, por ejemplo un promotor T7 y/o SP6 y/o T3, seguido de la secuencia de nucleótidos deseada para que se produzca el ARNm y una señal de terminación de la transcripción *in vitro*. Según la invención, la molécula de ADN que forma la matriz del constructo construcción de ARN a producir, por ejemplo del ARNm modificado aquí descrito, se prepara mediante replicación fermentativa y posterior aislamiento como parte de un plásmido replicable en bacterias.

Plásmidos adecuados para la transcripción *in vitro* del ARNm modificado aquí descrito son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, se pueden mencionar los siguientes plásmidos ilustrativos pT7Ts (Nº de acceso de GeneBank U26404), la serie pGEM®, por ejemplo pGEM®-1 (Nº de acceso de GeneBank X65300) y pSP64 (Nº de acceso de GeneBank X65327); ver también Mezei y Storts, Purification of PCR Products, en: Griffin and Griffin (Eds.), Tecnología PCR: Current Innovation, CRC Press, Boca Raton, FL, 2001. La transcripción *in vitro* del ARNm modificado de acuerdo con la presente invención también puede incluir análogos de ribonucleósidos trifosfato (rNTP), tales como aquellos requeridos para la protección 5' del ARNm modificado transcrito *in vitro* de acuerdo con la invención. No deben usarse para la transcripción *in vitro* análogos de rNTP distintos a los presentes de forma natural en los ARNm, en particular ARNm de mamífero, por ejemplo ARNm humano, ya que el ARNm puede verse afectado de manera desventajosa y, lo que es más importante, si el ARNm transcrito *in vitro* aquí descrito se va a usar en terapias de reemplazo proteico, esto puede no entrar en conflicto con las regulaciones nacionales.

Según una realización especialmente preferente, el ARNm modificado obtenible mediante el método de acuerdo con la presente invención se puede sintetizar mediante transcripción *in vitro* incluyendo análogos de rNTP de origen natural, por ejemplo trifosfato de 5-metilcitosina y/o trifosfato de pseudouridina.

De acuerdo con otra realización preferente, el ARNm modificado obtenible por el método de la invención puede sintetizarse mediante transcripción *in vitro* incluyendo otros análogos de rNTP de origen natural.

El término "análogos de ribonucleósido trifosfato" tal como se usa aquí se refiere a compuestos ribonucleósido-trifosfato que comprenden una modificación química, pudiendo comprender la modificación química una modificación de esqueleto, una modificación de azúcar o una modificación de bases. Estos análogos de

ribonucleósidos trifosfato también se denominan aquí como nucleósidos trifosfato modificados, ribonucleósidos modificados o nucleósidos modificados.

- En este contexto, los nucleósidos trifosfato modificados como se definen aquí son análogos/modificaciones de nucleótidos, por ejemplo modificaciones de esqueleto, modificaciones de azúcar o modificaciones de bases.
- 5 Una modificación de esqueleto en el contexto de la presente descripción es una modificación donde los fosfatos del esqueleto de nucleótidos están químicamente modificados. Una modificación de azúcar en el contexto de la presente descripción es una modificación química del azúcar de los nucleótidos. Además, una modificación de bases en el contexto de la presente descripción es una modificación química del resto base de los nucleótidos. En este contexto, los análogos o modificaciones de nucleótidos se seleccionan preferiblemente de
- 10 análogos de nucleótidos que son aplicables para la transcripción y/o la traducción.

Modificaciones de azúcar

- Los nucleósidos y nucleótidos modificados que pueden usarse en el contexto de la presente descripción pueden estar modificados en el resto azúcar. Por ejemplo, el grupo 2'-hidroxilo (OH) puede modificarse o reemplazarse con varios sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes. Ejemplos de modificaciones "oxi" del grupo 2'-hidroxilo
- 15 incluyen, sin limitación, alcoxi o ariloxi (-OR, por ejemplo, R=H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $-O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) donde el 2'-hidroxilo está unido, por ejemplo por un puente metileno, al carbono 4' del mismo azúcar ribosa; y grupos amino (-O-amino, donde el grupo amino, por ejemplo NRR, puede ser alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino) o aminoalcoxi.
- 20 Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno, amino (por ejemplo NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); o el grupo amino se puede unir al azúcar mediante un enlazador, comprendiendo el enlazador uno o más de los átomos C, N y O.

- El grupo de azúcar también puede contener uno o más carbonos con la configuración estereoquímica opuesta con respecto a la del carbono correspondiente en la ribosa. Por tanto, un nucleótido modificado puede incluir
- 25 nucleótidos que contienen, por ejemplo, arabinosa como azúcar.

Modificaciones de esqueleto

- El esqueleto fosfato puede modificarse adicionalmente en los nucleósidos y nucleótidos modificados. Los grupos fosfato del esqueleto pueden modificarse reemplazando uno o más de los átomos de oxígeno por un sustituyente diferente. Además, los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir el reemplazo
- 30 completo de un resto fosfato no modificado por un fosfato modificado como se describe aquí. Ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen, sin limitarse a, fosforotioato, fosforoselenatos, borano fosfatos, ésteres de borano fosfatos, hidrogenofosfonatos, fosfoamidatos, alquil o aril fosfonatos y fosfotriésteres. En los fosforoditioatos ambos oxígenos no enlazantes están reemplazados por azufre. El enlazador de fosfato también puede modificarse sustituyendo un oxígeno enlazante por nitrógeno (fosfoamidatos puenteados), azufre
- 35 (fosforotioatos puenteados) y carbono (metileno-fosfonatos puenteados).

Modificaciones de bases

- Los nucleósidos y nucleótidos modificados que pueden usarse según la presente descripción pueden modificarse adicionalmente en el grupo nucleobase. Ejemplos de nucleobases que se encuentran en el ARN
- 40 incluyen, entre otros, adenina, guanina, citosina y uracilo. Por ejemplo, los nucleósidos y nucleótidos aquí descritos pueden modificarse químicamente en la cara principal del surco. En algunas realizaciones, las principales modificaciones químicas del surco pueden incluir un grupo amino, un grupo tiol, un grupo alquilo o un grupo halo.

- En realizaciones particularmente preferentes aquí descritas, los análogos/modificaciones de nucleótidos se seleccionan de modificaciones de bases, preferentemente seleccionadas de 2-amino-6-cloropurinaribósido-5'-
- 45 trifosfato, 2-aminopurinaribósido-5'-trifosfato; 2-aminoadenosina-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxicitidina-trifosfato, 2-tiocitidina-5'-trifosfato, 2-tiouridina-5'-trifosfato, 2'-fluorotimidina-5'-trifosfato, 2'-O-metilinosina-5'-trifosfato, 4-tiouridina-5'-trifosfato, 5-aminoallicitidina-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina-5'-trifosfato, 5-bromocitidina-5'-trifosfato, 5-bromouridina-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-yodocitidina-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-yodouridina-5'-
- 50 trifosfato, 5-yodo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 5-metiluridina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 6-azacitidina-5'-trifosfato, 6-azauridina-5'-trifosfato, 6-cloropurinaribósido-5'-trifosfato, 7-deazaadenosina-5'-trifosfato, 7-deazaguanosina-5'-trifosfato, 8-azaadenosina-5'-trifosfato, 8-azidoadenosina-5'-trifosfato, benzimidazolribósido-5'-trifosfato, N1-metiladenosina-5'-trifosfato, N1-metilguanosina-5'-trifosfato, N6-metiladenosina-5'-trifosfato, O6-

metilguanosina-5'-trifosfato, pseudouridina-5'-trifosfato o puomicina-5'-trifosfato, xantosina-5'-trifosfato. Se da preferencia particular a los nucleótidos para modificaciones de base seleccionadas del grupo de nucleótidos modificados en bases que consisten en 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 7-deazaguanosina-5'-trifosfato, 5-bromocitidina-5'-trifosfato y pseudouridina- 5'-trifosfato.

- 5 En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen piridin-4-ona ribonucleósido, 5-aza-uridina, 2-tio-5-azauridina, 2-tiouridina, 4-tiopseudouridina, 2-tiopseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetiluridina, 1-carboximetilpseudouridina, 5-propiniluridina, 1-propinilpseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometilpseudouridina, 5-taurinometil-2-tiouridina, 1-taurinometil-4-tiouridina, 5-metiluridina, 1-metilpseudouridina, 4-tio-1-metilpseudouridina, 2-tio-1-metilpseudouridina, 1-metil-1-deazapseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deazapseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tiodihidrouridina, 2-tiodihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tiouridina, 4-metoxipseudourina, pseudourina y 4-metoxi-2-tiopseudouridina.

- 15 En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen 5-azacitidina, pseudoisocitidina, 3-metilcitidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolocitidina, pirrolopseudocitidina, 2-tiocitidina, 2-tio-5-metilcitidina, 4-tiopseudoisocitidina, 4-tio-1-metilpseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deazapseudoisocitidina, 1-metil-1-deazapseudoisocitidina, zebularina, 5-azazebularina, 5-metilzebularina, 5-aza-2-tiozebularina, 2-tiozebularina, 2-metoxicitidina, 2-metoxi-5-metilcitidina, 4-metoxipseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metilpseudoisocitidina.

- 20 En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deazaadenina, 7-deaza-8-azaadenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metil-6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoilamino, 2-metil-6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenosina, 2-metil-6-adenina y 2-metoxiadenosina.

- 25 En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen inosina, 1-metilinosina, wiosina, wibutosina, 7-deazaguanosina, 7-deaza-8-azaguanosina, 6-tioguanosina, 6-tio-7-deazaguanosina, 6-tio-7-deaza-8-azaguanosina, 7-metilguanosina, 6-tio-7-metilguanosina, 7-metilinosina, 6-metoxiguanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxoguanosina, 7-metil-8-oxoguanosina, 1-metil-6-tioguanosina, N2-metil-6-tioguanosina y N2,N2-dimetil-6-tioguanosina.

- 30 En algunas realizaciones, el nucleótido puede modificarse en la cara principal del surco y puede incluir reemplazar el hidrógeno en C-5 del uracilo por un grupo metilo o halo. En realizaciones específicas, 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.

- 35 En realizaciones específicas adicionales, los nucleótidos modificados incluyen modificaciones de nucleósidos seleccionadas de 6-azacitidina, 2-tiocitidina, 2-tiocitidina, pseudoisocitidina, 5-aminoaliluridina, 5-yodouridina, N1-metilpseudouridina, 5,6-dihidrouridina, α -tiouridina, 4-tiouridina, 6-azauridina, 5-hidroxiuridina, desoxitimidina, 5-metiluridina, pirrolocitidina, inosina, α -tioguanosina, 6-metilguanosina, 5-metilcitidina, 8-oxoguanosina, 7-deazaguanosina, N1-metiladenosina, 2-amino-6-cloropurina, N6-metil-2-aminopurina, pseudoisocitidina, 6-cloropurina, N6-metiladenosina, α -tioadenosina, 8-azidoadenosina, 7-deazaadenosina.

- 40 Otros nucleótidos modificados se han descrito previamente (WO2013052523).

- 45 En algunas realizaciones de la presente invención, el ARNm modificado obtenible por el método de acuerdo con la invención no comprende ningún nucleósido modificado como se describieron anteriormente. En estas realizaciones, el ARNm modificado preferentemente comprende exclusivamente nucleósidos que se seleccionan del grupo consistente en adenosina, citidina, guanosina y uridina. Preferiblemente, el ARNm modificado se modifica solo con respecto a su contenido en G y/o C como se describe aquí, donde la citidina o la guanosina (no modificadas) reemplazan otros nucleósidos para aumentar el contenido en G y/o C como se describe aquí.

- 50 Preferentemente, el ARNm modificado que es obtenible por el método según la invención no se ha modificado con una modificación química en la posición 4-, 5- o 6- de la base pirimidínica de los nucleósidos de citidina y/o uridina, con una modificación química en la posición 2-, 6-, 7- u 8- de la base púrica de los nucleósidos de adenosina, inosina y/o guanosina y/o con una modificación química en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos de adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina.

Más preferiblemente, el ARNm modificado obtenible mediante el método según la invención no se ha modificado con una modificación química en la posición 2-, 6-, 7- u 8- de la base púrica de los nucleósidos de

adenosina, inosina y/o guanosina y con una modificación química en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos de adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina.

Incluso con mayor preferencia, el ARNm modificado obtenible mediante el método de acuerdo con la invención no se ha modificado con una modificación química en la posición 4-, 5- o 6- de la base pirimidínica de los nucleósidos de citidina y/o uridina y con una modificación química en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos de adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina.

Preferentemente, el ARNm modificado obtenible por el método de acuerdo con la invención no se ha modificado con una modificación química en la posición 5- o 6- de la base pirimidínica de los nucleósidos citidina y/o uridina, seleccionándose la modificación química preferiblemente del grupo consistente en 4-tio, 5-yodo-/(5-I-), 5-bromo-/(5-Br-), 5-aminoalil-, 5-fluor-/(5-F-), 5-hidroxi-, 5-hidro-/(5-H-), 5-nitro-, 5-propinil-/(5-(C C-CH₃)-), 5-metil-, 5-metil-2-tio-, 5-formil-, 5-hidroximetil-, 5-metoxi-, 5-oxiacetato de metilo-, ácido 5-oxiacético-, 5-carboxihidroximetil-, 5-(carboxihidroximetil)pirimidina metil éster-, 5-metoxicarbonilmetil-, 5-metoxicarbonilmetil-2-tio-, 5-aminometil-, 5-aminometil-2-tio-, 5-aminometil-2-selenio-, 5-metilaminometil-, 5-carbamoilmetil-, 5-carboximetilaminometil-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-, 5-carboximetil-, 5-metildihidro-, 5-taurinometil-, 5-taurinometil-2-tiouridina, 5-isopentenilaminometil-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-, 5-aminopropil-/(5-(C₃H₆NH₃)-), 5-metoxi-etoxi-metil-/(5-(CH₂-O-C₂H₄-O-CH₃)-) y 6-aza-.

Además, el ARNm modificado obtenible por el método de acuerdo con la invención preferiblemente no se ha modificado con una modificación química en la posición 2-, 6-, 7- u 8- de la base púrica de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosina, seleccionándose la modificación química preferiblemente del grupo consistente en 2-amino-, 7-deaza-, 8-aza- y 8-azido-.

Además o alternativamente, el ARNm modificado obtenible por el método de acuerdo con la invención preferiblemente no se ha modificado con una modificación química en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina, cuando se incorpora en la secuencia de ARN, donde tales modificaciones químicas en la posición 2' del azúcar de los nucleósidos adenosina, inosina, guanosina, citidina y/o uridina pueden seleccionarse del grupo consistente en 2'-desoxi-, 2'-amino-2'-desoxi-/2'-amino-, 2'-fluor-2'-desoxi-/2'-fluor- y 2'-O-metil-2'-desoxi-/2'-O-metil-.

Preferentemente, el ARNm modificado obtenible por el método de acuerdo con la invención no se ha modificado con una modificación química en la posición 4-, 5- o 6- de la base pirimidínica de los nucleósidos citidina y/o uridina y en la posición 2' del azúcar ribosa como se definió anteriormente, seleccionándose la modificación química preferiblemente del grupo consistente en 4-tio-2'-desoxi-, 4-tio-2'-amino-, 4-tio-2'-fluor-, 4-tio-2'-O-metil-, 5-yodo-2'-desoxi-, 5-yodo-2'-amino-, 5-yodo-2'-fluor-, 5-yodo-2'-O-metil-, 5-bromo-2'-desoxi-, 5-bromo-2'-amino-, 5-bromo-2'-fluor-, 5-bromo-2'-O-metil-, 5-aminoalil-2'-desoxi-, 5-aminoalil-2'-amino-, 5-aminoalil-2'-fluor-, 5-aminoalil-2'-O-metil-, 5-fluor-2'-desoxi-, 5-fluor-2'-amino-, 5-fluor-2'-fluor-, 5-fluor-2'-O-metil-, 5-hidroxi-2'-desoxi-, 5-hidroxi-2'-amino-, 5-hidroxi-2'-fluor-, 5-hidroxi-2'-O-metil-, 5-hidro-2'-desoxi-, 5-hidro-2'-amino-, 5-hidro-2'-fluor-, 5-hidro-2'-O-metil-, 5-nitro-2'-desoxi-, 5-nitro-2'-amino-, 5-nitro-2'-fluor-, 5-nitro-2'-O-metil-, 5-propinil-2'-desoxi-, 5-propinil-2'-amino-, 5-propinil-2'-fluor-, 5-propinil-2'-O-metil-, 5-metil-2'-desoxi-, 5-metil-2'-amino-, 5-metil-2'-fluor-, 5-metil-2'-O-metil (5,2'-O-dimetil-), 5-metil-2-tio-2'-desoxi-, 5-metil-2-tio-2'-amino-, 5-metil-2-tio-2'-fluor-, 5-metil-2-tio-2'-O-metil-, 5-formil-2'-desoxi-, 5-formil-2'-amino-, 5-formil-2'-fluor-, 5-formil-2'-O-metil-, 5-hidroximetil-2'-desoxi-, 5-hidroximetil-2'-amino-, 5-hidroximetil-2'-fluor-, 5-hidroximetil-2'-O-metil-, 5-metoxi-2'-desoxi-, 5-metoxi-2'-amino-, 5-metoxi-2'-fluor-, 5-metoxi-2'-O-metil-, 5-oxiacetato de metilo-2'-desoxi-, 5-oxiacetato de metilo-2'-amino-, 5-oxiacetato de metilo-2'-fluor-, 5-oxiacetato de metilo-2'-O-metil-, ácido 5-oxiacético-2'-desoxi-, ácido 5-oxiacético-2'-amino-, ácido 5-oxiacético-2'-fluor-, ácido 5-oxiacético-2'-O-metil-, 5-carboxihidroximetil-2'-desoxi-, 5-carboxihidroximetil-2'-amino-, 5-carboxihidroximetil-2'-fluor-, 5-carboxihidroximetil-2'-O-metil-, 5-(carboxihidroximetil)pirimidina metil éster-2'-desoxi-, 5-(carboxihidroximetil)pirimidina metil éster-2'-amino-, 5-(carboxihidroximetil)pirimidina metil éster-2'-fluor-, 5-(carboxihidroximetil)pirimidina metil éster-2'-O-metil-, 5-metoxicarbonilmetil-2'-desoxi-, 5-metoxicarbonilmetil-2'-amino-, 5-metoxicarbonilmetil-2'-fluor-, 5-metoxicarbonilmetil-2'-O-metil-, 5-metoxicarbonilmetil-2-tio-2'-desoxi-, 5-metoxicarbonilmetil-2-tio-2'-amino-, 5-metoxicarbonilmetil-2-tio-2'-fluor-, 5-metoxicarbonilmetil-2-tio-2'-O-metil-, 5-aminometil-2'-desoxi-, 5-aminometil-2'-amino-, 5-aminometil-2'-fluor-, 5-aminometil-2'-O-metil-, 5-aminometil-2-tio-2'-desoxi-, 5-aminometil-2-tio-2'-amino-, 5-aminometil-2-tio-2'-fluor-, 5-aminometil-2-tio-2'-O-metil-, 5-aminometil-2-selenio-2'-desoxi-, 5-aminometil-2-selenio-2'-amino-, 5-aminometil-2-selenio-2'-fluor-, 5-aminometil-2-selenio-2'-O-metil-, 5-metilaminometil-2'-desoxi-, 5-metilaminometil-2'-amino-, 5-metilaminometil-2'-fluor-, 5-metilaminometil-2'-O-metil-, 5-carbamoilmetil-2'-desoxi-, 5-carbamoilmetil-2'-amino-, 5-carbamoilmetil-2'-fluor-, 5-carbamoilmetil-2'-O-metil-, 5-carboximetilaminometil-2'-desoxi-, 5-carboximetilaminometil-2'-amino-, 5-carboximetilaminometil-2'-fluor-, 5-carboximetilaminometil-2'-O-metil-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-2'-desoxi-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-2'-amino-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-2'-fluor-, 5-carboximetilaminometil-2-tio-2'-O-metil-, 5-carboximetil-2'-desoxi-, 5-carboximetil-2'-amino-, 5-carboximetil-2'-fluor-, 5-carboximetil-2'-O-metil-, 5-metildihidro-2'-desoxi-, 5-metildihidro-2'-amino-, 5-metildihidro-2'-fluor-, 5-metildihidro-2'-O-metil-, 5-taurinometil-2'-desoxi-, 5-taurinometil-2'-amino-, 5-

