

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 341**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6804 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 18207398 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2024** **EP 3495505**

54 Título: **Evaluación cuantitativa para la eficiencia de caperuza de ARN mensajero**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361784253 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2025

73 Titular/es:

TRANSLATE BIO, INC. (100.00%)
200 West Street
Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

HEARTLEIN, MICHAEL;
DEROSA, FRANK y
DIAS, ANUSHA

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 997 341 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

Evaluación cuantitativa para la eficiencia de caperuza de ARN mensajero

5 REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de patente provisional de EE. UU. con número de serie 61/784.253, presentada el 14 de marzo de 2013.

10 ANTECEDENTES

La terapia con ARN mensajero ("ARNm") se está convirtiendo en un enfoque cada vez más importante para el tratamiento de una variedad de enfermedades. Una terapia con ARNm eficaz requiere una administración eficaz del ARNm al paciente y una producción eficiente de la proteína codificada por el ARNm dentro del cuerpo del paciente. Para optimizar la administración del ARNm y la producción de proteínas *in vivo*, normalmente se requiere una caperuza adecuada en el extremo 5' de la construcción, que protege al ARNm de la degradación y facilita la traducción exitosa de la proteína. Por lo tanto, la caracterización precisa de la eficiencia de la protección con caperuza es particularmente importante para determinar la calidad del ARNm para aplicaciones terapéuticas.

20 Otsuka et al., Molecular and Cellular Biology, 2009, vol. 29, núm. 8, 2155-2167 divulgaron la recuperación de ARN citoplasmático con una sustancia de unión específica a caperuza inmovilizada, la liberación de ARN protegido con caperuza mediante elución y su posterior análisis mediante ensayo de protección de nucleasa S 1.

25 Theus et al. Biotechniques, noviembre de 1990; 9 (5): 610-2, 614-5 divulgaron ARNm radiomarcados transcritos *in vitro* y la medición de la protección con caperuza mediante digestión del ARNm hasta su finalización.

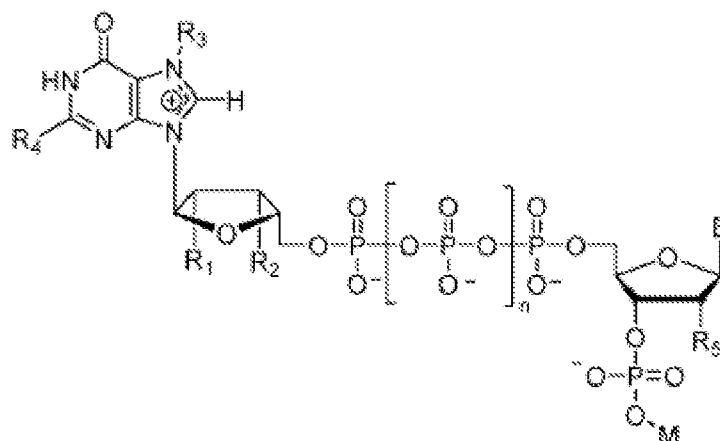
DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

30 La presente invención proporciona procedimientos mejorados para determinar de forma precisa y cuantitativa la eficiencia de protección con caperuza del ARNm, en particular, del ARNm sintetizado *in vitro*. Como se ha comentado anteriormente, la protección con caperuza adecuada es importante para una producción de proteínas exitosa *in vivo*. Sin embargo, antes de la presente invención, la mayoría de los ensayos con caperuza son cualitativos, lo que no es suficiente para evaluar la calidad de un producto terapéutico basado en ARNm y la seguridad y eficacia relacionadas para su uso *in vivo*. De hecho, antes de la presente invención, no hay ningún procedimiento disponible que permita la cuantificación de la eficiencia de protección con caperuza sin alteraciones permanentes de los ARNm en una muestra. Tal como se describe en detalle a continuación, la presente invención se basa, en parte, en la formación y cuantificación de un complejo entre una sustancia de unión específica a caperuza (por ejemplo, un anticuerpo específico de caperuza) y un ARNm protegido con caperuza mediante el uso de una tecnología sencilla, tal como ELISA. Por tanto, la presente invención proporciona un enfoque cuantitativo sencillo, fiable y eficaz para evaluar la eficiencia de protección con caperuza del ARNm. La presente invención es particularmente útil para el control de calidad durante la fabricación de ARNm y para la caracterización del ARNm como un principio farmacéutico activo (API) en productos terapéuticos finales.

45 La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para cuantificar la eficiencia de protección con caperuza del ARNm, comprendiendo el procedimiento las etapas de proporcionar una muestra de ARNm que contiene ARNm protegido y no protegido con caperuza; proporcionar una sustancia de unión específica a caperuza en condiciones que permitan la formación de un complejo entre la sustancia de unión específica a caperuza y el ARNm protegido con caperuza; y determinar cuantitativamente la cantidad del complejo en comparación con un control, cuantificando de ese modo la eficiencia de protección con caperuza del ARNm.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un procedimiento inventivo de la presente invención para cuantificar una caperuza que tiene una estructura de fórmula I:



en la que,

B es una nucleobase,

R₁ se selecciona entre un halógeno, OH y OCH₃;

R₂ se selecciona entre H, OH y OCH₃;

R₃ es CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃ o nulo;

R₄ es NH₂;

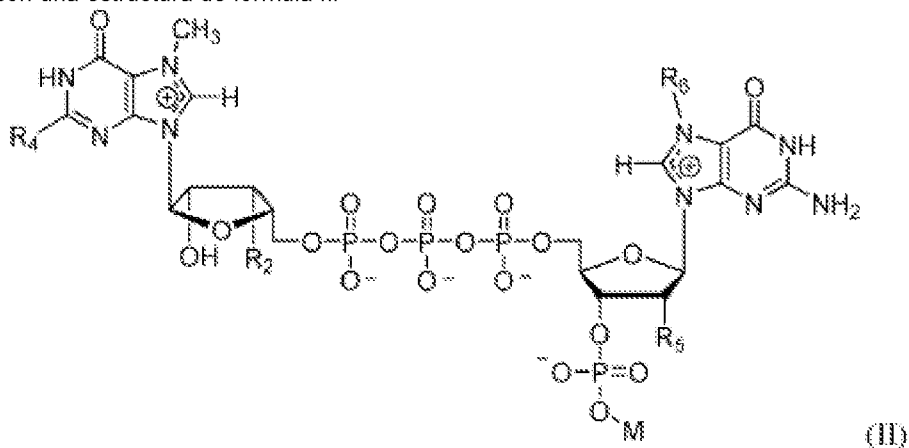
R₅ se selecciona entre OH, OCH₃ y un halógeno;

n es 1, 2 o 3; y

M es un nucleótido del ARNm.