taurinometil-2'-fluor-, 5-taurinometil-2'-O-metil-, 5-taurinometil-2-tiouridina-2'-desoxi-, 5-taurinometil-2-tiouridina-2'-amino-, 5-taurinometil-2-tiouridina-2'-fluor-, 5-taurinometil-2-tiouridina-2'-O-metil-, 5-isopentenilaminometil-2'-desoxi-, 5-isopentenilaminometil-2'-amino-, 5-isopentenilaminometil-2'-fluor-, 5-isopentenilaminometil-2'-O-metil-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-2'-desoxi-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-2'-amino-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-2'-fluor-, 5-isopentenilaminometil-2-tio-2'-O-metil-, 5-aminopropil-2'-desoxi-, 5-aminopropil-2'-amino-, 5-aminopropil-2'-fluor-, 5-aminopropil-2'-O-metil-, 5-metoxi-etoxi-metil-2'-desoxi-, 5-metoxi-etoxi-metil-2'-amino-, 5-metoxi-etoxi-metil-2'-fluor-, 5-metoxi-etoxi-metil-2'-O-metil-, 6-aza-2'-desoxi-, 6-aza-2'-amino-, 6-aza-2'-fluor- y 6-aza-2'-O-metil-.

Con mayor preferencia, el ARNm modificado obtenible por el método de acuerdo con la invención no se ha modificado con una modificación química en la posición 2-, 6-, 7- u 8- de la base púrica de los nucleósidos adenosina, inosina y/o guanosina y en la posición 2' del azúcar ribosa como se definió anteriormente, seleccionándose la modificación química del grupo consistente en 2-amino-2'-desoxi-, 2-amino-2'-amino-, 2-amino-2'-fluor-, 2-amino-2'-O-metil-, 7-deaza-2'-desoxi-, 7-deaza-2'-amino-, 7-deaza-2'-fluor-, 7-deaza-2'-O-metil-, 8-aza-2'-desoxi-, 8-aza-2'-amino-, 8-aza-2'-fluor-, 8-aza-2'-O-metil-, 8-azido-2'-desoxi-, 8-azido-2'-amino-, 8-azido-2'-fluor- y 8-azido-2'-O-metil-.

Según otra realización, el ARNm modificado obtenible según una o más realizaciones del método inventivo de modulación dirigida de la respuesta inmune frente a un ARNm carece de elementos de secuencia desestabilizadores (DSE) en la 3' y/o 5'-UTR.

Tal como se usa aquí, el término "elemento de secuencia desestabilizador" (DSE) se refiere a una secuencia de nucleótidos que reduce la vida media de un transcrito, por ejemplo la vida media del ARNm modificado de la invención, dentro de una célula y/u organismo, por ejemplo un humano. En consecuencia, un DSE comprende una secuencia de nucleótidos que reduce la vida media intracelular de un transcrito de ARN.

Se encuentran secuencias DSE en ARNm de corta duración, por ejemplo c-fos, c-jun, c-myc, GM-CSF, IL-3, TNF-alfa, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, uroquinasa, bcl-2, SGLT1 (Na(+)-transportador de glucosa acoplado), Cox-2 (ciclooxigenasa 2), IL8, PAI-2 (inhibidor del activador de plasminógeno tipo 2), receptor adrenérgico beta-1, GAP43 (5' UTR y 3'UTR), elementos ricos en AU (ARE) y/o elementos ricos en U (URE), incluyendo, entre otros, copias únicas, en tándem o múltiples o superpuestas de UUAUUUA(U/A)(U/A) (donde U/A es A o U) y/o el pentámero AUUUA y/o el tetrámero AUUU. Por consiguiente, la plantilla de ADN utilizada para la transcripción *in vitro* del ARNm modificado aquí descrito carece de las secuencias correspondientes.

Son conocidos en la técnica ensayos para medir la degradación de ARN, por ejemplo la degradación del ARNm modificado aquí descrito, y, por tanto, la estabilidad del ARNm. Por ejemplo, la vida media del ARN se puede medir siguiendo los métodos descritos por Duan y Jefcoate (Duan y Jefcoate, 2007. J. Mol. Endocrinol 38(1-2):159-79).

De acuerdo con este método, las células se pueden disponer, por ejemplo, en placas de 12 pocillos con una densidad del 25% 24 horas antes de la transfección. Para la transfección, se puede transfectar 1 µg de ARNm modificado de la invención por pocillo. Se puede usar la siguiente proporción: 1 µg de ARNm, 1 µl de reactivo TransIt-ARNm, 1 µl de reactivo de refuerzo de ARNm y 100 µl de medio sin suero. El ARNm modificado aquí descrito se puede mezclar primero con medios libres de suero, luego se puede agregar y mezclar reactivo de refuerzo de ARN, seguido de la adición del reactivo de transfección. La mezcla se puede incubar a temperatura ambiente durante tres minutos y distribuir el alícuotas directamente sobre las células en, por ejemplo, medios completos. Doce horas después de la transfección, cuando los niveles de ARNm celular han alcanzado un estado estable, las células pueden lavarse una vez y el medio de cultivo celular puede cambiarse por medio completo sin reactivos de transfección (mezcla) (punto de tiempo de hora cero). La degradación del ARNm modificado aquí descrito dentro de las células se puede determinar entonces recolectando las células en momentos de tiempo apropiados, por ejemplo 12h y/o 16h y/o 18h y/o 20h y/o 24 y/o 48h después de la transfección. El ARN celular total puede aislarse posteriormente y puede determinarse la cantidad de ARNm modificado aquí descrito mediante transcripción inversa y/o PCR cuantitativa en tiempo real usando cebadores específicos que se unen a la región de codificación del ARNm modificado aquí descrito y/o a la 5'- y/o a la 3'-UTR del ARNm modificado. Entonces puede calcularse la vida media del ARNm modificado aquí descrito por ajuste de regresión lineal de los puntos de tiempo en gráficos semi-log.

En una realización preferente, el ARNm modificado aquí descrito puede comprender además una estructura 5'-CAP y/o una cola poliA de al menos 60 nucleótidos, preferiblemente de al menos 70 nucleótidos, y/o una secuencia estabilizadora 3'.

Dentro de la presente invención, el término "estructura CAP" se refiere a una estructura que se encuentra en el extremo 5' de un ARNm, por ejemplo de un ARNm modificado de acuerdo con una o más realizaciones del método de la presente invención, y generalmente consiste en un nucleótido guanosina unido al ARNm a través

de un enlace inusual de trifosfato 5' a 5'. El nucleótido guanosina se metila en la posición 7 directamente después de la protección *in vivo* con una metil-transferasa. Esto se conoce como cap 7-metilguanilato, abreviado m7G. Otras modificaciones incluyen la posible metilación de los grupos 2'-hidroxi de los primeros 2 azúcares ribosa del extremo 5' del ARNm.

- 5 Para una traducción eficiente de un ARNm dado, por ejemplo el ARNm modificado aquí descrito, es necesaria una unión efectiva de los ribosomas al sitio de unión al ribosoma, que también se denomina "secuencia Kozak" (5'-GCCGCCACCAUGG, donde AUG denota el codón de inicio). A este respecto, se ha establecido que un mayor contenido en A/U alrededor de este sitio permite una unión de ribosomas más eficiente al ARNm (Kozak, Mol Cell Biol. 1989 Nov; 9(11): 5073-80). Por consiguiente, el ARNm modificado puede comprender una
- 10 secuencia Kozak para una unión del ribosoma más eficiente al ARNm. El ARNm modificado puede comprender además una cola poli-A, que es una secuencia de hasta 200 nucleótidos adenosina en el extremo 3' del ARNm.

- De acuerdo otra realización, el ARNm modificado aquí descrito puede comprender en la región 3' no traducida una o más secuencias estabilizadoras, que son capaces de aumentar la vida media del ARNm en el citosol. Estas secuencias estabilizadoras pueden presentar una homología de secuencia del 100% con las secuencias naturales que están presentes en virus, bacterias y células eucariotas, pero también pueden ser parcial o completamente sintéticas. Como ejemplo de secuencias estabilizadoras que pueden emplearse, pueden mencionarse las secuencias no traducidas (UTR) del gen de β -globina, por ejemplo de homo sapiens o de xenopus laevis. Otro ejemplo de secuencia estabilizadora tiene la fórmula general (C/U)CCANxCCC(U/A)PyxUC(C/U)CC, la cual está contenida en la 3'-UTR del ARNm muy estable que codifica
- 15 para α -globina, α -(I)-colágeno, 15-lipoxigenasa o tirosina-hidroxilasa (véase Holcik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1997, 94: 2410 a 2414). Dichas secuencias estabilizadoras pueden emplearse individualmente o combinadas entre sí para estabilizar el ARNm modificado aquí descrito, así como en combinación con otras secuencias estabilizadoras conocidas por el experto en la materia.
- 20

- También se describe aquí una composición farmacéutica que comprende un ARNm modificado según una o más de las realizaciones anteriores. La composición farmacéutica opcionalmente comprende uno o más excipientes, vehículos, diluyentes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 25

- El término "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en relación con las composiciones farmacéuticas aquí descritas, se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que normalmente no producen reacciones adversas cuando se administran a un individuo, por ejemplo a un humano. Preferentemente, tal como se usa aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o citado en la Farmacopea de EE.UU. o en otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en humanos.
- 30

- El término "vehículo" como se usa en relación con las composiciones farmacéuticas aquí descritas se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites. Preferentemente, como vehículos se emplean soluciones acuosas o soluciones acuosas salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, en particular para soluciones inyectables. En "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E.W. Martin, 18ª edición, se describen vehículos farmacéuticos adecuados. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo, es decir, con la acción del
- 35 ARNm modificado de la composición farmacéutica.
- 40

- Excipientes y/o vehículos adecuados para su uso con la composición farmacéutica aquí descrita son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o agentes tampón del pH. Los métodos reales de preparación de tales formas de dosificación son conocidos o serán evidentes para los expertos en la técnica, tales como aquellos que se divulgan, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 17a edición, 1985; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A.R. Gennaro, (2000) Lippincott, Williams & Wilkins. También se proporciona una lista no limitativa de excipientes comúnmente utilizados y aceptados en las "VOLUME 3B Guidelines Medicinal products for human use Safety, environment and information Excipients in the label and package leaflet of medicinal products for human use, July 2003" emitido por Comisión europea. En cualquier caso, la composición o formulación a administrar contendrá una cantidad del agente adecuada para alcanzar el estado deseado en el sujeto a tratar.
- 45
- 50

- Posibles sustancias vehículo para su uso con la composición farmacéutica aquí descrita para la administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, solución estéril de cloruro de sodio, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros lactida biocompatibles, copolímeros lactida/glicólido o copolímeros polioxitileno/polioxiopropileno. La composición farmacéutica puede comprender además sustancias de carga o sustancias tales como lactosa o manitol. Los vehículos preferentes para su uso en la composición farmacéutica
- 55

de la invención son típicamente materiales vehículo acuosos, agua para inyección (WFI) o agua tamponada con fosfato, citrato, HEPES o acetato, etc., y el pH se ajusta típicamente a 5,0 a 8,0, preferentemente a 6,5 a 7,5. Preferentemente, el portador o vehículo comprenderá además componentes salinos, por ejemplo cloruro de sodio, cloruro de potasio u otros componentes que, por ejemplo, generan una solución isotónica.

5 Adicionalmente, el portador o el vehículo puede contener, además de los constituyentes mencionados anteriormente, componentes adicionales, tales como seroalbúmina humana (HSA), polisorbato 80, azúcares o aminoácidos.

10 En una realización especialmente preferente, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende el ARNm modificado de acuerdo con una o más realizaciones del método de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades susceptibles de terapia de reemplazo proteico, por ejemplo para el tratamiento de enfermedades hereditarias o endocrinológicas, preferentemente para su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por trastornos de aminoácidos, trastornos del metabolismo de los carbohidratos, trastornos de la biosíntesis del colesterol, defectos de oxidación de ácidos grasos y trastornos del metabolismo de las grasas, acidosis láctica, enfermedades por almacenamiento de glucógeno, trastornos mitocondriales,

15 trastornos de ácidos orgánicos, trastornos del ciclo de la urea, trastornos de la enfermedad de almacenamiento lisosómico.

20 El término "terapia de reemplazo proteico" tal como se usa aquí se refiere a la introducción de un ARNm, tal como, por ejemplo, el ARNm modificado aquí descrito, en un individuo que tiene una deficiencia en una proteína codificada por el ARNm modificado, es decir, un ARNm modificado por el método de la invención de modulación dirigida de la respuesta inmune frente a dicho ARNm que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo.

Así, la composición farmacéutica aquí descrita que comprende el ARNm modificado de acuerdo con una o más realizaciones del método de la invención puede emplearse en el tratamiento de enfermedades o para ayudar en el tratamiento de las enfermedades que se caracterizan por una deficiencia proteica.

25 El término "enfermedades que se caracterizan por una deficiencia proteica" tal como se usa en el contexto de la presente descripción, tal como, por ejemplo, en el contexto de la composición farmacéutica que comprende el ARNm modificado de la invención, se refiere a cualquier trastorno que se presente con una patología causada la ausencia o por una cantidad insuficiente de una proteína. Este término incluye trastornos del plegamiento de proteínas, esto es, trastornos conformacionales, que resultan en un producto proteico biológicamente inactivo.

30 La insuficiencia de proteínas puede estar involucrada en enfermedades infecciosas, inmunosupresión, fallo orgánico, problemas glandulares, enfermedades por radiación, deficiencias nutricionales, envenenamiento u otros daños ambientales o externos.

35 Existen actualmente alrededor de 1.100 trastornos hereditarios conocidos caracterizados por una deficiencia de proteínas o por pérdida de función en tejidos específicos. Teóricamente, estos trastornos pueden tratarse mediante la terapia de reemplazo proteico; por ejemplo la presente descripción contempla la terapia para proteínas actualmente adecuadas para su uso en la terapia de reemplazo proteico disponible ahora o en el futuro. En tales trastornos, ciertas células o todas las células de un individuo carecen de una proteína funcional suficiente, contienen una forma inactiva de la proteína o contienen niveles insuficientes para la función biológica.

40 Además, la lista de enfermedades identificadas como trastornos conformacionales, causadas por mutaciones que alteran el plegamiento de proteínas y el retardo de la proteína mutante en el RE, resultando en una deficiencia proteica, está aumentando. Éstas incluyen fibrosis quística, deficiencia de α 1-antitripsina, hipercolesterolemia familiar, enfermedad de Fabry, enfermedad de Alzheimer (Selkoe, Annu. Rev. Neurosci. 1994; 17: 489-517), osteogénesis imperfecta (Chessler et al., J. Biol. Chem 1993; 268: 18226-18233), síndrome de glucoproteínas deficiente en carbohidratos (Marquardt et al., Eur. J. Cell. Biol. 1995; 66: 268-273), síndrome de Maroteaux-Lamy (Bradford et al., Biochem. J. 1999; 341: 193-201), ceguera hereditaria (Kaushal et al., Biochemistry 1994; 33: 6121-8), trombostenia de Glanzmann (Kato et al., Blood 1992; 79: 3212-8), deficiencia hereditaria del factor VII (Arbini et al., Blood 1996; 87: 5085-94), albinismo oculocutáneo (Halaban et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97: 5889-94) y deficiencia de proteína C (Katsumi, et al., Blood 1996; 87: 4164-75).