En algunas realizaciones, la nucleobase es guanina.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un procedimiento inventivo de la presente invención para cuantificar una caperuza m⁷G con una estructura de fórmula II:



en la que,

R₂ es H o CH₃;

R₄ es NH₂;

R₅ es OH u OCH₃;

R₆ es H o CH₃; y

M es un nucleótido del ARNm.

En algunas realizaciones, una sustancia de unión específica a caperuza adecuada es una proteína de unión específica a caperuza. En algunas realizaciones, una sustancia de unión específica a caperuza adecuada es un anticuerpo específico de caperuza. En algunas realizaciones, un anticuerpo específico de caperuza adecuado es un anticuerpo anti-m⁷G.

El procedimiento inventivo según la presente invención implica una etapa de determinación cuantitativa de la cantidad del complejo entre la sustancia de unión específica a caperuza y el ARNm protegido con caperuza mediante la realización de un ensayo ELISA.

En algunas realizaciones, la etapa de determinar cuantitativamente la cantidad del complejo comprende medir una señal detectable asociada con el complejo. En algunas realizaciones, la señal detectable está directamente asociada con la sustancia de unión específica a caperuza. En algunas realizaciones, la señal detectable está indirectamente

asociada con la sustancia de unión específica a caperuza a través de un agente secundario que se une a la sustancia de unión específica a caperuza. En algunas realizaciones, un agente secundario adecuado es un anticuerpo secundario.

En algunas realizaciones, una señal detectable adecuada es una señal fluorescente, una señal colorimétrica o una señal radiactiva. En algunas realizaciones, una señal fluorescente adecuada se genera convirtiendo un sustrato enzimático en un producto cromogénico, quimiofluorescente o quimioluminiscente mediante una enzima asociada directa o indirectamente con la sustancia de unión específica a caperuza. En algunas realizaciones, un sustrato enzimático adecuado se selecciona entre los grupos que consisten en sal disódica de fosfato de p-nitrofenilo (PNPP), sal de diamonio de 2,2'-azinobis[ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico] (ABTS), diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). En algunas realizaciones, una enzima adecuada es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

En algunas realizaciones, un control adecuado para la determinación cuantitativa es una muestra de ARNm con una cantidad predeterminada de ARNm protegido con caperuza. En algunas realizaciones, un control adecuado para la determinación cuantitativa comprende una cantidad predeterminada de caperuza sintetizada.

En algunas realizaciones, cuantificar la eficiencia de protección con caperuza del ARNm comprende cuantificar la cantidad absoluta de ARNm protegido con caperuza en la muestra de ARNm. En algunas realizaciones, cuantificar la eficiencia de protección con caperuza del ARNm comprende cuantificar el porcentaje de ARNm protegido con caperuza en la muestra de ARNm.

En algunas realizaciones, un procedimiento inventivo según la presente invención comprende además una etapa de captura del ARNm en un sustrato. En algunas realizaciones, el ARNm es capturado por un oligo poli-T que se une a la cola de poli-A del ARNm. En algunas realizaciones, el ARNm es capturado por una proteína de unión a poli-A o un anticuerpo. En algunas realizaciones, un sustrato adecuado es una microplaca, una perla magnética, una partícula, una perla polimérica, una resina cromatográfica, un papel de filtro, nitrocelulosa, diazocelulosa, vidrio, látex, poliestireno, cloruro de polivinilo, propileno, polietileno, dextrano, sefarsa, agar, almidón, nailon, gel de sílice o hidrogel. En algunas realizaciones, el sustrato está recubierto con avidina o estreptavidina. En algunas realizaciones, un oligo poli-T o una proteína de unión a poli-A o un anticuerpo utilizado para capturar el ARNm está biotinilado.

El procedimiento inventivo según la presente invención se utiliza para cuantificar la eficiencia de protección con caperuza de ARNm de una muestra de ARNm sintetizada *in vitro*.

Entre otras cosas, la presente invención proporciona composiciones y kits para llevar a cabo los procedimientos inventivos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un kit para cuantificar la eficiencia de la protección con caperuza del ARNm, comprendiendo el kit una sustancia de unión específica a caperuza; uno o más reactivos para detectar un complejo entre la sustancia de unión específica a caperuza y un ARNm protegido con caperuza, y un control para cuantificar el ARNm protegido con caperuza. En algunas realizaciones, una sustancia de unión específica a caperuza adecuada es un anticuerpo específico de la caperuza. En algunas realizaciones, un anticuerpo específico de la caperuza adecuado es un anticuerpo anti-m⁷G. En algunas realizaciones, un kit de la presente invención contiene además un sustrato para capturar el ARNm.

Tal como se utilizan en esta solicitud, los términos "aproximadamente" y "alrededor de" se utilizan como equivalentes. Todos los números utilizados en esta solicitud, con o sin aproximadamente/alrededor de, tienen por objeto cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por una persona con conocimientos ordinarios en la técnica pertinente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos son para fines ilustrativos y no son de ninguna manera limitativos.

La Figura 1 ilustra una representación de ejemplo de una realización basada en ELISA tipo sándwich de la invención en la que un anticuerpo monoclonal de ratón primario anti-caperuzón m⁷G se une específicamente a la caperuza de un ARNm. El ARNm se ha capturado indirectamente sobre un sustrato sólido a través de la hibridación de su cola de poli(A) con un cebador oligo-dT biotinilado, que está unido directamente al sustrato sólido recubierto por estreptavidina.