50 Recientemente, una mutación de la enfermedad adrenoleucodistrofia (ALD) ligada al cromosoma X resultó en un plegamiento incorrecto del transportador de peroxisomas deficiente que podría rescatarse mediante cultivo a baja temperatura de las células afectadas (Walter et al., Am J Hum Genet 2001; 69: 35 -48). Es generalmente aceptado que las mutaciones se producen de manera uniforme en toda la secuencia de un gen. Por tanto, es predecible que el fenotipo resultante del plegamiento incorrecto de la proteína deficiente existe en muchos otros

55 trastornos genéticos.

Muchos de los trastornos hereditarios de deficiencia de proteínas son deficiencias enzimáticas. Como se indicó anteriormente, una gran clase de trastornos hereditarios de enzimas implica mutaciones en las enzimas

lisosómicas y se denominan trastornos de almacenamiento lisosómico (LSD). Los trastornos de almacenamiento lisosómico son un grupo de enfermedades causadas por la acumulación de glucosfingolípidos, glucógeno, mucopolisacáridos. Ejemplos de trastornos lisosómicos incluyen, sin limitarse a, la enfermedad de Gaucher (Beutler et al., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. 2001 Scriver et al., Ed. páginas. 3635-3668, McGraw-Hill, Nueva York), GM1-gangliosidosis (Ídem en pp 3775-3810), fucosidosis (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 1995. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D., ed pp. 2529-2561, McGraw-Hill, New York), mucopolisacaridosis (Ídem en pp 3421-3452), enfermedad de Pompe (ídem en pp. 3389-3420), enfermedad de Hurler-Scheie (Weismann et al., *Science* 1970; 169, 72-74), enfermedades de Niemann-Pick A y B, (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8th ed. 2001. Scriver et al. ed., pp 3589-3610, McGraw-Hill, Now York) y la enfermedad de Fabry (ídem en pp. 3733-3774).

La enfermedad de Fabry es un error innato ligado al cromosoma X del metabolismo de los glicosfingolípidos causado por una actividad deficiente de la α -galactosidasa A (α -Gal A) lisosómica ((Desnick et al., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Edition Scriver et al. ed., pp. 3733-3774, McGraw-Hill, New York 2001; Brady et al., *N. Engl. J. Med.* 1967; 276,1163-1167). Este defecto enzimático lleva a la deposición progresiva de glucosfingolípidos neutros con residuos de α -galactosilo, predominantemente globotriaosilceramida (GL-3) en fluidos corporales y lisosomas tisulares. Se estima que la frecuencia de la enfermedad es de aproximadamente 1:40.000 en varones y se informa en todo el mundo dentro de diferentes grupos étnicos. Clásicamente, en los varones afectados, las manifestaciones clínicas incluyen angioqueratoma, acroparestesias, hipohidrosis y opacidad corneal y lenticular características (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Edition 2001, Scriver et al., ed., pp. 3733-3774, McGraw-Hill, New York). La esperanza de vida del varón afectado se reduce y generalmente la muerte se produce en la cuarta o quinta década como resultado de una enfermedad vascular del corazón, del cerebro y/o de los riñones. En contraste, los pacientes con la "variante cardíaca" más leve normalmente tienen del 5 al 15% de la actividad normal de α -Gal A y muestran hipertrofia ventricular izquierda o miocardiopatía. Estos pacientes con variantes cardíacas son esencialmente asintomáticos cuando sus contrapartes clásicamente afectadas están gravemente comprometidas. Recientemente se han encontrado variantes cardíacas en el 11% de los pacientes varones adultos con miocardiopatía hipertrofica del ventrículo izquierdo sin explicación, lo que sugiere que la enfermedad de Fabry puede ser más frecuente de lo estimado previamente (Nakao et al., *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 288-293). El gen α -Gal A ha sido mapeado a Xq22 (Bishop et al., *Am. J. Hum. Genet.* 1985; 37: A144) y se ha descrito el ADNc de longitud completa y secuencias genómicas completas de 12 kb que codifican α -Gal A (Calhoun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82: 7364-7368; Bishop y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 4859-4863; Tsuji y col., *Bur. J. Biochem.* 1987; 165: 275-280; y Kornreich et al., *Nucleic Acids Res.* 1989;17: 3301-3302). Existe una marcada heterogeneidad genética de mutaciones que causan la enfermedad de Fabry (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Edition 2001, Scriver et al., ed, pp. 3733-3774, McGrawHill, New York.; Eng et al., *Am. J. Hum. Genet.* 1993; 53: 1186-1197; Eng et al., *Mol. Med.* 1997; 3:174-182; and Davies et al., *Bur. J. Hum. Genet.* 1996; 4: 219-224). Hasta la fecha, se ha informado de diversas mutaciones sin sentido, anti sentido y de empalme, además de pequeñas deleciones e inserciones y reordenamientos genéticos más grandes.

La enfermedad de Gaucher es una deficiencia de la enzima lisosómica β -glucocerebrosidasa que descompone los glucocerebrósidos grasos. La grasa luego se acumula, principalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea. La enfermedad de Gaucher puede provocar dolor, fatiga, ictericia, daño óseo, anemia e incluso la muerte. Existen tres fenotipos clínicos de la enfermedad de Gaucher. En los pacientes Tipo 1 se manifiesta temprano en la vida adulta o la juventud, se magullan fácilmente y experimentan fatiga debido a la anemia, la disminución de plaquetas sanguíneas, el agrandamiento del hígado y del bazo, el debilitamiento del esqueleto y, en algunos casos, tienen insuficiencia pulmonar y renal. No hay signos de afectación cerebral. En el tipo II, el agrandamiento del hígado y del bazo de inicio precoz ocurre a los 3 meses de edad y existe una afectación cerebral extensa. Hay una alta tasa de mortalidad a los 2 años. El tipo III se caracteriza por el agrandamiento del hígado y del bazo y ataques cerebrales. El gen de la β -glucocerebrosidasa se encuentra en el cromosoma 1q21 humano. Su precursor proteico contiene 536 aminoácidos y la proteína madura tiene una longitud de 497 aminoácidos.

La enfermedad de Gaucher es considerablemente más común en los descendientes de personas judías de Europa del Este (Ashkenazi), aunque pueden verse afectadas personas de cualquier grupo étnico. Entre la población judía Ashkenazi, la enfermedad de Gaucher es el trastorno genético más común, con una incidencia de aproximadamente 1 de cada 450 personas. En el público en general, la enfermedad de Gaucher afecta aproximadamente a 1 de cada 100.000 personas. Según la National Gaucher Foundation, 2.500 estadounidenses padecen la enfermedad de Gaucher.

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la deficiencia enzimática humana ligada a X más común. La enzima G6PD cataliza una reacción de oxidación/reducción esencial para la producción de ribosa, que es un componente esencial tanto del ADN como del ARN. G6PD también participa en el

mantenimiento de niveles adecuados de NADPH dentro de la célula. El NADPH es un cofactor requerido en muchas reacciones biosintéticas. Las personas con esta deficiencia tienen síntomas clínicos que incluyen ictericia neonatal, dolor abdominal y/o de espalda, mareos, dolor de cabeza, disnea (respiración irregular) y palpitaciones.

- 5 Otros ejemplos de enfermedades susceptibles de terapia de reemplazo proteico que pueden tratarse con la composición farmacéutica aquí descrita, por ejemplo con una composición farmacéutica que comprende un ARNm modificado de acuerdo con una o más de las realizaciones aquí descritas, incluyen:

10 trastornos de la enfermedad de almacenamiento lisosómico, por ejemplo deficiencia de activador/GM2, gangliosidosis, alfa-manosidosis, aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de colesterol éster, deficiencia crónica de hexosaminidasa A, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis, enfermedad de Gaucher Tipo I, II, III; gangliosidosis GM1, enfermedad crónica de células I/mucopolidosis II infantil/infantil tardía/juvenil/adulta, enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre infantil/ISSD, deficiencia de hexosaminidasa A juvenil, enfermedad de Krabbe, deficiencia de lipasa ácida lisosómica infantil/de inicio tardío, inicio temprano, leucodistrofia metacromática de inicio tardío, trastornos de 15 mucopolisacaridosis, polidistrofia pseudo-Hurler/Mucopolidosis IIIA, síndrome de Hurler MPSI, síndrome de Scheps MPSI, síndrome de Hurler-Scheie MPS I, síndrome de Hunter MPS II, síndrome de Sanfilippo Tipo A/MPS III A, síndrome de Sanfilippo Tipo B/MPS III B, síndrome de Sanfilippo tipo C/MPS III C, síndrome de Sanfilippo tipo D/MPS III D, Morquio tipo A/MPS IVA, Morquio tipo B/MPS IVB, deficiencia de hialuronidasa MPS IX, Maroteaux-Lamy MPS VI, Síndrome de Sly MPS VII, mucopolidosis I/sialidosis, mucopolidosis IIIC, 20 mucopolidosis tipo IV, deficiencia de sulfatasa múltiple, enfermedad de Niemann-Pick Tipo A/Tipo B/Tipo C, lipofuscinosis neuronal ceroid, enfermedad CLN6, enfermedad juvenil Batten-Spielmeier-Vogt/juvenil NCL/CLN3 infantil variante infantil tardía atípica/juvenil temprana, variante finlandesa de la CLN5 infantil tardía, enfermedad de Jansky-Bielschowsky/enfermedad CLN2 / TPP1 infantil tardía, enfermedad de Kufs/ NCL/CLN4 del adulto, epilepsia del norte/ CLN8 variante tardía infantil, Santavuori-Haltia/CLN1 infantil/enfermedad PPT, 25 beta-manosidosis, enfermedad de Pompe/enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, picnodisostosis, enfermedad de Sandhoff/temprana del adulto/gangliosidosis GM2, enfermedad de Sandhoff/gangliosidosis GM2 - infantil, enfermedad de Sandhoff /GM2 gangliosidosis - juvenil, enfermedad de Schindler, enfermedad de Salla/enfermedad de almacenamiento de ácido siálico, gangliosidosis Tay-Sachs/GM2, enfermedad de Wolman y/o

30 trastornos del metabolismo de los aminoácidos, por ejemplo alcaptonuria, aspartilglucosaminuria, acidemia metilmalónica, enfermedad de la orina de jarabe de arce, homocistinuria, tirosinemia, trimetilaminuria, enfermedad de Hartnup, deficiencia de biotinidasa, deficiencia de ornitina carbamoiltransferasa, enfermedad de deficiencia de carbamoil-fosfato-sintasa I, citrulinemia, hiperargininemia, hiperhomocisteinemia, hipermetioninemia, hiperlisinemias, hiperglicinemia no cetósica, acidemia de propiónico, hiperprolinemia y/o

35 trastornos del metabolismo de los carbohidratos, por ejemplo intolerancia a la lactosa, otros trastornos del metabolismo de los carbohidratos, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo I (enfermedad de von Gierke), enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (enfermedad de Pompe), enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo III, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo IV, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo V (enfermedad de McArdle), trastornos del metabolismo de la fructosa, fructosuria esencial, deficiencia de fructosa-1,6- 40 difosfatasa, intolerancia hereditaria a la fructosa, trastornos del metabolismo de la galactosa, galactosemia, deficiencia de galactoquinasa, trastornos de la absorción intestinal de carbohidratos, por ejemplo malabsorción de glucosa-galactosa, deficiencia de sacarasa, trastornos del metabolismo del piruvato y gluconeogénesis, por ejemplo deficiencia de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, deficiencia de piruvato carboxilasa, deficiencia de 45 piruvato deshidrogenasa, otros trastornos del metabolismo de carbohidratos, tales como pentosuria esencial, oxalosis, oxaluria, glucosuria renal y/o trastornos de la biosíntesis de lípidos y colesterol, tales como hipercolesterolemia pura, hipercolesterolemia familiar, hiperlipoproteínaemia de Fredrickson tipo IIa, hiperbetalipoproteínaemia, hiperlipidemia, grupo A, hiperlipoproteínaemia de tipo baja-densidad lipoproteica (LDL), hiperglucéridemia, hiperglucéridemia endógena, hiperlipoproteínaemia de Fredrickson tipo IV, 50 hiperlipidemia grupo B, hiperprebetalipoproteínaemia de tipo muy baja-densidad-lipoproteica (VLDL) hiperlipoproteínaemia y/o

acidosis láctica causada, por ejemplo, por deficiencia de glucosa-6-fosfatasa, deficiencia de fructosa 1,6-difosfatasa, deficiencia de piruvato-deshidrogenasa, deficiencia de piruvato-carboxilasa y/o

55 enfermedades de almacenamiento de glucógeno (GSD), por ejemplo GSD tipo I, GSD tipo II, GSD tipo III, GSD tipo IV, GSD tipo V, GSD tipo VI, GSD tipo VII, GSD tipo VIII, GSD tipo IX, GSD tipo X, GSD tipo XI y/o

trastornos mitocondriales, por ejemplo Síndrome de Kearns-Sayre, encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a derrames cerebrales (síndrome MELAS), síndrome de encefalopatía

neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE), mioclonus con epilepsia y con fibras rojas irregulares (síndrome MERRF), neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (síndrome NARP) y/o

trastornos de ácidos orgánicos, por ejemplo acidemia glutárica tipo 1, tipo 2, hiperlisinemia, acidemia pipecólica, sacaropinuria y/o trastornos del ciclo de la urea, por ejemplo citrulinemia, hiperamonemia.

5 Además de los trastornos hereditarios, la composición farmacéutica aquí descrita puede usarse en y/o para ayudar en el tratamiento de otras deficiencias enzimáticas que se derivan del daño a un tejido u órgano como resultado de trastornos primarios o secundarios. Por ejemplo, el daño al tejido pancreático o la pancreatitis son causadas por el alcoholismo y producen una deficiencia de las enzimas pancreáticas necesarias para la digestión. La pancreatitis se está tratando actualmente con terapia de reemplazo enzimático.

10 Además de los trastornos caracterizados por deficiencias de proteínas, la composición farmacéutica aquí descrita puede tratar algunos trastornos para reemplazar proteínas con el fin de mejorar o estimular los procesos biológicos. Por ejemplo, actualmente a los individuos con anemia se les administra eritropoyetina recombinante (EPOGEN®, PROCRI®, EPOIETIN®) para estimular la producción de glóbulos rojos y aumentar el transporte de oxígeno a los tejidos. Además, se administran los interferones recombinantes, como el interferón alfa 2b (INTRON A®, PEG-INTRON® o REBETOL®) y el interferón beta 1a (AVONEX®, BETASERON®) para tratar la hepatitis B y la esclerosis múltiple, respectivamente. Aún otras proteínas administradas son la desoxirribonucleasa humana recombinante I (rhDNase-PULMOZYME®), una enzima que divide selectivamente el ADN utilizado para mejorar la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística; hormona estimulante de la tiroides recombinante (THYROGEN®) desarrollada para su uso en pacientes con

15

20 cáncer de tiroides que han tenido tiroidectomía casi total o total y que, por tanto, deben tomar hormonas tiroideas; G-CSF recombinante (NEUPOGEN®) para tratar la neutropenia de la quimioterapia y enzimas digestivas en individuos con pancreatitis. Así, la composición farmacéutica aquí descrita puede emplearse en el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente.

25 Además, la composición farmacéutica puede emplearse en el tratamiento y/o ayudar en el tratamiento de la deficiencia de hormona de crecimiento, por ejemplo deficiencia de la hormona del crecimiento relacionada con la hipófisis, deficiencia de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH). Por consiguiente, la composición farmacéutica puede emplearse para tratar o ayudar en el tratamiento de dichas enfermedades.

La composición farmacéutica aquí descrita que comprende el ARNm modificado de acuerdo con una o más realizaciones del método de la invención también se pueden usar en otras áreas de la terapia de reemplazo

30 proteico, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer con anticuerpos, con un sitio activo altamente específico y bien definido. Así, la composición farmacéutica puede comprender un ARNm modificado como se describe aquí que codifica para un anticuerpo para su uso en el tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas. Los anticuerpos codificados por el ARNm modificado comprendido en la composición farmacéutica pueden ser, por ejemplo, cualquier tipo de anticuerpo; sin embargo, en una

35 realización preferente, el anticuerpo codificado es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), preferiblemente un intracuerpo.

El término "intracuerpo" o "intracuerpos" tal como se usa aquí se refiere a anticuerpos expresados intracelularmente. Por ejemplo, los anticuerpos completos, cadenas pesadas, fragmentos Fab', anticuerpos de

40 cadena sencilla y los diacuerpos se pueden usar como intracuerpos, preferiblemente el intracuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.

La composición farmacéutica que comprende un ARNm modificado aquí descrito que codifica un anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), se puede administrar a un paciente que lo necesite, preferiblemente se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica. El

45 cáncer puede incluir, por ejemplo, cáncer de mama, de colon, de ovario, de endometrio, gástrico, pancreático, de próstata y de la glándula salival. La administración de la composición farmacéutica puede ser vía cualquiera de diversos métodos convenientes, incluyen, por ejemplo, la administración inyectable sistémica, inyección en un tumor o tejido canceroso, la administración oral.

De acuerdo con otra realización, la presente descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto que necesita terapia de reemplazo proteico que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad

50 farmacéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de acuerdo con una o más realizaciones aquí descritas o con una cantidad efectiva del ARNm modificado, que se ha modificado de acuerdo con una o más de las realizaciones del método inventivo.

El modo y el método de administración y la dosificación de la composición farmacéutica aquí descrita depende de varios factores, por ejemplo de la naturaleza de la enfermedad a tratar, también del peso corporal, la edad

55 y el sexo del paciente y de la vía de administración de la composición farmacéutica de la invención.

La composición farmacéutica aquí descrita puede administrarse a un individuo que lo necesite, por ejemplo un paciente, por cualquier vía de administración adecuada, tal como vía oral, tópica, rectal, vaginal, dérmica, intratumoral, nasal, administración lingual, parenteral o administración por inhalación, insuflación, inyección, infusión o enema.