La Figura 2 es un diagrama de estructuras protegidas con caperuza de ARNm de ejemplo y una estructura sin protección con caperuza presente en varias realizaciones de la invención.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra la cuantificación de los niveles de proteína alfa-galactosidasa (GLA) humana secretada, medidos mediante ELISA. La proteína detectada es el resultado de su producción a partir del ARNm de GLA administrado por vía intravenosa a través de una dosis única de nanopartículas lipídicas (30 ug de ARNm de GLA encapsulado) seis horas después de la administración.

La Figura 4 muestra un gráfico de ejemplo que demuestra la cuantificación de la protección con caperuza en varias cantidades de ARNm protegido con y sin caperuza, medido mediante ELISA. La señal detectada se deriva de la interacción del anticuerpo anti-caperuza con la estructura del caperuza en las muestras de ARN.

La Figura 5 muestra un gráfico de barras de ejemplo que demuestra la cuantificación de la protección con caperuza en ARNm protegido con caperuza sintetizado internamente y comercialmente junto con un ARN protegido con caperuza N7Metil estándar, medido mediante ELISA. La señal detectada se deriva de la interacción del anticuerpo

anti-caperuza con la estructura de caperuza en las muestras de ARN.

DEFINICIONES

- 5 Para que la presente invención se comprenda más fácilmente, primero se definen ciertos términos. A lo largo de la memoria descriptiva se establecen definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos.

Afinidad: Tal como se sabe en la técnica, la "afinidad" es una medida de la fuerza con la que un ligando particular se une a (por ejemplo, se asocia de forma no covalente con) y/o la tasa o frecuencia con la que se disocia de su pareja.
 10 Tal como se sabe en la técnica, se puede utilizar cualquiera de una variedad de tecnologías para determinar la afinidad. En muchas realizaciones, la afinidad representa una medida de unión específica.

Hibridación: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hibridación" y equivalente gramatical se refieren a la formación de complejos (también llamados dúplex o híbridos) entre secuencias de nucleótidos que son
 15 suficientemente complementarias para formar complejos a través del emparejamiento de bases Watson-Crick o el emparejamiento de bases no canónicas. Se entenderá que las secuencias de hibridación no necesitan tener una complementariedad perfecta para proporcionar híbridos estables. En muchas situaciones, se formarán híbridos estables donde menos de aproximadamente el 10% de las bases estén desapareadas. En consecuencia, tal como se utiliza en el presente documento, el término "complementaria" se refiere a una molécula de ácido nucleico que forma
 20 un dúplex estable con su complemento en condiciones particulares, generalmente donde hay aproximadamente un 90% o más de homología (por ejemplo, aproximadamente un 95% o más, aproximadamente un 98% o más, o aproximadamente un 99% o más de homología). Los expertos en la materia comprenden cómo estimar y ajustar la rigurosidad de las condiciones de hibridación de modo que las secuencias que tienen al menos un nivel deseado de complementariedad se hibridarán de manera estable, mientras que las que tienen una complementariedad menor no lo harán. Para ver ejemplos de condiciones y parámetros de hibridación, véase, por ejemplo, Sambrook et al.,
 25 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, segunda edición, Cold Spring Harbor Press: Plainview, NY y Ausubel, "Current Protocols in Molecular biology", 1994, John Wiley & Sons: Secaucus, NJ. Se dice que la complementariedad entre dos moléculas de ácido nucleico es "completa", "total" o "perfecta" si todas las bases del ácido nucleico coinciden, y se dice que es "parcial" en caso contrario.

Anticuerpo: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa,
 35 lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como una miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican normalmente como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican normalmente como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos "cadena ligera variable" (VL) y "cadena pesada variable" (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente. Un anticuerpo puede ser específico para un antígeno particular (por ejemplo, caperuzones de ARNm m⁷G). El anticuerpo o su antígeno puede ser un analito o un compañero de unión. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados
 45 producidos por digestión con varias peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab')₂, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab')₂ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero (Fab')₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (ver, Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, NY (1993)), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Si bien varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la materia entenderá que dichos fragmentos Fab' pueden sintetizarse de novo ya sea químicamente o utilizando una metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo utilizando metodologías de ADN recombinante. En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos de cadena única, tales como anticuerpos Fv de cadena única (scFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen entre sí (directamente o a través de un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo. Un polipéptido Fv de cadena única ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias codificantes de VH y VL unidas directamente o unidas por un enlazador codificante de péptidos; véase, por ejemplo, Huston et al. (1988) PROC. NAT. ACAD. SCI. USA., 85:5879-5883). Existen varias estructuras para convertir las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas agregadas naturalmente, pero separadas químicamente, de una región V de anticuerpo en una molécula scFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. Nos. 5.091.513 y 5.132.405 y 4.956.778.

Aproximadamente: tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" o "alrededor de", tal

como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que se encuentran dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor que o menor que) del valor de referencia establecido a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un valor posible).

Sustancia de unión: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustancia de unión" incluye cualquier molécula, tal como una proteína (por ejemplo, un péptido, un anticuerpo, etc.), un ácido nucleico, un oligonucleótido, un compuesto químico, que se une a una diana (por ejemplo, un antígeno, un nucleótido, un péptido, un polinucleótido, etc.). Una sustancia de unión también se denomina agente de captura.

Compuesto y agente: Los términos "compuesto" y "agente" se utilizan en el presente documento de forma intercambiable. Se refieren a cualquier molécula de origen natural o no natural (es decir, sintética o recombinante), tal como una macromolécula biológica (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido o proteína), una molécula orgánica o inorgánica, o un extracto elaborado a partir de materiales biológicos, tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (en particular, mamíferos, incluidos los seres humanos). El compuesto puede ser una sola molécula o una mezcla o complejo de al menos dos moléculas.

Control: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "control" tiene su significado entendido en la técnica de ser un estándar contra el cual se comparan los resultados. Normalmente, los controles se utilizan para aumentar la integridad en experimentos aislando variables con el fin de llegar a una conclusión sobre dichas variables. En algunas realizaciones, un control es una reacción o ensayo que se realiza simultáneamente con una reacción o ensayo de prueba para proporcionar un comparador. En un experimento, se aplica la "prueba" (es decir, la variable que se está probando). En el segundo experimento, no se aplica el "control", la variable que se está probando. En algunas realizaciones, un control es un control histórico (es decir, de una prueba o ensayo realizado previamente, o una cantidad o resultado que se conoce previamente). En algunas realizaciones, un control es o comprende un registro impreso o guardado de otro modo. Un control puede ser un control positivo o un control negativo.