- 5 Además, el método de tratamiento aquí descrito puede comprender la administración oral, tópica, rectal, vaginal, dérmica, intratumoral, nasal, lingual, parenteral o la administración por inhalación, insuflación, inyección, infusión o enema. Las vías de administración preferentes son la administración oral y parenteral, tal como inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranodal, intralinfática, intratumoral o intraperitoneal o la administración transdérmica.
- 10 También se describe aquí un método para expresar un péptido, polipéptido o proteína biológicamente activo en un tejido *in vivo*, comprendiendo el método poner en contacto al paciente con una composición farmacéutica de acuerdo con una o más de las realizaciones anteriores o poner en contacto al paciente con el ARNm modificado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores, donde la administración de la composición farmacéutica o del ARNm modificado da como resultado una respuesta inmune innata reducida por parte del paciente en relación con un paciente en contacto con la molécula de ARNm de tipo natural que codifica el mismo polipéptido o proteína. Típicamente, el nivel de expresión de ARNm *in vivo* aumenta por el ARNm diana modificado aquí descrito en comparación con el ARNm de tipo natural.
- 15

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 SEQ ID NO: 1 R873, ARNm de tipo natural de luciferasa de *Photinus pyralis*
- SEQ ID NO: 2 R875, secuencia de ARNm enriquecida en G/C
- SEQ ID NO: 3 R2103, secuencia de ARNm enriquecida en C
- SEQ ID NO: 4 R2349, secuencia de ARNm enriquecida en G/C
- SEQ ID NO: 5 R2350, secuencia de ARNm optimizada en C
- 25 SEQ ID NO: 6 R2791, secuencia de ARNm enriquecida en G/C
- SEQ ID NO: 7 R2793, secuencia de ARNm optimizada en C

Ejemplos

Ejemplo 1: preparación de ARNm

1. Preparación de constructos de ADN y ARNm

- 30 Para los presentes ejemplos, se prepararon secuencias de ADN que codifican para la luciferasa de *Photinus pyralis* y se usaron para posteriores reacciones de transcripción *in vitro*.

Según una primera preparación, se prepararon las secuencias de ADN que codifican los ARNm mostrados en la Tabla 1.

- 35 Las secuencias enriquecidas en G/C de los ejemplos proporcionados se obtuvieron según el método descrito en la WO2002098443 A2. La región codificante de ARNm modificado enriquecida en C se obtuvo por el método de la presente invención. Sin embargo, alternativamente, el ARNm enriquecido en C de los ejemplos incluidos también se puede obtener de acuerdo con la realización alternativa como se describe anteriormente, es decir, en un primer paso, se puede aumentar el contenido en G/C, por ejemplo mediante la sustitución de codones de tipo natural que tienen un contenido inferior de nucleótidos G y C como se describe en la WO2002098443 A2. Como segundo paso, el enriquecimiento o maximización de G/C es seguido por un paso de mayor optimización de C.
- 40

- 45 Se construyó un vector para la transcripción *in vitro* que contiene un promotor T7 seguido de una secuencia que codifica para la luciferasa *Photinus pyralis* (PpLuc(wt), obtenida de Promega) y una secuencia poli(A) de 70 nucleótidos de adenosina (secuencia poli(A) A70). El ARNm obtenido de este vector por transcripción *in vitro* se designa "PpLuc (wt) - A70" (R873). En la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) se muestra la secuencia del correspondiente ARNm de luciferasa de tipo natural.

- 50 El vector se modificó reemplazando la secuencia de codificación de tipo natural del ARNm por una secuencia de codificación enriquecida en GC (R875, Figura 2, SEQ ID NO: 2) o enriquecida en C (R2103, Figura 3, SEQ ID NO: 3), respectivamente, para la estabilización. El ARNm se obtuvo de estos vectores por transcripción *in vitro*.

Se construyó otro vector adicional para la transcripción *in vitro* que contiene un promotor T7 seguido de una secuencia enriquecida en GC que codifica para la luciferasa de *Photinus pyralis* (PpLuc(GC)III) y una secuencia poli(A) A64. El vector se modificó reemplazando la secuencia de codificación optimizada en GC por una secuencia enriquecida en C.

- 5 El ARNm obtenido de estos vectores por transcripción *in vitro* se designa "PpLuc(GC)III - A64" (R2349) o "PpLuc(GC)V - A64" (R2350), respectivamente. En las SEQ ID NO: 4 (Figura 4) y SEQ ID NO: 5 (Figura 5) se muestran las secuencias de los correspondientes ARNm.

- 10 Se prepararon otros dos vectores introduciendo una 5'-TOP-UTR derivada de la proteína ribosómica 32L, modificando la secuencia de codificación de tipo natural mediante la introducción de una secuencia optimizada en GC o en C para la estabilización, seguida de una secuencia estabilizadora derivada de la 3'-UTR-albúmina, un tramo de 64 adenosinas (secuencia poli(A)), un tramo de 30 citidinas (secuencia poli(C)) y un tallo-bucle de histona. El ARNm obtenido de estos vectores por transcripción *in vitro* se designa R2791 o R2793, respectivamente. En las SEQ ID NO: 6 (Figura 6) y SEQ ID NO: 7 (Figura 7) se muestran las secuencias de los correspondientes ARNm.

15 Tabla 1: Constructos de ARNm de luciferasa

Número R	SEQ ID NO.	Constructo	Composición de ARN completo		
			Base	Número	%
R873	SEQ ID NO. 1	ppLuc (wt)..A70	A C G T	534 371 418 435	30,4 21,1 23,8 24,7
R875	SEQ ID NO. 2	ppLuc (GC) II..A70	A C G T	405 579 517 257	23,0 32,9 29,4 14,6
R2103	SEQ ID NO. 3	ppLuc (GC) V..A70	A C G T	390 710 386 272	22,2 40,4 22,0 15,5
R2349	SEQ ID NO. 4	PpLuc (GC) III..A64	A C G T	397 600 492 257	22,7 34,4 28,2 14,7
R2350	SEQ ID NO. 5	PpLuc (GC) V..A64	A C G T	382 709 385 270	21,9 40,6 22,1 15,5
R2791	SEQ ID NO. 6	32L4 .. PpLuc (GC) II..albumin7 .. A64 .. C30-histoneSL-N5	A C G T	476 668 556 335	23,4 32,8 27,3 16,5
R2793	SEQ ID NO. 7	32L4 .. PpLuc (GC) V..albumin7 .. A64 .. C30-histoneSL-N5	A C G T	461 799 425 350	22,7 39,3 20,9 17,2

2. Transcripción *in vitro*

Los respectivos plásmidos de ADN preparados según el párrafo 1 se transcribieron *in vitro* usando polimerasa T7 en presencia de un análogo de CAP (m⁷GpppG). Posteriormente, el ARNm se purificó usando PureMessenger® (CureVac, Tübingen, Alemania; WO2008/077592A1).

20 3. Reactivos

Reactivo de complejación: protamina

4. Formulación de ARNm

El ARNm se complejó con protamina mediante la adición de protamina al ARNm en la proporción ARN:protamina 2:1 (p/p).

5 Ejemplo 2: Inmunoestimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tratadas con ARNm modificados

Preparación de PBMC humanos

25 ml de una capa leucocitaria se dispusieron en capas sobre 20 ml de Ficoll en un tubo Falcon de 50 ml. Después de centrifugación a 805 fuerza centrifuga relativa (rcf) durante 20 minutos, se recogieron las células de la interfase. Las células se lavaron dos veces mediante resuspensión en PBS y centrifugación. Después del conteo, las células se resuspendieron a 50 millones de células por ml en suero de ternera fetal, DMSO al 10%, y se congelaron.

Estimulación de PBMC

Se sembraron PBMC humanas a una densidad de 10^6 células/ml en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (2×10^5 células/pocillo) en medio X - Vivo 15 (Lonza) y se trataron con 10 μ g/ml de ARNm enriquecido con GC o C durante 20 horas y se determinó la concentración de TNF α en el sobrenadante mediante ELISA.

ELISA de citocinas (TNF α)

Se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos con anticuerpo de captura (BD Pharmingen) en tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 15 mM, NaN₃ al 0,02%, pH 9,6) durante una noche a temperatura ambiente. Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS, Tween-20 al 0,05%, BSA al 1%, pH 7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces (PBS, Tween-20 al 0,05%, pH 7,4). Se añadieron a las placas 50 μ l de sobrenadantes de PBMC estimuladas, diluidos con 50 μ l de tampón de bloqueo, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces. Se añadió anticuerpo de detección biotinilado diluido en tampón de bloqueo a las placas y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces. Se añadió a las placas HRP-estreptavidina diluida en tampón de bloqueo sin NaN₃ y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces. Se añadieron 100 μ l/pocillo de sustrato TMB (Perbioscience) a las placas. Para detener el desarrollo del color, se añadieron 100 μ l de H₂SO₄ al 20% a las placas. Se midió la absorbancia a 450 nm.

Transfección de células HeLa y determinación de la actividad de la luciferasa

Las células HeLa se tripsinizaron y se lavaron en medio opti-MEM (Life Technologies). Las células se electroporaron con ARNm que codifica PpLuc en un volumen de 200 μ l. Las células electroporadas se sembraron en placas de 24 pocillos en 1 ml de medio RPMI 1640 (entre 0,3 y 0,5 μ g de ARNm de PpLuc y 100.000 células por pocillo). 6, 24 o 48 horas después de la transfección, se aspiró el medio y se lisaron las células. Los lisados se almacenaron a -80 °C. La actividad de luciferasa se midió como unidades de luz relativas (RLU) en un lector de placas BioTek SynergyHT. La actividad de PpLuc se midió en tiempos de medida de 5 segundos usando 50 μ l de lisado y 200 μ l de tampón de luciferina (luciferina 75 μ M, glicilglicina 25 mM, pH 7,8 (NaOH), MgSO₄ 15 mM, ATP 2 mM).

Resultados

La Figura 8 muestra que el tratamiento de PBMC humanas con ARNm enriquecido en C (R2793) da como resultado una secreción de TNF α significativamente menor en comparación con el tratamiento con ARNm enriquecido con GC (R2791).

La Figura 9A muestra que la actividad de luciferasa codificada por ARNm enriquecido con GC (R875) y ARNm enriquecido con C (R2103) era comparable tanto en términos de nivel máximo como de cinética.

La Figura 9B muestra que la actividad de luciferasa codificada por ARNm enriquecido con GC (R875) era mucho mayor que la del constructo de tipo natural (R873).

Ejemplo 3: Relación dosis-respuesta para la inmunoestimulación de PBMC tratadas con ARNm modificados

Estimulación PBMC

- Las PBMC humanas se prepararon como se describe en el Ejemplo 2. Se sembraron las PBMC a una densidad de 10^6 células/ml en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (2×10^5 células/pocillo) en medio X-Vivo 15 (Lonza) y se trataron con 40 o 20 $\mu\text{g/ml}$ de ARNm enriquecido con GC o C como se indica durante 20 horas.
- 5 Se determinaron las concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\alpha$ en el sobrenadante mediante ELISA.

ELISA de citocinas

El ELISA para $\text{TNF}\alpha$ se realizó como se describe en el Ejemplo 2. El ELISA de $\text{IFN}\alpha$ se realizó de forma análoga, reemplazando los anticuerpos de captura y detección de manera apropiada (Mabtech).

Resultados

- 10 La Figura 10 muestra la relación dosis-respuesta para la secreción de $\text{TNF}\alpha$ de PBMC humanas tratadas con diversos ARNm modificados. Como puede verse, el tratamiento con ARNm enriquecido en C da como resultado una menor secreción de $\text{TNF}\alpha$ que con ARNm enriquecido con GC.
- 15 La Figura 11 muestra la relación dosis-respuesta para la secreción de IFN de PBMC humanas tratadas con diversos ARNm modificados. Como puede verse, el tratamiento con ARNm enriquecido en C da como resultado una menor secreción de IFN que con ARNm enriquecido con GC.

ES 2 806 575 T3

Tabla 2

Resumen de la composición de nucleótidos y uso de codones de los constructos empelados en los presentes ejemplos

Uso codón humano	Código GC-normalizado	ppLuc(GC)	PpLuc(wt)	ppLuc(GC) II	ppLuc(GC) III	ppLuc(GC)V
		G: 542 A: 333 T: 240 C: 538	G: 410 A: 454 T: 426 C: 363	G: 507 A: 324 T: 249 C: 573	G: 483 A: 324 T: 251 C: 595	G: 376 A: 309 T: 264 C: 704
		Codones raros 41 CAI: 0,185	Codones raros 45 CAI: 0,222	Codones raros 24 CAI: 0,193	Codones raros 0 CAI: 0,190	Codones raros 0 CAI: 0,365
AA cod frac /1000	AA cod frac	cod número frac	cod número frac	cod número frac	cod número frac	cod num frac
Ala GCG 0.10 7.4 Ala GCA 0.22 15.8 Ala GCT 0.28 18.5 Ala GCC 0.40 27.7 Cys TGT 0.42 10.6 Cys TGC 0.58 12.6 Asp GAT 0.44 21.6 Asp GAC 0.56 25.1 Glu GAG 0.59 39.6 Glu GAA 0.41 29.0 Phe TTT 0.43 17.6 Phe TTC 0.57 20.3 Gly GGG 0.23 16.5 Gly GGA 0.26 16.5 Gly GGT 0.18 10.8 Gly GGC 0.33 22.2 His CAT 0.41 10.9 His CAC 0.59 15.1 Ile ATA 0.14 7.5 Ile ATT 0.35 16.0 Ile ATC 0.52 20.8 Lys AAG 0.60 31.9 Lys AAA 0.40 24.4 Leu TTG 0.12 12.9 Leu TTA 0.06 7.7 Leu CTG 0.43 39.6 Leu CTA 0.07 7.2 Leu CTT 0.12 13.2 Leu CTC 0.20 19.6 Met ATG 1.00 22.0 Asn AAT 0.44 17.0 Asn AAC 0.56 19.1 Pro CCG 0.11 6.9 Pro CCA 0.27 16.9 Pro CCT 0.29 17.5 Pro CCC 0.33 19.8 Gln CAG 0.73 34.2 Gln CAA 0.27 12.3 Arg AGG 0.22 12.0 Arg AGA 0.21 12.1 Arg CGG 0.19 11.4 Arg CGA 0.10 6.2 Arg CGT 0.09 4.5 Arg CGC 0.19 10.4 Ser AGT 0.14 12.1 Ser AGC 0.25 19.5 Ser TCG 0.06 4.4 Ser TCA 0.15 12.2 Ser TCT 0.18 15.2 Ser TCC 0.23 17.7 Thr ACG 0.12 6.1 Thr ACA 0.27 15.1 Thr ACT 0.23 13.1 Thr ACC 0.38 18.9 Val GTG 0.48 28.1 Val GTA 0.10 7.1 Val GTT 0.17 11.0 Val GTC 0.25 14.5 Trp TGG 1.00 13.2	Ala GCG 0.20 Ala GCA 0.00 Ala GCT 0.00 Ala GCC 0.80 Cys TGT 0.00 Cys TGC 1.00 Asp GAT 0.00 Asp GAC 1.00 Glu GAG 1.00 Glu GAA 0.00 Phe TTT 0.00 Phe TTC 1.00 Gly GGG 0.41 Gly GGA 0.00 Gly GGT 0.00 Gly GGC 3.59 His CAT 0.00 His CAC 1.00 Ile ATA 0.00 Ile ATT 0.00 Ile ATC 1.00 Lys AAG 1.00 Lys AAA 0.00 Leu TTG 0.00 Leu TTA 0.00 Leu CTG 0.68 Leu CTA 0.00 Leu CTT 0.00 Leu CTC 0.32 Met ATG 1.00 Asn AAT 0.00 Asn AAC 1.00 Pro CCG 0.25 Pro CCA 0.00 Pro CCT 0.00 Pro CCC 0.75 Gln CAG 1.00 Gln CAA 0.00 Arg AGG 0.00 Arg AGA 0.00 Arg CGG 0.50 Arg CGA 0.00 Arg CGT 0.00 Arg CGC 0.50 Ser AGT 0.00 Ser AGC 0.52 Ser TCG 0.00 Ser TCA 0.00 Ser TCT 0.00 Ser TCC 0.48 Thr ACG 0.24 Thr ACA 0.00 Thr ACT 0.00 Thr ACC 0.76 Val GTG 0.66 Val GTA 0.00 Val GTT 0.00 Val GTC 0.34 Trp TGG 1.00	GCG 7.00 0.16 GCA 0.00 0.00 GCT 0.00 0.00 GCC 36.00 0.84 TGT 0.00 0.00 TGC 4.00 1.00 GAT 0.00 0.00 GAC 15 2.7 GAG 10 1.8 GAA 23 4.2 TTT 15 2.7 TTC 15 2.7 GAG 33.00 1.00 GAA 0.00 0.00 TTT 0.00 0.00 TTC 30.00 1.00 CAT 8 1.5 CAC 6 1.1 ATA 4 0.7 ATT 18 3.3 ATC 17 3.1 AAG 19 3.5 AAA 20 3.6 TTG 11 2.0 TTA 5 0.9 CTG 19 3.5 CTA 3 0.5 CTT 5 0.9 CTC 8 1.5 ATG 14 2.5 AAT 8 1.5 AAC 9 1.6 CCG 7 1.3 CCA 7 1.3 CCT 7 1.3 CCC 8 1.5 TTG 0.00 0.00 TTA 0.00 0.00 CTG 42.00 0.82 CTA 0.00 0.00 CTT 0.00 0.00 CTC 9.00 0.18 ATG 14.00 1.00 AAT 0.00 0.00 AAC 17.00 1.00 CCG 24.00 0.83 CCA 0.00 0.00 CCT 0.00 0.00 CCC 5.00 0.17 CAG 16.00 1.00 CAA 0.00 0.00 GCG 11 2.0 GCA 7 1.3 GCT 12 2.2 GCC 13 2.4 TGT 2 0.4 TGC 2 0.4 GAT 17 3.1 GAC 15 2.7 GAG 10 1.8 GAA 23 4.2 TTT 15 2.7 TTC 15 2.7 GGG 6 1.1 GGA 17 3.1 GGT 13 2.4 GGC 10 1.8 CAT 8 1.5 CAC 6 1.1 ATA 4 0.7 ATT 18 3.3 ATC 17 3.1 AAG 19 3.5 AAA 20 3.6 TTG 11 2.0 TTA 5 0.9 CTG 19 3.5 CTA 3 0.5 CTT 5 0.9 CTC 8 1.5 ATG 14 2.5 AAT 8 1.5 AAC 9 1.6 CCG 7 1.3 CCA 7 1.3 CCT 7 1.3 CCC 8 1.5 CAG 5 0.9 CAA 11 2.0 AGG 4 0.7 AGA 10 1.8 CGG 1 0.2 CGA 2 0.4 CGT 1 0.2 CGC 2 0.4 AGT 5 0.9 AGC 2 0.4 TCG 3 0.5 TCA 1 0.2 TCT 10 1.8 TCC 7 1.3 ACG 5 0.9 ACA 9 1.6 ACT 8 1.5 ACC 7 1.3 GTG 15 2.7 GTA 4 0.7 GTT 17 3.1 GTC 9 1.6 TGG 2 0.4	GCG 9.00 0.21 GCA 0.00 0.00 GCT 0.00 0.00 GCC 34.00 0.79 TGT 0.00 0.00 TGC 4.00 1.00 GAT 0.00 0.00 GAC 32.00 1.00 TGT 0.00 0.00 TGC 4.00 1.00 GAG 33.00 1.00 GAA 0.00 0.00 GAT 0.00 0.00 GAC 32.00 1.00 GAG 19.00 0.41 GGA 0.00 0.00 GGT 0.00 0.00 GGC 27.00 0.59 CAT 0.00 0.00 CAC 14.00 1.00 ATA 0.00 0.00 ATT 0.00 0.00 ATC 39.00 1.00 TTG 0.00 0.00 TTA 0.00 0.00 CTG 34.00 0.67 CTA 0.00 0.00 CTT 0.00 0.00 CTC 17.00 0.33 ATG 14.00 1.00 GGA 0.00 0.00 GAT 0.00 0.00 AAC 17.00 1.00 CCG 0.00 0.00 CCA 0.00 0.00 CCT 2.00 0.07 CCC 27.00 0.93 CAG 16.00 1.00 CAA 0.00 0.00 AGG 0.00 0.00 AGA 0.00 0.00 CGG 10.00 0.50 CGA 0.00 0.00 CGT 0.00 0.00 CGC 10.00 0.50 AGT 0.00 0.00 AGC 15.00 0.54 TCG 0.00 0.00 TCA 0.00 0.00 TCT 0.00 0.00 TCC 13.00 0.46	GCG 0 0.00 GCA 0 0.00 GCT 0 0.00 GCC 43 1.00 TGT 0 0.00 TGC 4 1.00 GAT 0 0.00 GAC 32 1.00 GAG 33 1.00 GAA 0 0.00 TTT 0 0.00 TTC 30 1.00 CAT 0 0.00 CAC 0 0.00 GAT 0 0.00 GAC 14 1.00 ATA 0 0.00 ATT 0 0.00 ATC 39 1.00 TTG 0 0.00 TTA 0 0.00 CTG 39 1.00 CTA 0 0.00 CTT 0 0.00 CTC 51 1.00 ATG 14 1.00 AAT 0 0.00 AAC 17 1.00 CCG 0 0.00 CCA 0 0.00 CCT 0 0.00 CCC 29 1.00 CAG 16 1.00 CAA 0 0.00		

ES 2 806 575 T3

Tyr TAT 0.42 12.2	Tyr TAT 0.00	AGG 0.00 0.00	TAC 11 2.0	AGG 39.00	ACG 0.00 0.00	AGG 0 0.00
Tyr TAC 0.58 15.3	Tyr TAC 1.00	AGA 0.00 0.00	TAT 8 1.5	1.00	ACA 0.00 0.00	AGA 0 0.00
Stop TGA 0.61 1.6	End TGA 0.78	CGG 16.00 0.80	TAA 1	AAA 0.00 0.00	ACT 0.00 0.00	CGG 0 0.00
Stop TAG 0.17 0.8	End TAG 0.22	CGA 0.00 0.00			ACC 29.00 1.00	CGA 0 0.00
Stop TAA 0.22 1.0	End TAA 0.00	CGT 0.00 0.00		TTG 0.00 0.00	GTG 29.00 0.64	CGT 0 0.00
		<u>CGC 4.00 0.20</u>		TTA 0.00 0.00	GTA 0.00 0.00	CGC 20 1.00
		AGT 0.00 0.00		CTG 34.00	GTT 0.00 0.00	
		<u>AGC 23.00 0.82</u>		0.67	GTC 16.00 0.36	AGT 0 0.00
		<u>TCG 5.00 0.18</u>		CTA 0.00 0.00	TGG 2.00 1.00	AGC 0 0.00
		TCA 0.00 0.00		CTT 0.00 0.00	TAT 1.00 0.05	TCG 0 0.00
		TCT 0.00 0.00		CTC 17.00	TAC 18.00 0.95	TCA 0 0.00
		<u>TCC 0.00 0.00</u>		0.33	TGA 1.00 1.00	TCT 0 0.00
		ACG 5.00 0.17		ATG 14.00	TAG 0.00 0.00	TCC 20 1.00
		ACA 0.00 0.00		1.00	TAA 0.00 0.00	ACG 0 0.00
		ACT 0.00 0.00				ACA 0 0.00
		ACC 24.00 0.83				ACT 0 0.00
		GTG 37.00 0.82				ACC 29 1.00
		GTA 0.00 0.00		AAT 0.00 0.00		GTG 0 0.00
		GTT 0.00 0.00		AAC 17.00		GTA 0 0.00
		GTC 8.00 0.18		1.00		GTT 0 0.00
		TGG 2.00 1.00				GTC 45 1.00
		TAT 0.00 0.00		CCG 8.00		TGG 2 1.00
		TAC 19.00 1.00		0.28		TAT 1 0.05
		TGA 0.00 0.00		CCA 0.00 0.00		TAC 18 0.95
		TAG 0.00 0.00		CCT 0.00 0.00		TGA 1 1.00
		TAA 1.00 1.00		CCC 21.00		TAG 0 0.00
				0.72		TAA 0 0.00
				CAG 16.00		
				1.00		
				CAA 0.00 0.00		
				AGG 0.00 0.00		
				AGA 0.00 0.00		
				CGG 10.00		
				0.50		
				CCA 0.00 0.00		
				CGT 0.00 0.00		
				CBC 10.00		
				0.50		
				AGT 0.00 0.00		
				AGC 15.00		
				0.54		
				TCG 0.00 0.00		
				TCA 0.00 0.00		
				TCT 0.00 0.00		
				TCC 13.00		
				0.46		
				ACG 7.00		
				0.24		
				ACA 0.00 0.00		
				ACT 0.00 0.00		
				ACC 22.00		
				0.76		

ES 2 806 575 T3

				GTG 29.00 0.64 GTA 0.00 0.00 GTT 0.00 0.00 CTC 16.00 0.36 TGS 2.00 1.00 TAT 1.00 0.05 TAC 18.00 0.95 TGA 1.00 1.00 TAG 0.00 0.00 TAA 0.00 0.00		
--	--	--	--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> CureVac GmbH	
	<120> ARNm modificado con propiedades inmunoestimuladoras disminuidas	
	<130> CU01P154WO1	
5	<160> 7	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 1758	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Luciferasa de Photinus pyralis	
	<400> 1	
	gggagaugua caaagcuuac cauggaagac gccaaaaaca uaaagaaagg cccggcgcca	60
	uucuauccgc uggaagaugg aaccgcugga gagcaacugc auaaaggcuau gaagagauac	120
	gcccugguuc cuggaacaau ugcuuuuaca gaugcacaua ucgaggugga caucacuac	180
	gcugaguacu ucgaaauguc cguucgguug gcagaagcua ugaaacgaua ugggcugaau	240
	acaaaucaca gaaucgucgu augcagugaa aacucucuuc aaucuuuuau gccgguguug	300
	ggcgcguuau uuauccgagu ugcaguugcg cccgcgaacg acuuuuauaa ugaacgugaa	360
	uugcucaaca guaugggcgu uucgcagccu accguggugu ucguuuccaa aaagggguug	420
	caaaaauuu ugaacgugca aaaaaagcuc ccaucaucc aaaaauuau uaucauggau	480
	ucuaaaacgg auuaccaggg auuucagucg auguacacgu ucgucacauc ucaucuaccu	540
	cccgguuuuu augaauacga uuuugugcca gaguccuucg auagggacaa gacaauugca	600
	cugaucauga acuccucugg aucuacuggu cugccuaaag gugucgcucu gccucauaga	660
	acugccugcg ugagauucuc gcaugccaga gauccuuuu uuggcaauca aaucuuuccg	720
	gauacugcga uuuuaagugu uguuccauuc caucacgguu uuggaauuu uacuacacuc	780
	ggauuuuuga uauguggauu ucgagucguc uuaauguaua gauuugaaga agagcuguuu	840
	cugaggagcc uucaggauua caagauuca agugcgcugc uggugccaac ccuauucc	900
	uucuucgcca aaagcacucu gauugacaaa uacgauuuau cuaauuuaca cgaaauugcu	960
	ucugguggcg cuccccucuc uaaggaaguc ggggaagcgg uugccaagag guuccaucug	1020
	ccagguauca ggcaaggaua ugggcucacu gagacuacau cagcuauucu gauuacaccc	1080
	gagggggaug auaaacggg cgcggucggu aaaguuguuc cauuuuuuga agcgaagguu	1140
	guggaucugg auaccgggaa aacgcugggc guuaaucaaa gaggcgaacu gugugugaga	1200
15	gguccuaua uuauguccgg uuauguaaac aauccggaag cgaccaacgc cuugauugac	1260

ES 2 806 575 T3

aaggauuggau ggcuacauuc uggagacaua gcuuacuggg acgaagacga acacuucuuc 1320
 aucguugacc gccugaaguc ucugauuaag uacaaaggcu aucagguggc ucccgcugaa 1380
 uuggaaucca ucuugcucca acacccaac aucuucgacg caggugucgc aggucuuccc 1440
 gacgaugacg ccggugaacu ucccgccgcc guuguuguuu uggagcacgg aaagacgaug 1500
 acggaaaaag agaucgugga uuacgucgcc agucaagua caaccgcgaa aaaguugcgc 1560
 ggaggaguug uguuugugga cgaaguaccg aaaggucuua ccggaaaacu cgacgcaaga 1620
 aaaucagag agauccucau aaaggccaag aaggggcgaa agaucgccgu guaaccucua 1680
 guagaucuaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1758

<210> 2

<211> 1758

<212> ARN

5 <213> Secuecnia Sequence

<220>

<223> ARNm enriquecido en G/C de luciferasa de Photinus pyralis

<400> 2

gggagaugua caaagcuuac cauggaggac gccaaagaaca ucaagaaggg ccccgccccg 60
 uucuaccccc uggaggacgg gaccgaggc gagcagcucc acaaggccau gaagcgguac 120
 gccucggugc ccgggaccu cgccuucacg gacgcccaca ucgaggucga caucaccuac 180
 gcggaguacu ucgagaugag cgugcgccug gccgaggcca ugaagcggua cggccucaac 240
 accaaccacc gcaucguggu cugcuccgag aacagccugc aguucuucan gcccgugcug 300
 ggggccccucu ucaucggcgu ggccgucgcc ccggccaacg acaucuaca cgagcgggag 360
 cugcugaacu ccaugggcau cagccagccc accguggugu ucgucuccaa gaagggguc 420
 cagaagaucc ugaacgugca gaagaagcug ccgaucaucc agaagaucan caucauggac 480
 agcaagacgg acuaccaggg cuuccagucc auguauaccu ucgugaccag ccaccucucc 540
 ccgggguuca acgaguacga cuucgucucc gaguccuucg acccgacaa gaccaucgcc 600
 cugaucauga acagcuccgg cagcacgggg cugcccaagg gcguggcccu cccccaccgg 660
 acccgugcugc ugcgcuucuc ccacgcccg gaccggaucu ucggcaacca gaucaucucc 720
 gacaccgcca uccugagcgu cgugcccuuc caccacgggu ucggcauguu caccacgcug 780
 gggauccuca ucugcggcuu ccgugugguc cugauguacc gguucgagga ggagcuguuc 840
 cuccgucucc ugacggacua caagaucag agcggccugc ucgugccac ccuguucucc 900
 uucuucgcca agagcaccu gaucgacaag uacgaccucu ccaaccugca cgagaucgcg 960
 10 agcggcgggg ccccgugag caaggaggug ggcgaggccg ucgccaagcg guuccaccuc 1020

ES 2 806 575 T3

cccgggaucc gccagggcua cgggcugacc gagacgaccu ccgccauccu gaucaccccc 1080
 gagggcgacg acaagcccgg cgcggugggg aagguggucc cguucuucga ggccaaggug 1140
 gucgaccucg acaccggcaa gacgcugggg gugaaccagc ggggcgagcu gucgugcgc 1200
 gggcccauga ucaugagcgg cuacgucaac aaccccaggg ccaccaacgc ccucaucgac 1260
 aaggacggcu ggcugcacuc cggggacauc gccuacuggg acgaggacga gcacuucuuc 1320
 aucguggacc ggcugaagag ccucaucaag uacaagggucc accagguggc gcccgcgag 1380
 cuggagucca uccugcucca gcacccgaac auucuagacg ccggggucgc cggccugccc 1440
 gacgacgacg cgggggagcu gcccgcgcc gugguggucc ucgagcacgg caagaccaug 1500
 accgagaagg agaucgugga cuacguggcc agccagguca cgaccgcaa gaagcugcgc 1560
 ggcggggugg uguucgucga cgaggugccc aaggggcuga ccgggaagcu ggacgcgcgg 1620
 aagauccgcg agauccucau caaggccaag aaggggcgca agaucgccgu cugaggacua 1680
 guagaucuaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1758

<210> 3

<211> 1758

<212> ARN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ARNm enriquecido en C de luciferasa de Photinus pyralis

<400> 3

gggagaugua caaagcuuac cauggaggac gccagaaca ucaagaagg ccccgcccc 60
 uuacuacccc ucgaggacgg caccgccggc gacgagcucc acaaggccau gaagcguac 120
 gcccucgucc ccggcaccau cgccuucacc gacgcccaca ucgaggucga caucaccuac 180
 gccgaguacu ucgagauauc cguccgccuc gccgaggcca ugaagcgcu cggccucaac 240
 accaaccacc gcaucgucgu cugcuccgag aacuccucc aguucuuc au gcccguccuc 300
 ggcgcccucu ucaucggcgu cgccgucgcc ccgccaacg acaucuaca cgagcgcgag 360
 cuccucaacu ccaugggcau cuccagccc accgucgucu ucgucucca gaagggccuc 420
 cagaagaucc ucaacgucca gaagaagcuc ccacaucaucc agaagaucau caucauggac 480
 uccaagaccg acuaccaggg cuuccagucc auguauaccu ucgucaccuc ccaccucucc 540
 cccggcuuca acgaguacga cuucgucccc gaguccuucg accgcgaca gaccaucgcc 600
 cucaucauga acuccuccgg cuccaccggc cuccccaagg gcgucgccc ccccaccgc 660
 accgccugcg uccgcuucuc ccacgccgc gacccaucu ucggcaacca gaucaucucc 720
 gacaccgcca uccucuccgu cgucuccuuc caccacggcu ucggcauguu caccaccuc 780

ES 2 806 575 T3

	ggcuaccuca ucugcggcuu ccgcgucguc cucauguacc gcuucgagga ggagcucuuc	840
	cuccgcuccc uccaggacua caagaucag uccgcccucc ucgucccccac ccucuucucc	900
	uucuucgcca aguccacccu caucgacaag uacgaccucu ccaaccucca cgagaucgcc	960
	uccggcggcg cccccucuc caaggagguc ggcgaggccg ucgccaagcg cuuccaccuc	1020
	cccggcaucc gccagggcua cggccucacc gagaccaccu ccgccauccu caucaccccc	1080
	gagggcgacg acaagcccgg cggcgucggc aaggucgucc ccuucuucga ggccaagguc	1140
	gucgaccucg acaccggcaa gaccucggc gucaaccagc gcggcgagcu cugcguccgc	1200
	ggccccauga ucauguccgg cuacgucaac aaccccagg ccaccaacgc ccucaucgac	1260
	aaggacggcu ggcuccacuc cggcgacauc gccuacuggg acgaggacga gcacuucuuc	1320
	aucgucgacc gccucaaguc ccucaucaag uacaagggucc accaggucgc ccccgccgag	1380
	cucgagucca uccuccucca gcaccccaac aucuucgacg ccggcgucgc cggccucccc	1440
	gacgacgacg ccggcgagcu ccccgccgcc gucgucgucc ucgagcacgg caagaccaug	1500
	accgagaagg agaucgucga cuacgucgcc ucccagguca ccaccgcaa gaagcuccgc	1560
	ggcggcgucg ucuucgucga cgaggucucc aagggccuca ccggcaagcu cgacgcccgc	1620
	aagaucgagc agauccucau caaggccaag aagggcggca agaucgccgu cugaggacua	1680
	guagaucuaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1740
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1758
	<210> 4	
	<211> 1746	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> enriquecido en G/C de luciferasa de Photinus pyralis	
	<400> 4	
	gggagaaagc uuaccaugga ggacgccaag aacaucaaga agggccccgc cccuucuac	60
	ccccuggagg acgggaccgc cggcgagcag cuccacaagg ccaugaagcg guacgccug	120
	gugcccggga ccaucgccuu caccgacgcc cacaucagg ucgacaucac cuacccgag	180
	uacuucgaga ugagcgugcg ccuggccgag gccaugaagc gguacggccu caacaccaac	240
	caccgcaucg uggucugcuc cgagaacagc cugcaguucu ucaugcccgu gcugggggcc	300
	cucuucaucg gcguggccgu cgccccgcc aacgacaucu acaacgagcg ggagcugcug	360
	aacuccaugg gcaucagcca gccaccgug guguucgucu ccaagaaggg gcuccagaag	420
	auccugaacg ugcagaagaa gcugcccauc auccagaaga ucaucaucau ggacagcaag	480
10	accgacuacc agggcuucca guccauguau accuucguga ccagccaccu cccuccggg	540