Señal detectable: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "señal detectable" se refiere a una señal que puede ser detectada o medida por un ser humano o una máquina. En algunas realizaciones, una señal detectable puede cuantificarse de manera que la intensidad de la señal esté relacionada con (por ejemplo, sea proporcional a) la cantidad del compuesto asociado con la señal. Dependiendo de la naturaleza de la señal, una señal detectable puede detectarse, medirse o cuantificarse mediante un medio espectroscópico, fotoquímico, bioquímico, inmunoquímico, eléctrico, óptico o químico. Una "señal detectable" también se denomina "agente detectable" o "resto detectable" en esta solicitud.

Kit: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales. Dichos sistemas de suministro pueden incluir sistemas que permitan el almacenamiento, transporte o suministro de diversos reactivos de diagnóstico o terapéuticos (por ejemplo, oligonucleótidos, anticuerpos, enzimas, etc. en los recipientes apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar el ensayo, etc.) de una ubicación a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recintos (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte pertinentes. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "kit fragmentado" se refiere a sistemas de suministro que comprenden dos o más recipientes separados que contienen cada uno una subparte de los componentes totales del kit. Los recipientes pueden suministrarse al receptor previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para su uso en un ensayo, mientras que un segundo recipiente puede contener oligonucleótidos. El término "kit fragmentado" pretende abarcar los kits que contienen reactivos específicos de analito (ASR, *Analyte Specific Reagents*) regulados por la sección 520(e) de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, pero no se limita a los mismos. De hecho, cualquier sistema de suministro que comprenda dos o más recipientes separados que contengan cada uno una subparte de los componentes totales del kit se incluye en el término "kit fragmentado". Por el contrario, un "kit combinado" se refiere a un sistema de suministro que contiene todos los componentes en un solo recipiente (por ejemplo, en una sola caja que alberga cada uno de los componentes deseados). El término "kit" incluye tanto los kits fragmentados como los combinados.

Marcado: Tal como se utiliza en el presente documento, el término "marcado" se refiere a la unión de una señal, un agente o un resto detectable a un compuesto. Véase la definición de señal detectable.

Nucleósido: El término "nucleósido" o "nucleobase", como se utiliza en el presente documento, se refiere a adenina ("A"), guanina ("G"), citosina ("C"), uracilo ("U"), timina ("T") y análogos de los mismos unidos a un carbohidrato, por ejemplo, D-ribosa (en ARN) o 2'-desoxi-D-ribosa (en ADN), a través de un enlace N-glicosídico entre el carbono anomérico del carbohidrato (átomo de carbono 1' del carbohidrato) y la nucleobase. Cuando la nucleobase es purina, por ejemplo, A o G, el azúcar ribosa está generalmente unido a la posición N9 del anillo heterocíclico de la purina. Cuando la nucleobase es pirimidina, por ejemplo, C, T o U, el azúcar está generalmente unido a la posición N1 del anillo heterocíclico. El carbohidrato puede estar sustituido o no sustituido. Los azúcares ribosa sustituidos incluyen, pero no se limitan a, aquellos en los que uno o más de los átomos de carbono, por ejemplo el átomo de carbono 2',

está sustituido por uno o más de los mismos o diferentes grupos Cl, F, -R, OR, -NR₂ o halógeno, donde cada R es independientemente H, alquilo C₁ - C₆ o arilo C₅ - C₁₄. Los ejemplos de ribosa incluyen ribosa, 2'-desoxirribosa, 2',3'-didesoxirribosa, 2'-haloribosa, 2'-fluororibosa, 2'-clororibosa y 2'-alquilribosa, por ejemplo, nucleótidos 4'-alfa-anoméricos, nucleótidos 1'-alfa-anoméricos 2'-O-metilo (Asseline et al., NUCL. ACIDS RES., 19:4067-74 [1991]), unidos en 2'-4' y 3'-4' y otras modificaciones de azúcar bicíclicas "bloqueadas" o "LNA" (Documento WO 98/22489; WO 98/39352; WO 99/14226).

Nucleótido: El término "nucleótido" como se utiliza en el presente documento significa un nucleósido en una forma fosforilada (un éster de fosfato de un nucleósido), como una unidad monomérica o dentro de un polímero de polinucleótido. "Nucleótido 5'-trifosfato" se refiere a un nucleótido con un grupo de éster de trifosfato en la posición 5', a veces denominado "NTP", o "dNTP" y "ddNTP" para señalar particularmente las características estructurales del azúcar ribosa. El grupo de éster de trifosfato puede incluir sustituciones de azufre para los diversos restos de oxígeno, por ejemplo, alfa-tionucleótido 5'-trifosfatos. Los nucleótidos pueden existir en las formas mono-, di- o trifosforiladas. Los átomos de carbono de la ribosa presente en los nucleótidos se designan con un carácter prima (') para distinguirlos de la numeración de la cadena principal en las bases. Para una revisión de la química de polinucleótidos y ácidos nucleicos, véase Shabarova, Z. y Bogdanov, A. Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, VCH, Nueva York, 1994.

Ácido nucleico: Los términos "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "polinucleótido" u "oligonucleótido" pueden usarse en el presente documento de manera intercambiable. Se refieren a polímeros de monómeros de nucleótidos o análogos de los mismos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) y combinaciones de los mismos. Los nucleótidos pueden ser de origen genómico, sintético o semisintético. A menos que se indique lo contrario, los términos abarcan estructuras similares a ácidos nucleicos con cadenas principales sintéticas, así como productos de amplificación. Como entenderá un experto en la materia, la longitud de estos polímeros (es decir, el número de nucleótidos que contiene) puede variar ampliamente, a menudo dependiendo de su función o uso previsto. Los polinucleótidos pueden ser moléculas lineales, lineales ramificadas o circulares. Los polinucleótidos también tienen contraiones asociados, tales como H⁺, NH₄⁺, trietilamonio, Mg⁺, Na⁺ y similares. Un polinucleótido puede estar compuesto en su totalidad por desoxirribonucleótidos, en su totalidad por ribonucleótidos o por mezclas químicas de los mismos. Los polinucleótidos pueden estar compuestos por nucleobases internucleotídicas y análogos de azúcares.