ES 2 806 575 T3

uucaacgagu acgacuucgu ccccgaguucc uucgaccgcg acaagaccuau cgcccugauc 600
 augaacagcu ccggcagcac cgggcugccc aagggcgugg cccuccccca ccggaccgcc 660
 ugcgugcgcu ucucccacgc ccgggacccc aucuucggca accagaucau ccccgacacc 720
 gccauccuga gcgucgugcc cuuccaccac ggguuaggca uguuaccac ccugggguac 780
 cucaucugcg gcuucccgcu gguccgaug uaccgguucg aggaggagcu guuccuccgc 840
 uccucgagg acuacaagau ccagagcgcc cugcucgugc ccaccucguu cuccuucuu 900
 gccaaagaga cccugaucga caaguacgac cucuccaacc ugcacgagau cgccagcggc 960
 ggggcccuc ugagcaagga gguggcgag gccgucgcca agcgguuca cccccggg 1020
 auccgccagg gcuaccggcu gaccgagacc accuccgcca uccugaucac ccccgagggc 1080
 gacgacaagc ccggcgccgu ggggaaggug guccccuuc ucgaggcaca gguggucgac 1140
 cucgacaccg gcaagaccu gggggugaac cagcggggcg agcugugcgu gcgaggggccc 1200
 augaucauga gcggcuacgu caacaacccc gaggccacca acgcccucan cgacaaggac 1260
 ggucggcugc acuccgggga caucgccuac ugggacgagg acgagcacuu cuucaucgug 1320
 gaccggcuga agagccuau caaguacaag ggcuaccagg uggccccgc cgagcuggag 1380
 uccaucugc uccagcacc caacaucuu gaccggggg ucggcgccu gcccgacgac 1440
 gacgggggg agcugcccgc cgccguggug guccucgagc acggcaagac caugaccgag 1500
 aaggagaucg uggacuacgu ggccagccag gucaccaccg ccaagaagcu gcgaggcggg 1560
 gugguguucg ucgacgaggu gcccaagggc cugaccggga agcuggagc ccggaagauc 1620
 cgcgagaucc ucaucaaggc caagaagggc ggcaagauc ccgucugagg acuaguagau 1680
 cuaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1740
 aaaaaa 1746

- <210> 5
- <211> 1745
- 5 <212> ARN
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> enriquecido en C de luciferasa de Photinus pyralis
 <400> 5

ggagaaagcu uaccauggag gacgccaaga acaucaagaa gggccccgcc cccuucuaac 60
 cccucgagga cggcaccgcc ggcgagcagc uccacaaggc caugaagcgc uacggccucg 120
 uccccggcac caucgccuuc accgacgccc acaucgaggu cgacaucacc uacggcgagu 180
 acuucgagau guccguccgc cucgcccagg ccaugaagcg cuacggccuc aacaccaacc 240
 accgcaucgu cgucugcucc gagaacuccc uccaguucuu caugcccguc cucggcgccc 300
 10 ucuucaucgg cgucggcguc gccccgcc acgacaucua caacgagcgc gagguccuca 360

ES 2 806 575 T3

acuccauggg caucucccag cccaccgucg ucuucgucuc caagaagggc cuccagaaga 420
 uccucaacgu ccagaagaag cuccccauca uccagaagau caucaucaug gacuccaaga 480
 ccgacuacca gggcuuccag uccauguaua ccuucgucac cuccaccuc cccccggcu 540
 ucaacgagua cgacuucguc cccgaguccu ucgaccgca caagaccauc gccucauca 600
 ugaacuccuc cggcuccacc ggccucccca agggcgucgc ccuccccac cgcaccgccu 660
 gcguccgcuu cuccacgcc cgcgaccca ucuucggcaa ccagaucauc cccgacaccg 720
 ccauccucuc cgucgucccc uccaccacg gcuucggcau guuaccacc cucggcuacc 780
 ucaucugcgg cuuccgucguc guccucaugu accgcuucga ggaggagcuc uuccuccgu 840
 ccuccagga cuacaagauc caguccgcc uccucgucc caccucuuc uccuucuucg 900
 ccaaguccac ccucaucgac aaguacgacc ucuccaaccu ccacgagauc gccuccggcg 960
 gcgcccccu cuccaaggag gucggcgagg ccgucgcaa gcgcuuccac cuccccggca 1020
 uccgccaggg cuacggccuc accgagacca ccuccgccau ccucaucacc cccgaggcg 1080
 acgacaagcc cggcgccguc ggcaaggucg ucccuucuu cgaggccaag gucgucgacc 1140
 ucgacaccgg caagaccuc ggcucaacc agcgcggcga gcucugcuc cgcggccca 1200
 ugaucauguc cggcuacguc aacaaccccg aggccaccaa cgccucauc gacaaggacg 1260
 gcuggcucca cuccggcgac aucgcuacu gggacgagga cgagcacuuc uucaucgucg 1320
 accgccucaa guccucauc aaguacaagg gcuaccaggu cgccccgcc gagcucgagu 1380
 ccauccuccu ccagcacc ccaucuuucg acgccggcgu cgccggccuc cccgacgacg 1440
 acgccggcga gcuccccgcc gccgucgucg uccucgagca cggcaagacc augaccgaga 1500
 aggagaucgu cgacuacguc gccucccagg ucaccaccg caagaagcuc cgcggcggcg 1560
 ucgucuucgu cgacgagguc cccaagggcc ucaccggcaa gcucgacgcc cgcaagauc 1620
 gcgagauc cucaaggcc aagaaggcg gcaagaucgc gcucgagga cuaguagauc 1680
 uaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 aaaaaa 1745

- <210> 6
- <211> 2035
- <212> ARN
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> enriquecido en C/G de luciferasa de Photinus pyralis
- <400> 6

ES 2 806 575 T3

ggggfcgugc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu accauggagg 60
 acgccaagaa caucaagaag ggccccgccc cguucuaacc ccuggaggac gggaccgcgg 120
 gcgagcagcu ccacaaggcc augaagcggg acgcccuggu gcccgggacc aucgccuua 180
 cggacgccc caucgagguc gacaucaccu acgcgaggua cuucgagaug agcgugcgcc 240
 uggccgaggc caugaagcgg uacggccuca acaccaacca ccgcaucgug gucugcuccg 300
 agaacagccu gcaguucuu augcccuguc ugggggccc cuucaucggc guggcggucg 360
 ccccggccaa cgacaucua aacgagcggg agcugcugaa cuccaugggc aucagccagc 420
 ccaccguggu guucgucucc aagaaggggc uccagaagau ccugaacgug cagaagaagc 480
 ugccgaucau ccagaagauc aucaucaugg acagcaagac ggacuaccag ggcuuccagu 540
 ccauguauac cuucgugacc agccaccucc ccccgggguu caacgaguac gacuucgucc 600
 ccgaguccuu cgaccgcgac aagaccaucg ccugaucau gaacagcucc ggcagcacgg 660
 ggcugcccaa gggcguggcc cuccccacc ggaccgcgug cgugcguuc ucccacgccc 720
 gggacccgau cuucggcaac cagaucaucc ccgacaccgc cauccugagc gucgugcccu 780
 uccaccacgg guucggcaug uucaccacgc ugggguaccu caucugcggc uuccgcgugg 840
 uccugaugua ccgguucgag gaggagcugu uccuccgcuc ccugcaggac uacaagauc 900
 agagcgcuu gcucgugccc acccuguucu ccuucuuvc caagagcacc cugaucgaca 960
 aguacgaccu cuccaaccug cacgagaucg cgagcggcgg ggccccgug agcaaggagg 1020
 ugggcgaggc cgucgccaag cgguuccacc uccccgggau ccgccagggc uacgggcuga 1080
 ccgagacgac cuccgccauc cugaucaccc ccgagggcga cgacaagccc ggcgcggugg 1140
 ggaagguggu cccguucuu gaggccaagg uggucgaccu cgacaccggc aagacgcugg 1200
 gggugaacca gggggcgag cugugcugc gcgggccc aucaugagc ggcuacguca 1260
 acaacccga ggccaccaac gcccucaucg acaaggacgg cuggcugcac uccggggaca 1320
 ucgcuucug ggacgaggac gagcacuucu ucaucgugga ccggcugaag agccucauca 1380

ES 2 806 575 T3

aguacaaggg cuaccaggug gcgcccgcg agcuggaguc cauccugcuc cagcaccgga	1440
acaucuucga cgccgggguc gccggccugc ccgacgacga cgcgggggag cugcccgccg	1500
ccgugguggu ccucgagcac ggcaagacca ugaccgagaa ggagaucgug gacuacugg	1560
ccagccaggu cacgaccgcc aagaagcugc gcggcggggu gguguucguc gacgaggugc	1620
ccaagggccu gaccgggaag cuggacgcgc ggaagauccg cgagauccuc aucaaggcca	1680
agaagggcgg caagaucgcc gucugaggac uagugcauca cauuuaaaag caucucagcc	1740
uaccaugaga auaagagaaa gaaaaugaag aucaauagcu uauucaucuc uuuuucuuuu	1800
ucguuggugu aaagccaaca cccugucuaa aaaacauaaa uuucuuuau cauuuugccu	1860
cuuuucucug ugcuucauu aauaaaaaaaa ggaaagaacc uagaucuaaa aaaaaaaaaa	1920
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa augcaucucc	1980
cccccccccc ccccccccc ccccccaaa ggcucuuuuc agagccacca gaauu	2035
<210> 7	
<211> 2035	
<212> ARN	
5 <213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> luciferasa de Photinus pyralis enriquecida en C	
<400> 7	
ggggcgcugc cuacggaggu ggcagccauc uccuucucgg caucaagcuu accauggagg	60
acgccaagaa caucaagaag ggccccgcc ccuucuaacc ccucgaggac ggcaccgccg	120
gcgagcagcu ccacaaggcc augaagcgc acgcccucgu ccccggcacc aucgccuua	180
ccgacgcca caucgagguc gacauaccu acgcccagua cuucgagaug uccguccgcc	240
ucgccgaggc caugaagcgc uacggccuca acaccaacca ccgcaucguc gucugcuccg	300
agaacucccu ccaguucuu augcccgucc ucggcgcccu cuucaucggc gucgccgucg	360
ccccgcca a gcaucauac aacgagcgc agcuccuaa cuccaugggc aucucccagc	420
ccaccgucgu cuucgucucc aagaagggcc uccagaagau ccucaacguc cagaagaagc	480
uccccauc au ccagaagau aucauauagg acuccaagac cgacuaccag ggcuuccagu	540
ccauguauac cuucgucacc ucccaccucc ccccgccuu caacgaguac gacuucgucc	600

ES 2 806 575 T3

ccgaguccuu cgaccgcgac aagaccaucg cccucaucau gaacuccucc ggcuccaccg 660
 gccuccccaa gggcgucgcc cuccccacc gcaccgccug cguccgcuuc ucccacgccc 720
 gcgaccccau cuucggcaac cagaucucc ccgacaccgc cauccucucc gucgucccu 780
 uccaccacgg cuucggcaug uucaccacc ucggcuaccu caucugcggc uuccgcgucg 840
 uccucaugua ccgcuucgag gaggagcucu uccuccgcuc ccuccaggac uacaagauc 900
 aguccgccc ccucgucccc acccucuucu ccuucuucgc caaguccacc cucaucgaca 960
 aguacgaccu cuccaaccuc cacgagaucg ccuccggcgg cgccccccuc uccaaggagg 1020
 ucggcgaggc cgucgccaag cgcuuccacc uccccggcau ccgccagggc uacggccuca 1080
 ccgagaccac cuccgccauc cucaucaccc ccgaggcgga cgacaagccc ggcgccgucg 1140
 gcaaggucgu ccccuucuuc gaggccaagg ucgucgaccu cgacaccggc aagaccucg 1200
 gcgucaacca ggcggcgag cucugcgucc gcggccccau gaucaugucc ggcuacguca 1260
 acaaccgga ggcaccaac gcccucaucg acaaggacgg cuggcuccac uccggcgaca 1320
 ucgccuacug ggacgaggac gaggacuucu ucaucgucga ccgccucaag ucccucauca 1380
 aguacaagg cuaccagguc gccccgccg agcucgaguc cauccuccuc cagcacccca 1440
 acaucuucga cgccggcguc gccggccucc ccgacgacga cgccggcgag cuccccgcc 1500
 ccgucgucgu ccucgagcac ggcaagacca ugaccgagaa ggagaucguc gacuacgucg 1560
 ccucccaggu caccaccgcc aagaagcucc gcggcggcgu cgucuucguc gacgaggucc 1620
 ccaagggccu caccggcaag cucgacgccc gcaagaucg cgagaucuc aucaaggcca 1680
 agaaggcgg caagaucgcc gucugaggac uagugcauca cauuuaaag caucucagcc 1740
 uaccaugaga auaagagaaa gaaaugaag aucaauagcu uauucaucuc uuuuuuuuu 1800
 ucguuggugu aaagccaaca ccugucuaa aaaacauaaa uuucuuuau cauuuugccu 1860
 cuuuucucug ugcuucauu aauaaaaaau gaaagaacc uagaucuaaa aaaaaaaaaa 1920
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa augcaucucc 1980
 ccccccccc ccccccccc ccccccaaa ggcucuuuuc agagccacca gaauu 2035

REIVINDICACIONES

1. Método para proporcionar un ARNm con una inmunogenicidad y/o capacidad inmunoestimuladora reducida que codifica al menos un polipéptido o proteína biológicamente activo, donde el método comprende las etapas de:
 - 5 1) identificar una secuencia de ARNm de tipo natural diana que codifica para el polipéptido o la proteína biológicamente activos,
 - 2) modificar al menos el 70% de los codones de la secuencia de tipo natural que son optimizables en su contenido en citidina mediante el aumento del contenido en citidina del ARNm, de forma que el contenido en citidina de la zona de la región codificadora del ARNm es más grande que el contenido en citidina de la región codificante del ARNm de tipo natural, no cambiando la secuencia de aminoácidos codificada en comparación con la de tipo natural,
 - 10 3) opcionalmente modificar al menos el 70% de los codones para los aminoácidos que no son seleccionables para la optimización en C, pero que son optimizables en cuanto al contenido en guanosina, aumentando el contenido en guanosina, y
 - 15 4) sintetizar el ARNm modificado diana, comprendiendo la síntesis una etapa de síntesis química o de transcripción *in vitro*, donde el ARNm modificado diana de menor inmunogenicidad y/o de menor capacidad inmunoestimuladora se selecciona de los ARNm modificados diana obtenibles mediante el método.
2. Método según la reivindicación 1, donde la región codificante del ARNm diana está modificada de forma que se alcanza un contenido máximo en citidina por la introducción de codones, los cuales codifican ARNt relativamente frecuentes.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el contenido en citidina de la región codificante del ARNm modificado que codifica al menos un polipéptido o proteína es al menos un 10%, preferentemente al menos un 12,5%, con mayor preferencia al menos un 15% mayor que el contenido en citidina comparado con la región codificadora del polipéptido o proteína del ARNm de tipo natural.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde todos los codones de la secuencia de tipo natural que no son optimizables en su contenido en citidina y que codifican para un codón relativamente raro en la célula son reemplazados por codones que codifican para un ARNt relativamente frecuente en la célula que porta el mismo aminoácido que el ARNt relativamente raro.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el índice de adaptación de codón (CAI) de la región codificante del ARNm modificado diana es superior en al menos 0,05, preferentemente superior en al menos 0,1, preferentemente superior en al menos 0,125, con mayor preferencia superior en al menos 0,15 que el CAI de la región codificante del ARNm de tipo natural que codifica el polipéptido o proteína.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el método comprende además la etapa de determinar la inmunogenicidad y/o la capacidad inmunoestimuladora del ARNm modificado diana que codifica para el al menos un polipéptido o proteína.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la determinación de la inmunogenicidad y/o la capacidad inmunoestimuladora del ARNm modificado diana comprende las subetapas de
 - 40 i) transfectar PBMC con el ARNm diana modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
 - ii) cultivar las células durante un tiempo apropiado, preferentemente al menos 8 horas, preferiblemente durante al menos 12 horas, más preferiblemente durante al menos 20 horas, y
 - iii) medir la cantidad de citocinas proinflamatorias en el sobrenadante celular.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el método se reitera para disminuir aún más la inmunogenicidad y/o la capacidad inmunoestimuladora del ARNm diana.
- 45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el método se lleva a cabo mediante la ejecución de al menos un algoritmo en un ordenador con ayuda de un software adecuado.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el ARNm modificado diana se obtiene por transcripción *in vitro*, preferiblemente por transcripción *in vitro* mediada por polimerasa de bacteriófago, preferentemente por transcripción *in vitro* mediada por polimerasa Sp6 y/o transcripción *in vitro* mediada por polimerasa T3, en especial por transcripción *in vitro* mediada por polimerasa T7.
- 50

R873

GGGAGAUGUACAAAGCUUACCAUGGAAGACGCCAAAAACAUAAGAAAGGCCCGGCGCCA
UUCUAUCCGCUGGAAGAUGGAACCGCUGGAGAGCAACUGCAUAAGGCUAUGAAGAGAUAC
GCCCUGGUUCCUGGAACAAUJGCUUUUACAGAUGCACAUUUCGAGGUGGACAUCACUUA
GCUGAGUACUUCGAAAUGUCCGUUCGGUUGGCAGAAGCUAUGAAACGAUAUGGGCUGAAU
ACAAAUCACAGAAUCGUCGUAUGCAGUGAAAACUCUCUCAAUUCUUUAUGCCGGUGUJG
GGCGCGUUAUUUAUCGGAGUJGCAGUUGCGCCCGCGAACGACAUUUAAAUGAACGUGAA
UJGCUCAACAGUAUGGGCAUJUCGCAGCCUACCGUGGUGUUCGUUUCCAAAAAGGGGUJG
CAAAAAUUUUGAACGUGCAAAAAAGCUCCCAAUCAUCCAAAAUUUAUUAUCAUGGAU
UCUAAAACGGAUUACCAGGGAUUUCAGUCGAUGUACACGUUCGUCACAUCUCAUCUACCU
CCCGGUUUUAUGAAUACGAUUUUGUGCCAGAGUCCUUCGAUAGGGACAAGACAAUJGCA
CUGAUCAUGAACUCCUCUGGAUCUACUGGUCUGCCUAAAGGUGUCGCUCUGCCUCAUAGA
ACUGCCUGCGUGAGAUUCUCGCAUGCCAGAGAUCUUAUUUUUGGCAAUCAAAUCAUUCGG
GAUACUGCGAUUUUAAGUGUJGUUCCAUUCCAUCACGGUJUUUGGAAUGUUUACUACACUC
GGAUUUUGAUUUGUGGAUJUCGAGUCGUCUUAUGUAUAGAUUUGAAGAAGAGCUGUJUU
CUGAGGAGCCUUCAGGAUUAACAAGAUUCAAGUGCGCUGCUGGUGCCAACCCUUAUUCUCC
UUCUUCGCCAAAAGCACUCUGAUUGACAAAUACGAUUAUCUAAUUUACACGAAAUJGCU
UCUGGUGGCGCUCUCCUCUUAAGGAAGUCGGGGAAGCGGUJGCAAGAGGUCCAUCUG
CCAGGUAUCAGGCAAGGAUUGGGCUCACUGAGACUACAUCAGCUAUUCUGAUUACACCC
GAGGGGAUGAUAAACCGGGCGCGGUCGGUAAAGUUGUCCAUUUUUGAAGCGAAGGUU
GUGGAUCUGGAUACCGGGAAAACGCUGGGCGUUAUCAAGAGGGCAACUGUGUGUGAGA
GGUCCUAUGAUUAUGUCCGGUUAUGUAAACAAUCCGGAAGCGACCAACGCCUUGAUUGAC
AAGGAUGGAUGGCUACAUCUGGAGACAUAGCUUACUGGGACGAAGACGAACACUUCUUC
AUCGUUGACCGCCUGAAGUCUCUGAUUAAGUACAAAGGCUAUCAGGUGGCUCUCCGUGAA
UJGGAAUCCAUCUUGCUCCAACACCCCAACAUCUUCGACGCAGGUGUCGCAGGUCUUCUCC
GACGAUGACGCCGGUGAACUUCUCCGCCCGUUGUUGUJUGGAGCACGGAAAGACGAUG
ACGGAAAAGAGAUJGUGGAUACGUCGCCAGUCAAGUAACAACCGCGAAAAGUJGCGC
GGAGGAGUUGUUGUGGACGAAGUACCGAAAGGUCUUAACGGAAAACUCGACGCAAGA
AAAAUCAGAGAGAUCCUCAUAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGAUJGCGGUAACCUCUA
GUAGAUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 1

R875

GGGAGAUGUACAAAGCUUACCAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCGCCCCG
UUCUACCCCCUGGAGGACGGGACCGCGGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUAC
GCCCUGGUGCCC GGGACCAUCGCCUUCACGGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUAC
GCGGAGUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUCAAC
ACCAACCACCGCAUCGUGGUCUGCUCCGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCAUGCCCUGUCUG
GGGGCCUCUUCAUCGGCGUGGGCGGUCGCCCCGGCCAACGACAUCUACAACGAGCGGGAG
CUGCUGAACUCCAUGGGCAUCAGCCAGCCCACCGUGGUGUUCGUCUCCAAGAAGGGGCUC
CAGAAGAUCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCGAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUUGGAC
AGCAAGACGGACUACCAGGGCUUCCAGUCCAUGUAUACCUUCGUGACCAGCCACCUCCCC
CCGGGGUUAACGAGUACGACUUCGUCGCCGAGUCCUUCGACCGCGACAAGACCAUCGCC
CUGAUCAUGAACAGCUCCGGCAGCACGGGGCUGCCCAAGGGCGUGGCCUCCCCCACC GG
ACCGCGUGCGUGCGCUUCUCCACGCCCGGGACCCGAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCC
GACACCGCCAUCCUGAGCGUCGUGCCUUCACCACGGGUUCGGCAUGUUCACCACGCUG
GGGUACCUCAUCUGCGGCUUCCGCGUGGUCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUC
CUCCGCUCCUGCAGGACUACAAGAUCAGAGCGCCCUGCUCGUGCCCACCCUGUUCUCC
UUCUUCGCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUCUCCAACCUGCAGGAGUUCGG
AGCGGGCGGGCCCCGUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUCGCCAAGCGGUUCCACCUC
CCCGGGAUCCGCCAGGGCUACGGGCUGACCGAGACGACCUCGCCAUCCUGAUCACCCCC
GAGGGCGACGACAAGCCC GCGCGGUGGGGAAGGUGGCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUG
GUCGACCUCGACACCGGCAAGACGCUGGGGGUGAACCAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGC
GGGCCAUGAUCAUGAGCGGCUACGUCAACAACCCCGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGAC
AAGGACGGCUGGCUGCACUCCGGGGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUC
AUCGUGGACCGGCUGAAGAGCCUCAUCAAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCCGCCGAG
CUGGAGUCCAUCCUGCUCCAGCACCCGAACAUCUUCGACGCCGGGGUCGCCGGCCUGCCC
GACGACGACCGGGGGAGCUGCCCCGCCGUGGUGGUCUCGAGCACGGCAAGACCAUG
ACCGAGAAGGAGAUCGUGGACUACGUGGCCAGCCAGGUCACGACCGCCAAGAAGCUGCGC
GGCGGGGUGGUGUUCGUCGACGAGGUGCCCAAGGGCCUGACCGGGAAGCUGGACCGCGGG
AAGAUCGCGGAGAUCUCAUCAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUCUGAGGACUA
GUAGAUCUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 2

R2103

GGGAGAUGUACAAAGCUUACCAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCGCCCC
UUCUACCCCCUCGAGGACGGCACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGCUAC
GCCUCGUCCCCCGGCACCAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUAC
GCCGAGUACUUCGAGAUGUCCGUCGCCUCGCCGAGGCCAUGAAGCGCUACGGCCUCAAC
ACCAACCACCGCAUCGUCGUCGUCUCCGAGAACUCCUCCAGUUCUUCUUGCCCCGUCCUC
GGCGCCUCUUCUUCGCGGUCGCCGUCGCCCCCCGCCAACGACAUCUACAACGAGCGCGAG
CUCCUCAACUCCAUGGGCAUCUCCAGCCCACCGUCGUCUUCGUCUCCAAGAAGGGCCUC
CAGAAGAUCUCAACGUCCAGAAGAAGCUCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUUGGAC
UCCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCCAUGUAUACCUUCGUCACCUCACCUCUCCCC
CCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUCCCCGAGUCCUUCGACCGCGACAAGACCAUCGCC
CUCAUCAUGAACUCCUCCGGCUCCACCGGCCUCCCCAAGGGCGUCGCCUCCCCCACCGC
ACCGCCUGCGUCCGCUUCUCCACGCCCGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUAUCCCC
GACACCGCCAUCCUCUCCGUCGUCCCCUCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACCUC
GGCUACCUCAUCUGCGGCUUCCGCGUCGUCCUCAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUCUUC
CUCCGCUCCUCCAGGACUACAAGAUCCAGUCCGCCUCCUUCGUCCCCACCUCUUCUCC
UUCUUCGCCAAGUCCACCCUCAUCGACAAGUACGACCUCUCCAACCUCACGAGAUCCGCC
UCCGGCGGGCCCCCUCUCCAAGGAGGUCGGCGAGGCCGUCGCCAAGCGCUUCCACCUC
CCCGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUACCGGAGACCACCUCCGCCAUCCUCAUACCCCC
GAGGGCGACGACAAGCCCCGGCGCCGUCGGCAAGGUCGUCCCCUUCUUCGAGGCCAAGGUC
GUCGACCUCGACACCGGCAAGACCUCGGCGUCAACCAGCGCGGGGAGCUCUGCGUCCGC
GGCCCCAUGAUCAUGUCCGGCUACGUCAACAACCCCGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGAC
AAGGACGGCUGGCUCCACUCCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUC
AUCGUCGACCGCCUCAAGUCCUCAUCAAGUACAAGGGCUACCAGGUCGCCCCCGCCGAG
CUCGAGUCCAUCCUCCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUCGCCGGCCUCCCC
GACGACGACGCCGGCGAGCUCUCCCGCCGCCGUCGUCGUCCUCGAGCACGGCAAGACCAUG
ACCGAGAAGGAGAUCGUCGACUACGUCGCCUCCAGGUCACCACCGCCAAGAAGCUCCGC
GGCGGGCUCGUCUUCGUCGACGAGGUCCCCAAGGGCCUCACCGGCAAGCUCGACGCCCGC
AAGAUCCGCGAGAUCUCAUCAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUCUGAGGACUA
GUAGAUCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 3

R2349

GGGAGAAAGCUUACCAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCGCCCCUUCUAC
CCCCUGGAGGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCUG
GUGCCCGGGACCAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCCGAG
UACUUCGAGAUGAGCGUGCGCCUGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUCAACACCAAC
CACCGCAUCGUGGUUCGUCUCCGAGAACAGCCUGCAGUUCUUCAUGCCCCGUGCUGGGGGCC
CUCUUCAUCGGCGUGGCCGUCGCCCCGCCAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCUG
AACUCCAUGGGCAUCAGCCAGCCCACCGUGGUGUUCGUCUCCAAGAAGGGGCUCCAGAAG
AUCCUGAACGUGCAGAAGAAGCUGCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACAGCAAG
ACCGACUACCAGGGCUCCAGUCCAUGUAUACCUUCGUGACCAGCCACCUCUCCCGGG
UUCAACGAGUACGACUUCGUCCCCGAGUCCUUCGACC GCGACAAGACCAUCGCCU GAUC
AUGAACAGCUCCGGCAGCACCGGGCUGCCCAAGGGCGUGGCCUCCCCACCGGACCGCC
UGCGUGCGCUUCUCCACGCCCGGGACCCAUUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGACACC
GCCAUCCUGAGCGUCGUGCCUCCACCACGGGUUCGGCAUGUUCACCACCCUGGGGUAC
CUCAUCUGCGGCUUCCGCGUGGUCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUCCGCG
UCCUUGCAGGACUACAAGAUCCAGAGCGCCUUCGUCGUGCCCACCCUGUUCUCCUUCUUC
GCCAAGAGCACCCUGAUCGACAAGUACGACCUCUCCAACCUGCACGAGAUCCGACGGC
GGGGCCCCUCUGAGCAAGGAGGUGGGCGAGGCCGUCGCCAAGCGGUUCCACCUCUCCCGGG
AUCCGCCAGGGCUACGGGCUGACCGAGACCACUCCGCCAUCCUGAUCACCCCGAGGGC
GACGACAAGCCCGGCGCCGUGGGGAAGGUGGUCCCCUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUCGAC
CUCGACACCGGCAAGACCCUGGGGGUGAACAGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGCC
AUGAUCAUGAGCGGCUACGUACAACAACCCCGAGGCCACCAACGCCUUCUAGACAAGGAC
GGCUGGCUGCACUCCGGGGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGUG
GACCGGCUGAAGAGCCUCAUCAAGUACAAGGGCUACCAGGUGGCCCCCGCCGAGCUGGAG
UCCAUCCUGCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGUGCGCGGCCUGCCCGACGAC
GACGCCGGGAGCUGCCCGCCGCGUGGUGGUCCUCGAGCACGGCAAGACCAUGACCGAG
AAGGAGAUUGGACUACGUGGCCAGCCAGGUCACCACCGCCAAGAAGCUGCGCGGGGG
GUGGUGUUCGUCGACGAGGUGCCCAAGGGCCUGACCGGGAAGCUGGACGCCCGGAAGAU
CGCGAGAUCCUCAUCAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUCUGAGGACUAGUAGAU
CUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

Fig. 4

R2350

GGGAGAAAGCUUACCAUGGAGGACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCGCCCCUUCUAC
CCCCUCGAGGACGGCACCGCCGGCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGCUACGCCUC
GUCCCCGGCACCAUCGCCUUCACCGACGCCACAUCGAGGUCGACAUCACCUACGCCGAG
UACUUCGAGAUGUCCGUCCGCCUCGCCGAGGCCAUGAAGCGCUACGGCCUCAACACCAAC
CACCGCAUCGUCGUCGUCUCCGAGAACUCCUCCAGUUCUUAUGCCCCGUCCUCGGCGCC
CUCUUAUCGGCGUCGCCGUCGCCCCCGCCAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCUCCUC
AACUCCAUGGGCAUCUCCCAGCCCACCGUCGUCUUCGUCUCCAAGAAGGGCCUCCAGAAG
AUCCUCAACGUCCAGAAGAAGCUCCCAUCAUCCAGAAGAUCAUCAUCAUGGACUCCAAG
ACCGACUACCAGGGCUUCCAGUCCAUGUAUACCUUCGUCACCUCCACCUCSCCCCCGGC
UUAACGAGUACGACUUCGUCCCCGAGUCCUUCGACCGCGACAAGACCAUCGCCUUAUC
AUGAACUCCUCCGGCUCCACCGGCCUCCCCAAGGGCGUCGCCUCCCCACCGCACCGCC
UGCGUCCGCUUCUCCACGCCCGCGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCCGACACC
GCCAUCCUCUCCGUCGUCUCCUCCACCACGGCUUCGGCAUGUACACCACCUCCGGCUAC
CUCAUCUGCGGCUUCCGCGUCGUCUCCUUAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUUUCUCCGC
UCCUCCAGGACUACAAGAUCCAGUCCGCCUCCUCGUCUCCACCUCUUCUUCUUCUUC
GCCAAGUCCACCCUCAUCGACAAGUACGACCUCUCCAACCUCACGAGAUCCGUCCGGC
GGGCCCCCCCUCUCCAAGGAGGUCGGCGAGGCCGUCGCCAAGCGCUUCCACCUCSCCGG
AUCCGCCAGGGCUACGGCCUCACCGAGACCACCUCCGCCAUCCUCAUACCCCCGAGGGC
GACGACAAGCCCGGCGCCGUCGGCAAGGUCGUCCCCUUCUUCGAGGCCAAGGUCGUCGAC
CUCGACACCGGCAAGACCCUCGGCGUCAACCAGCGCGGCGAGCUCUGCGUCCGCGGCCCC
AUGAUCAUGUCCGGCUACGUCAACAACCCCGAGGCCACCAACGCCCUCAUCGACAAGGAC
GGCUGGCUCCACUCCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCGUC
GACCGCCUCAAGUCCUCAUCAAGUACAAGGGCUACCAGGUCGCCCCCGCGGAGCUCGAG
UCCAUCCUCCUCCAGCACCCCAACAUCUUCGACGCCGGCGUCGCCGGCCUCCCCGACGAC
GACGCCGGCGAGCUCCCCGCCGCCGUCGUCGUCUCCGAGCACGGCAAGACCAUGACCGAG
AAGGAGAUCGUCGACUACGUCGCCUCCAGGUCACCACCGCCAAGAAGCUCCGCGGCGGC
GUCGUCUUCGUCGACGAGGUCSCCAAGGGCCUACCGGCAAGCUCGACGCCCGCAAGAUC
CGCGAGAUCUCAUCAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUCUGAGGACUAGUAGAU
CUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