En algunas realizaciones, el término "oligonucleótido" se utiliza en el presente documento para indicar un polinucleótido que comprende entre aproximadamente 5 y aproximadamente 150 nucleótidos, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 75 nucleótidos, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos. A lo largo de la memoria descriptiva, siempre que un oligonucleótido esté representado por una secuencia de letras (elegidas, por ejemplo, de las cuatro letras de bases: A, C, G y T, que indican adenosina, citidina, guanosa y timidina, respectivamente), los nucleótidos se presentan en el orden 5' a 3' de izquierda a derecha. Una "secuencia de polinucleótidos" se refiere a la secuencia de monómeros de nucleótidos a lo largo del polímero. A menos que se indique lo contrario, siempre que se represente una secuencia de polinucleótidos, se entenderá que los nucleótidos están en orientación 5' a 3' de izquierda a derecha.

Los ácidos nucleicos, polinucleótidos y oligonucleótidos pueden estar compuestos de bases de nucleótidos estándar o sustituidos por análogos de isoformas de nucleótidos, incluyendo, pero sin limitarse a, bases iso-C e iso-G, que pueden hibridarse de manera más o menos permisible que las bases estándar, y que se hibridarán preferentemente con bases de análogos de isoformas complementarias. Muchas de estas bases de isoformas se describen, por ejemplo, en Benner et al. (1987) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 52, 53-63. Los análogos de monómeros de nucleótidos de origen natural incluyen, por ejemplo, 7-deazaadenina, 7-deazaguanina, 7-deaza-8-azaguanina, 7-deaza-8-azaadenina, 7-metilguanina, inosina, nebularina, nitropirrol (Bergstrom, J. Amer. Chem. Soc., 117:1201-1209 [1995]), nitroindol, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina, pseudouridina, pseudocitosina, pseudoisocitosina, 5-propinilcitosina, isocitosina, isoguanina (Seela, Patente de EE.UU. N.º 6.147.199), 7-desazaguanina (Seela, Patente de EE.UU. N.º 5.990.303), 2-azapurina (Seela, WO 01/16149), 2-tiopirimidina, 6-tioguanina, 4-tiotimina, 4-tiouracilo, O-6-metilguanina, N-6-metiladenina, O-4-metilimina, 5,6-dihidrotimina, 5,6-dihidrouracilo, 4-metilindol, pirazolo[3,4-D]pirimidinas, "PPG" (Meyer, Patentes de EE.UU. Nos. 6.143.877 y 6.127.121; Gall, WO 01/38584) y etenoadenina (Fasman (1989) en Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, pág. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla.).

El término "3'" se refiere a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 3' (es decir, en dirección 3') de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido. El término "5'" se refiere a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 5' (es decir, en dirección 5') de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido. Los términos "extremo 3'" y "terminal 3'", como se utilizan en el presente documento en referencia a una molécula de ácido nucleico, se refieren al extremo del ácido nucleico que contiene un grupo hidroxilo libre unido al carbono 3' del azúcar pentosa terminal. El término "extremo 5'" y "terminal 5'", como se utilizan en el presente documento en referencia a una molécula de ácido nucleico, se refieren al extremo de la molécula de ácido nucleico que contiene un grupo hidroxilo o fosfato libre unido al carbono 5' del azúcar pentosa terminal. En algunas realizaciones de la invención, los cebadores de oligonucleótidos comprenden tramos de poliadenosina en sus extremos 5'.

Anticuerpo primario y secundario: como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo primario" se refiere

típicamente a un anticuerpo que se une a una diana de interés directamente. El término "anticuerpo secundario", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a otro anticuerpo (primario) que, a su vez, está unido a una diana de interés.

- 5 *Diana*: Como se utiliza en este documento, el término "diana" se refiere a una molécula de interés.

DESCRIPCION DETALLADA

- 10 La presente invención proporciona, entre otras cosas, procedimientos mejorados para cuantificar la eficiencia de la protección con caperuza del ARNm. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para cuantificar la eficiencia de la protección con caperuza del ARNm basándose en la formación y determinación cuantitativa de un complejo entre una sustancia de unión específica a caperuza (por ejemplo, un anticuerpo específico de caperuza) y el ARNm protegido con caperuza.
- 15 Diversas realizaciones de la presente invención son útiles para cuantificar la eficiencia de la protección con caperuza de la síntesis de ARNm *in vitro*. Por lo tanto, la presente invención proporciona un enfoque de control de calidad importante para la fabricación de ARNm y, en particular, para evaluar la seguridad, eficacia y viabilidad comercial de ARNm con aplicaciones terapéuticas.
- 20 En las siguientes secciones se describen en detalle diversos aspectos de la invención. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

Protección con caperuza y/o metilación del ARNm

- 25 Normalmente, los ARNm eucariotas tienen una estructura de "caperuza" en sus extremos 5', que desempeña un papel importante en la traducción. Por ejemplo, la caperuza desempeña un papel fundamental en el metabolismo del ARNm y se requiere en diversos grados para el procesamiento y la maduración de una transcripción de ARN en el núcleo, el transporte del ARNm desde el núcleo hasta el citoplasma, la estabilidad del ARNm y la traducción eficiente del ARNm a proteína. La estructura de caperuza en 5' está implicada en el inicio de la síntesis de proteínas de los ARNm celulares eucariotas y virales eucariotas y en el procesamiento y la estabilidad del ARNm *in vivo* (véase, por ejemplo, Shatkin, A.J., CELL, 9: 645-653 (1976)); Furuichi, et al., NATURE, 266: 235 (1977); FEDERATION OF EXPERIMENTAL BIOLOGISTS SOCIETY LETTER 96: 1-11 (1978)); Sonenberg, N., PROG. Nuc. ACID RES MOL BIOL, 35: 173-207 (1988)). Existen proteínas de unión a caperuza específicas que son componentes de la maquinaria necesaria para el inicio de la traducción de un ARNm (véase, por ejemplo, Shatkin, CELL, 40: 223-24 (1985)); Sonenberg, N., PROG. Nuc. ACID RES MOL BIOL, 35: 173-207 (1988)). La caperuza del ARNm es reconocida por el factor de iniciación de la traducción eIF4E (Gingras et al., ANN. RDO. BIOCHEM. 68:913-963 (1999); Rhoads, RE, J. BIOL. CHEM. 274: 30337-3040, (1999)). La estructura de la caperuza 5' también proporciona resistencia a la actividad de la exonucleasa 5' y su ausencia da como resultado una rápida degradación del ARNm (ver, por ejemplo, Ross, J., MOL. BIOL. MED. 5: 1-14 (1988); Green, M.R. et al., CELL, 32: 681-694 (1983)). Dado que las transcripciones primarias de muchos genes celulares eucariotas y genes virales eucariotas requieren procesamiento para eliminar secuencias intermedias (intrones) dentro de las regiones codificantes de estas transcripciones, el beneficio de la caperuza también se extiende a la estabilización de dicho pre-ARNm.
- 40 Se ha descrito que los ARN protegidos con caperuza *in vitro* se traducen de manera más eficiente que las transcripciones no protegidas con caperuza en una variedad de sistemas de traducción *in vitro*, tales como los sistemas de traducción de lisado de reticulocitos de conejo o de germen de trigo (véase, por ejemplo, Shimotohno, K., et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 74: 2734-2738 (1977)); Paterson y Rosenberg, NATURE, 279: 692 (1979)). También se cree que este efecto se debe en parte a la protección del ARN frente a las exorribonucleasas presentes en el sistema de traducción *in vitro*, así como a otros factores.
- 50

- Las estructuras de caperuza que se producen de forma natural comprenden una 7-metil guanosina que está unida a través de un puente de trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, lo que da como resultado una caperuza dinucleotídica de m⁷G(5')ppp(5')N, donde N es cualquier nucleósido. *In vivo*, la caperuza se añade enzimáticamente. La caperuza se añade en el núcleo y es catalizada por la enzima guanilil transferasa. La adición de la caperuza al extremo terminal 5' del ARN se produce inmediatamente después del inicio de la transcripción. El nucleósido terminal es típicamente una guanosina y está en la orientación inversa a todos los demás nucleótidos, es decir, G(5')ppp(5')GpNpNp.
- 55

- 60 Una caperuza común para el ARNm producida por transcripción *in vitro* es m⁷G(5')ppp(5')G, que se ha utilizado como la caperuza dinucleotídica en la transcripción con la ARN polimerasa T7 o SP6 *in vitro* para obtener ARN que tienen una estructura de caperuza en sus extremos 5'. El procedimiento predominante para la síntesis *in vitro* de ARNm protegido con caperuza emplea un dinucleótido preformado de la forma m⁷G(5')ppp(5')G ("m⁷GpppG") como iniciador de la transcripción. Una desventaja de utilizar m⁷G(5')ppp(5')G, un dinucleótido pseudosimétrico, es la propensión del 3'-OH del resto G o m⁷G para servir como nucleófilo iniciador para el alargamiento transcripcional. En otras palabras, la presencia de un 3'-OH en los restos m⁷G y G hace que hasta la mitad de los ARNm incorporen caperuzas en una
- 65

orientación incorrecta. Esto conduce a la síntesis de dos ARN isoméricos de la forma $m^7G(5')pppG(pN)_n$ y $G(5')pppm^7G(pN)_n$, en proporciones aproximadamente iguales, dependiendo de las condiciones iónicas de la reacción de transcripción. Las variaciones en las formas isoméricas pueden afectar negativamente a la traducción *in vitro* y son indeseables para un producto terapéutico homogéneo.

Hasta la fecha, la forma habitual de una caperuza de dinucleótido sintética utilizada en experimentos de traducción *in vitro* es el análogo de caperuza anti-inverso ("ARCA"), que generalmente es un análogo de caperuza modificado en el que el grupo OH 2' o 3' se reemplaza por $-OCH_3$. Los análogos de caperuza ARCA y triplemente metilados se incorporan en la orientación directa. La modificación química de m^7G en el grupo OH 2' o 3' del anillo de ribosa da como resultado que la caperuza se incorpore únicamente en la orientación directa, aunque el grupo OH 2' no participe en el enlace fosfodiéster. Jemielity, J. et al., "Novel anti-reverse' cap analogs with superior translational properties" RNA, 9: 1108-1122 (2003)). Se ha establecido el procedimiento selectivo para la metilación de guanosina en N7 y la O-metilación en 3' y la síntesis de 5' difosfato (Kore, A. y Parmar, G. NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES AND NUCLEIC ACIDS, 25:337-340, (2006) y Kore, AR, et al. NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES AND NUCLEIC ACIDS 25(3): 307-14, (2006).

La transcripción de ARN normalmente comienza con un nucleósido trifosfato (normalmente una purina, A o G). La transcripción *in vitro* normalmente comprende una ARN polimerasa de fago, tal como T7, T3 o SP6, una plantilla de ADN que contiene un promotor de la polimerasa de fago, nucleótidos (ATP, GTP, CTP y UTP) y un tampón que contiene sal de magnesio. La síntesis de ARN protegido con caperuza incluye la incorporación de un análogo de caperuza (por ejemplo, m^7GpppG) en la reacción de transcripción, que en algunas realizaciones se incorpora mediante la adición de guanilil transferasa recombinante. El exceso de m^7GpppG a GTP (4:1) aumenta la posibilidad de que cada transcripción tenga un caperuza 5'. Los kits para la protección con caperuza de ARNm transcritos *in vitro* están disponibles comercialmente, incluido el kit mMESSAGE mMACHINE® (Ambion, Inc., Austin, Texas). Estos kits suelen producir un 80 % de ARN protegido con caperuza y un 20 % de ARN no protegido con caperuza, aunque el rendimiento total de ARN es menor, ya que la concentración de GTP se convierte en un factor limitante, ya que el GTP es necesario para el alargamiento de la transcripción. Sin embargo, actualmente no hay ninguna tecnología o procedimiento disponible que permita cuantificar la eficiencia de la protección con caperuza sin alteraciones permanentes de los ARNm en una muestra.