Fig. 5

R2791

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGGAGG
 ACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCCGCCCCGUUCUACCCCCUGGAGGACGGGACCGCGG
 GCGAGCAGCUCCACAAGGCCAUGAAGCGGUACGCCUGGUGCCCGGGACCAUCGCCUUA
 CGGACGCCCACAU CGAGGUCGACAUCACCUACGCGGAGUACUUCGAGAUGAGCGUGCGCC
 UGGCCGAGGCCAUGAAGCGGUACGGCCUCAACACCAACCACCGCAUCGUGGUCUGCUCCG
 AGAACAGCCUGCAGUUCUUAUGCCCCGUGCUGGGGGCCUCUUAUCGGCGUGGCGGUCG
 CCCC GGCCAACGACAUCUACAACGAGCGGGAGCUGCUGAACUCCAUGGGCAUCAGCCAGC
 CCACCGUGGUGUUCGUCUCCAAGAAGGGGCUCCAGAAGAUCUGAACGUGCAGAAGAAGC
 UGCCGAUCAUCCAGAAGAUAUCAUCAUGGACAGCAAGACGGACUACCAGGGCUUCCAGU
 CCAUGUAUACCUUCGUGACCAGCCACCUC CCCCCGGGGUUAACGAGUACGACUUCGUCC
 CCGAGUCCUUCGACCGCGACAAGACCAUCGCCUGAUAUGAACAGCUC CGGCAGCACGG
 GGCUGCCCAAGGGCGUGGCCUCCCCCACC GGACC GCGUGCGUGCGCUUCCCCACGCC
 GGGACCCGAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCAUCCUGAGCGUCGUGCCCU
 UCCACCACGGGUUCGGCAUGUUCACCACGCGUGGGUACCUCAUCUGCGGCUUCCGCGUGG
 UCCUGAUGUACCGGUUCGAGGAGGAGCUGUUCUCCGCUC CCGCAGGACUACAAGAUC
 AGAGCGCCCUGCUCGUGCCCACCCUGUUCUCCUUCUUCGCAAGAGCACCCUGAUCGACA
 AGUACGACCUCUCCAACCUGCACGAGAU CGCGAGCGGGGGCCCCGUGAGCAAGGAGG
 UGGGCGAGGCCGUCGCAAGCGGUUCCACCUC CCGGGAUCCGCCAGGGCUACGGGCUGA
 CCGAGACGACCUCGCCAUCCUGAUCAC CCCCCGAGGGCGACGACAAGCCCGGCGGGUGG
 GGAAGGUGGUCCCGUUCUUCGAGGCCAAGGUGGUCGACCUCGACACCGGCAAGACGCUGG
 GGGUGAACACGCGGGGCGAGCUGUGCGUGCGGGGCCAUGAUAUGAGCGGCUACGUCA
 ACAACCCCGAGGCCACCAACGCCCUAUCGACAAGGACGGCUGGCUACUCGGGGACA
 UCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCGUGGACCGGCUGAAGAGCCUCAUCA
 AGUACAAGGGCUACCAGGUGGCGCCGCGGAGCUGGAGUCCAUCUGCUCCAGCACCCGA
 ACAUCUUCGACGCCGGGUGCGCGGCCUGCCGACGACGACGCGGGGGAGCUGCCCGCCG
 CCGUGGUGGUCCUCGAGCACGGCAAGACCAUGACCGAGAAGGAGAU CGUGGACUACGUGG
 CCAGCCAGGUCACGACCGCCAAGAAGCUGCGCGGGGGUGGUGUUCGUCGACGAGGUGC
 CCAAGGGCCUGACCGGGAAGCUGGACGCGCGGAAGAUCGCGGAGAUCCUCAUCAAGGCCA
 AGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUCUGAGGACUAGUGCAUCACAUUAAAAGCAUCUCAGCC
 UACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUAUCUCUUUUCUUUU
 UCGUUGGUGUAAAAGCCAACACCUGUCUAAAAACAUAUUUUCUUUAAUCAUUUUGCCU
 CUUUUCUCUGUCUCAAUUAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCC
 CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAU

Fig. 6

R2793

GGGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUCAAGCUUACCAUGGAGG
ACGCCAAGAACAUCAAGAAGGGCCCCGCCCCUUCUACCCCUUCGAGGACGGCACCGCCG
GCGAGCAGCUCACCAAGGCCAUGAAGCGCUACGCCUCUGUCCCCGGCACCAUCGCCUUCA
CCGACGCCACAUUCGAGGUCGACAUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGUCCGUCCGCC
UCGCCGAGGCCAUGAAGCGCUACGGCCUCAACACCAACCACCGCAUCGUCGUCUGCUCGG
AGAACUCCCUCCAGUUCUUAUGCCCGUCCUCGGCGCCCUUUAUCGGCGUCGCCGUCG
CCCCCGCAACGACAUCUACAACGAGCGGAGCUCUCAACUCCAUGGGCAUCUCCACAGC
CCACCGUCGUCUUCGUCUCAAGAAGGGCCUCCAGAAGAUCUCAACGUCCAGAAGAAGC
UCCCCAUCAUCCAGAAGAUAUCAUCAUGGACUCCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAGU
CCAUGUAUACCUUCGUCACCUCACCUCUCCCCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUCC
CCGAGUCCUUCGACCGGACAAGACCAUCGCCCUCAUCAUGAACUCCUCCGGCUCACCAGC
GCCUCCCCAAGGGCGUCGCCUCCCCCACCGCACCGCCUGCGUCCGUUUCUCCACGCC
GCGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGACACCGCCAUCUCCGUCGUCUCCCU
UCCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACCUCGGCUACCUCAUCUGCGGCUUCCGGGUCG
UCCUCAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUCUUCUCCGUCUCCUCCAGGACUACAAGAUC
AGUCCGCCUCCUCGUCCCCACCUCUUCUUCUUCGCGCAAGUCCACCUCUAUCGACA
AGUACGACCUCUCCAACCUCACGAGAUCCGCUCCGGCGGGCGCCCCCUUCAAGGAGG
UCGGCGAGGCCGUCGCAAGCGCUUCCACUCCCGGCAUCGCGCAGGGCUACGGCCUCA
CCGAGACCACUCCGCAUCCUCAUACCCCCGAGGGCGACGACAAGCCCGGCGCCGUCG
GCAAGGUCGUCCCUUUCUUCGAGGCCAAGGUCGUCGACCUCGACACCGGCAAGACCUCG
GCGUCAACCAGCGGGCGAGCUCUGCGUCCGCGGCCCAUGAUCAUGUCCGGCUACGUCA
ACAACCCCGAGGCCACCAACGCCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUCCACUCCGGCGACA
UCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUAUCGUCGACCGCCUCAAGUCCUCAUCA
AGUACAAGGGCUACCAGGUCGCCCCCGCCGAGCUCGAGUCCAUCUCCUCCAGCACCCCA
ACAUCUUCGACGCCGGCGUCGCCGGCCUCCCCGACGACGACCGCGGCGAGCUCUCCGGCG
CCGUCGUCGUCCUCGAGCACGGCAAGACCAUGACCAGAGAAGGAGAUUCGUCGACUACGUCG
CCUCCAGGUCACCACCGCAAGAAGCUCCGCGGGCGGCGUCGUCUUCGUCGACGAGGUCC
CCAAGGGCCUACCGGCAAGCUCGACGCCCGCAAGAUCGCGAGAUCCUCAUCAAGGCCA
AGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUCUGAGGACUAGUGCAUCACAUUUAAGCAUCUCAGCC
UACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAUGAAGAUAUAUAGCUUAUUAUCUCUUUUUCUUUU
UCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUUCUUUAUCAUUUUGCCU
CUUUUCUGUGCUUCAAUUAUAAAAAUGGAAAGAACCUAGAUCUAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUGCAUCCCC
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCUCUUUCAGAGCCACCAGAAU

Fig. 7

TNF α inducido por ARNm (PBMC)

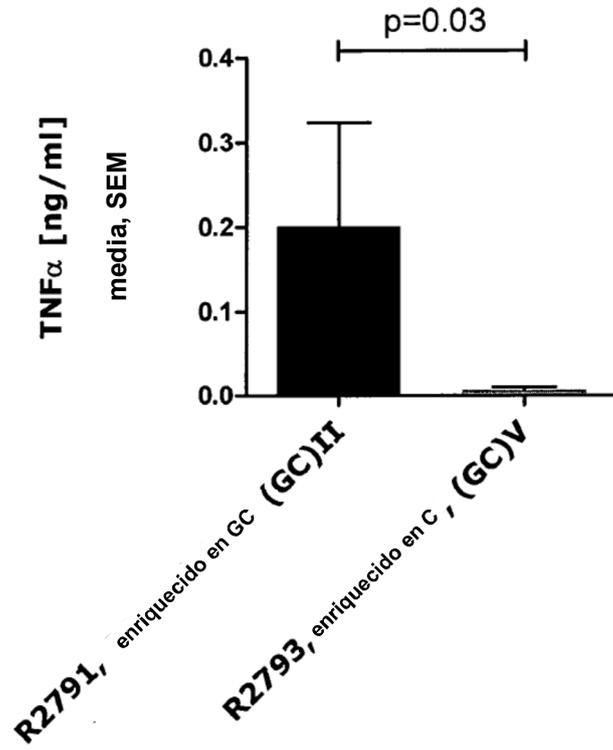


Fig. 8

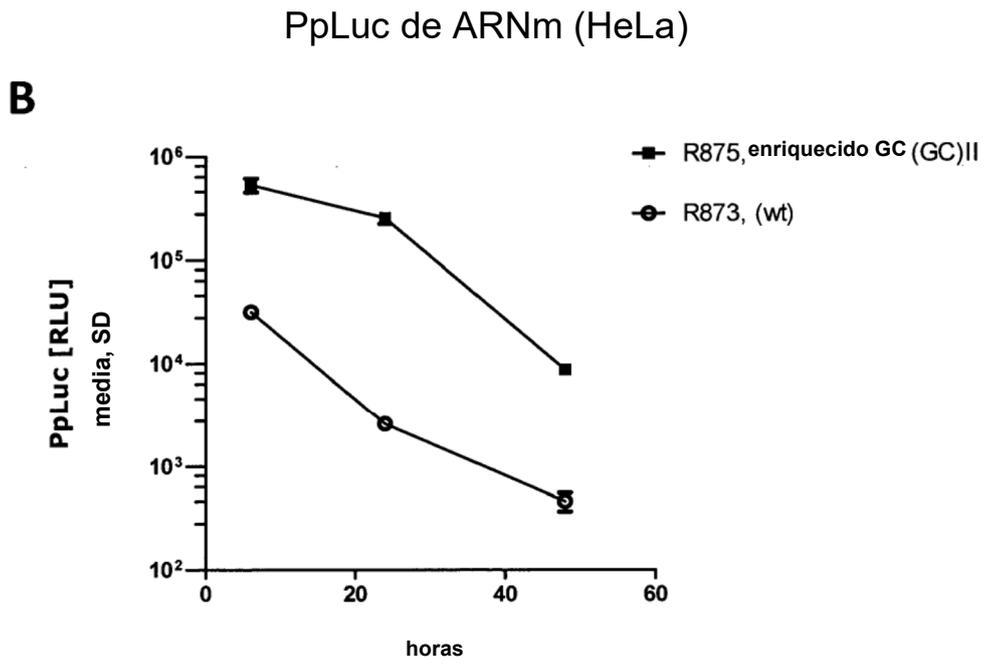
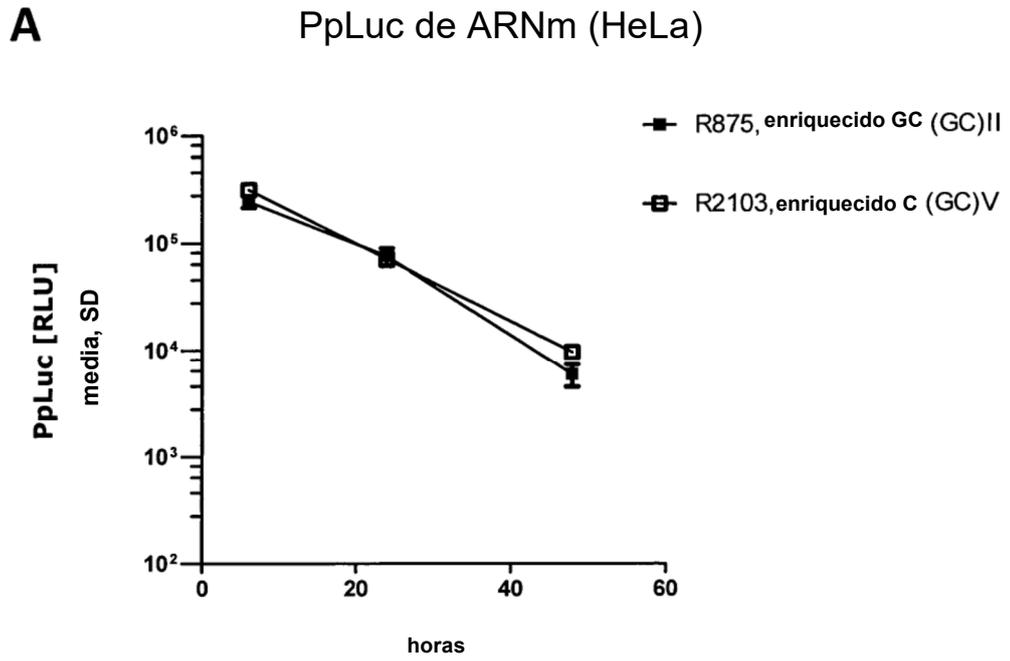


Fig. 9

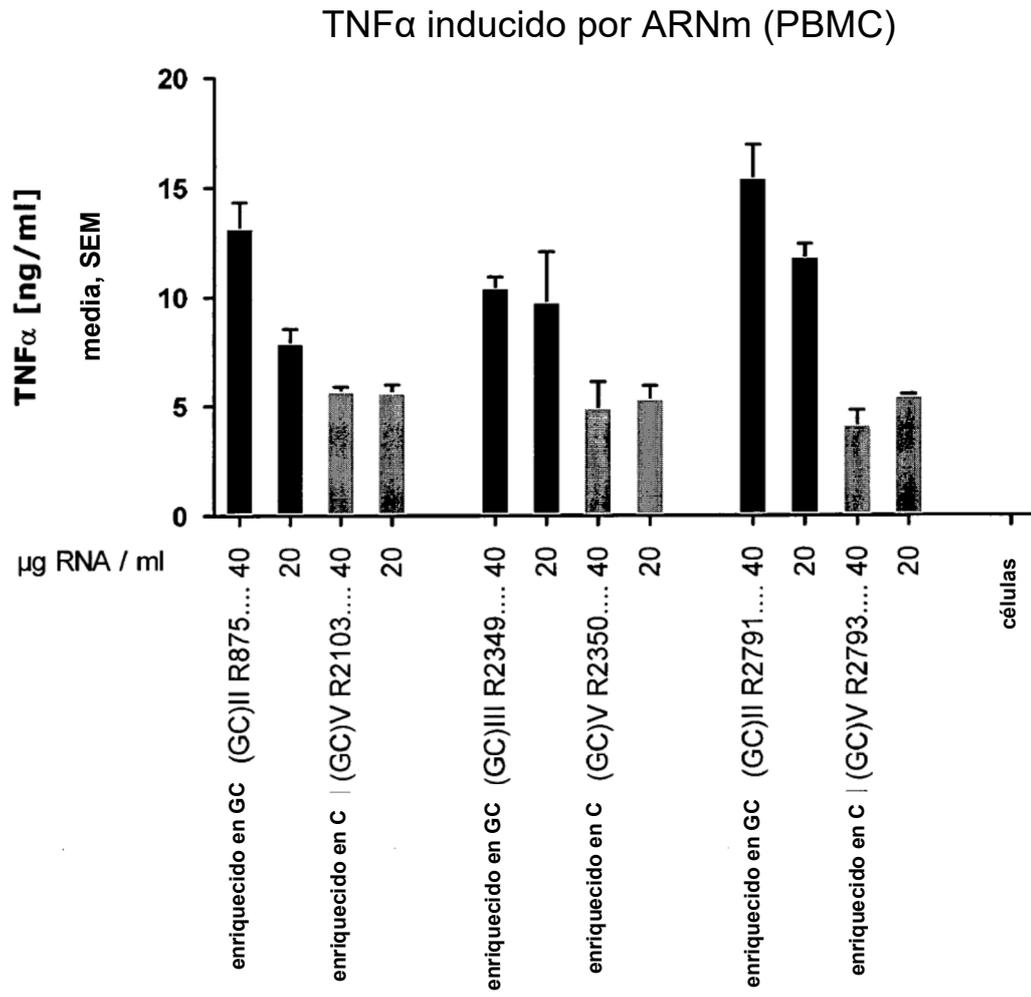


Fig. 10

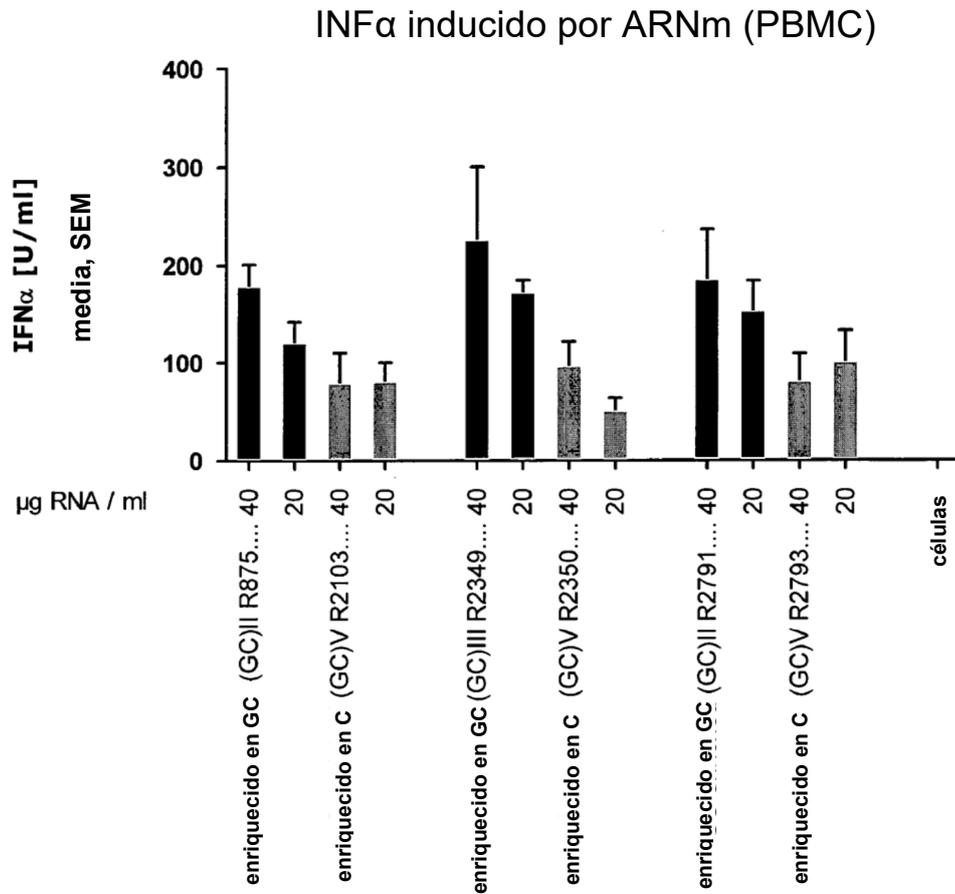


Fig. 11