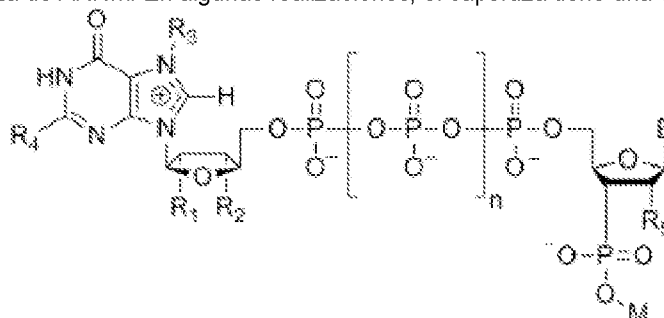
Se conocen en la técnica procedimientos para estimar la eficiencia de la protección con caperuza. Por ejemplo, la ARN polimerasa T7 se puede incubar con un dinucleótido de caperuza, los cuatro ribonucleótidos trifosfatos, $[\alpha\text{-}^{32}P]GTP$ y una plantilla de ADN corta en la que G es el primer ribonucleótido especificado después del promotor (véase Grudzien, E. et al. "Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNA with high translation efficiency", RNA, 10: 1479-1487 (2004))). Cualquier nucleótido en el lado 5' de un residuo G adquiere un grupo 3'-fosfato marcado con ^{32}P después de la digestión con ARNasa T2 por transferencia al vecino más cercano. A continuación, se utiliza la cromatografía de intercambio aniónico para resolver los nucleósidos 3'-monofosfatos marcados, resultantes de posiciones internas en el ARN, a partir de productos 5'-terminales. Los productos 5'-terminales son de dos tipos. Los ARN no protegidos con caperuza producen guanosina 5'-trifosfato 3'-monofosfato marcado ($p3Gp^*$; en el que * indica el grupo fosfato marcado). Los ARN protegidos con caperuza producen varias estructuras 5'-terminales, dependiendo de la naturaleza del análogo de caperuza utilizado (m^7Gp3Gp^* y $Gp3m^7Gp^*$ cuando el análogo de caperuza es m^7Gp3G).

Sin embargo, un inconveniente importante de estos procedimientos es que toda la muestra se vuelve radiactiva o de otro modo se destruye, y por lo tanto no se puede utilizar en aplicaciones terapéuticas posteriores. Aunque en teoría se podría llevar a cabo una reacción de cuantificación separada junto con una reacción de síntesis terapéutica, dichas disposiciones son inadecuadas. Las muestras simultáneas, pero separadas, son inherentemente variables debido al error intraoperador y a variaciones mínimas en las condiciones de reacción. Esto es particularmente cierto para las cuantificaciones que utilizan una curva estándar, en las que un valor para un punto en la curva estándar en un día determinado puede no ser el mismo en el día siguiente. Para obtener resultados precisos en el cálculo de la eficiencia de protección con caperuza, es deseable utilizar una muestra representativa tomada de la reacción de síntesis terapéutica, una muestra para la que se puede evaluar la eficiencia de protección con caperuza en relación con los controles y que es representativa de la eficiencia de protección con caperuza en la reacción de síntesis terapéutica.

Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos mejorados para cuantificar directamente la eficiencia de protección con caperuza del ARNm en una muestra (por ejemplo, una muestra alícuota representativa de una reacción de síntesis *in vitro*). Los procedimientos de la invención comprenden el uso de una sustancia de unión específica a caperuza en condiciones que permiten la formación de un complejo entre la sustancia de unión específica a caperuza y el ARNm protegido con caperuza. La formación de un complejo entre la sustancia de unión específica a caperuza y el ARNm protegido con caperuza permite la determinación cuantitativa de la cantidad del complejo (es decir, ARNm protegidos con caperuza) en relación con un control positivo de productos protegidos con caperuza o un control negativo de productos no protegidos con caperuza. En otras palabras, la unión indica la cantidad de dianas de ARNm protegidos con caperuza en la muestra y la eficiencia de protección con caperuza en una reacción de la que se deriva la muestra. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la etapa de determinar cuantitativamente la cantidad del complejo comprende la realización de un ensayo de tipo ELISA en el que la sustancia de unión específica a caperuza es un anticuerpo u otra proteína que se une específicamente a una caperuza de ARNm. (véase la Figura 1). La

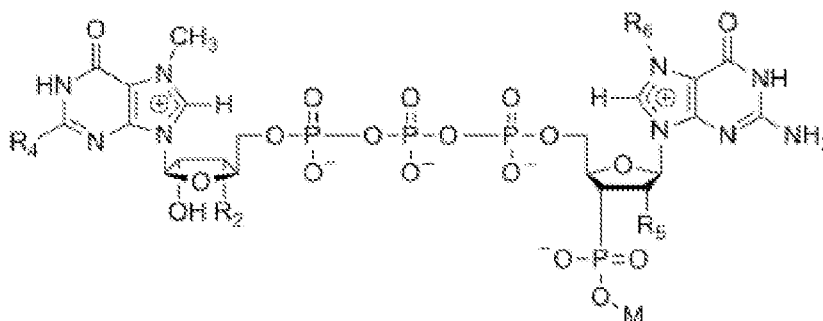
formación de complejos se puede cuantificar mediante la adición de un agente de detección específico para la sustancia de unión específica a caperuza (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón de cabra que se une a un anticuerpo anti-m⁷G de ratón) y que produce una señal directamente proporcional a la cantidad de ARNm protegido con caperuza. Las realizaciones de la invención se pueden utilizar para cuantificar la eficiencia de protección con caperuza de una amplia variedad de especies de ARN, incluido el ARNm transcrito *in vitro*, el ARNm eucariota aislado y el ARN viral. Las realizaciones de la invención se pueden utilizar para cuantificar cualquiera de las estructuras de caperuza y análogos de caperuza descritos en el presente documento.

Los procedimientos de la invención descritos en el presente documento son generalmente aptos para la cuantificación de cualquier tipo a caperuza de ARNm. En algunas realizaciones, el caperuza tiene una estructura de fórmula I:



en la que B es una nucleobase, R₁ se selecciona entre un halógeno, OH y OCH₃, R₂ se selecciona entre H, OH y OCH₃, R₃ es CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃ o nulo, R₄ es NH₂, R₅ se selecciona entre OH, OCH₃ y un halógeno, n es 1, 2 o 3, y M es un nucleótido, es decir, la tercera base del ARNm. En realizaciones particulares, B es guanina, pero puede ser cualquier nucleobase. En algunas realizaciones, la caperuza es m⁷G(5')ppp(5')G en la que un residuo 2'-O-metilo está presente en el grupo 2' OH del anillo de ribosa de la base 1 (es decir, en la posición R₅ de la Fórmula I).

En algunas realizaciones, la caperuza tiene una estructura de fórmula II:



en la que R₂ es H o CH₃, R₄ es NH₂, R₅ es OH o OCH₃, R₆ es H o CH₃, y M es un nucleótido del ARNm.

Los análogos de caperuza incluyen, pero no se limitan a, estructuras químicas seleccionadas del grupo que consiste en m⁷GpppG, m⁷GpppA, m⁷GpppC; análogos de caperuza no metilados (por ejemplo, GpppG); análogo de caperuza dimetilado (por ejemplo, m^{2,7}GpppG), análogo de caperuza trimetilado (por ejemplo, m^{2,2,7}GpppG), análogos de caperuza simétricos dimetilados (por ejemplo, m⁷Gpppm⁷G), o análogos de caperuza antiinverso (por ejemplo, ARCA; m^{7,2}OmeGpppG, m^{7,2d}GpppG, m^{7,3}OmeGpppG, m^{7,3d}GpppG y sus derivados de tetrafosfato) (véase, por ejemplo, Jemielity, J. et al., "Novel anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003)).

En una realización preferida, la caperuza es 7-metil guanilato ("m⁷G") unido a través de un puente de trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, lo que da como resultado m⁷G(5')ppp(5')N, donde N es cualquier nucleósido. Una realización preferida de una caperuza m⁷G utilizada en realizaciones de la invención es m⁷G(5')ppp(5')G.

En algunas realizaciones, el ARNm no está protegido con caperuza. (Figura 2A) El ARNm sin caperuza puede estar presente en una muestra (es decir, como resultado de una protección con caperuza incompleta en una reacción de transcripción *in vitro*) y/o puede usarse como control para cuantificar el nivel de especies no protegidas con caperuza en una muestra. En algunas realizaciones, la caperuza es una estructura Caperuza O. (Figura 2B). Las estructuras de Caperuza O carecen de un residuo 2'-O-metilo de la ribosa unido a las bases 1 y 2. En algunas realizaciones, la caperuza es una estructura Caperuza 1. (Figura 2C) Las estructuras Caperuza 1 tienen un residuo 2'-O-metilo en la base 1. En algunas realizaciones, la caperuza es una estructura de Caperuza 2. Las estructuras de Caperuza 2 tienen un residuo 2'-O-metilo unido a ambas bases 1 y 2.

En la técnica se conocen diversos análogos de caperuza m⁷G, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Estos incluyen el m⁷GpppG descrito anteriormente, así como los análogos de caperuza ARCA 3'-OCH₃ y 2'-OCH₃ (Jemielity, J. et al., ARN, 9: 1108-1122 (2003)). Los análogos de caperuza adicionales para su uso en realizaciones de la invención incluyen análogos de dinucleósido tetrafosfato N7-bencilado (descritos en Grudzien, E. et al., RNA, 10: 1479-1487 (2004)), análogos de caperuza de fosforotioato (descritos en Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13: 1745-1755 (2007)) y análogos de caperuza (incluidos los análogos de caperuza biotinilados) descritos en las Patentes de EE. UU. N.º 8.093.367 y 8.304.529.

Producción de ARNm protegidos con caperuza

Los ARNm protegidos con caperuza adecuados para los procedimientos cuantitativos divulgados en este documento se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, el ARNm protegido con caperuza se produce mediante transcripción *in vitro*, desarrollado originalmente por Krieg y Melton (METHODS ENZYMOL, 1987, 155: 397-415) para la síntesis de ARN utilizando una ARN polimerasa de fago. Normalmente, estas reacciones incluyen al menos una ARN polimerasa de fago (T7, T3 o SP6), una plantilla de ADN que contiene un promotor de la polimerasa de fago, nucleótidos (ATP, CTP, GTP y UTP) y un tampón que contiene una sal de magnesio. Los rendimientos de la síntesis de ARN se pueden optimizar aumentando las concentraciones de nucleótidos, ajustando las concentraciones de magnesio e incluyendo pirofosfatasa inorgánica (Patente de EE.UU. No. 5.256.555; Gurevichy et al., ANAL. BIOCHEM. 195:207-213 (1991); Sampson, JR y Uhlenbeck, OC, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 85, 1033-1037 (1988)); Wyatt, JR y et al., BIOTECHNIQUES, 11:764-769 (1991)). Algunas realizaciones utilizan kits comerciales para la síntesis a gran escala de transcripciones *in vitro* (por ejemplo, MEGAscript®, Ambion). El ARN sintetizado en estas reacciones se caracteriza habitualmente por un nucleótido terminal 5' que tiene un trifosfato en la posición 5' de la ribosa. Normalmente, dependiendo de la combinación de ARN polimerasa y promotor utilizada, este nucleótido es una guanosina, aunque puede ser una adenosina (véase, por ejemplo, Coleman, T.M., et al., NUCLEIC ACIDS RES., 32: e14 (2004)). En estas reacciones, los cuatro nucleótidos suelen estar incluidos en concentraciones equimolares y ninguno de ellos es limitante.

Algunas realizaciones de la invención son reacciones por lotes, es decir, todos los componentes se combinan y a continuación se incuban a aproximadamente 37 °C para promover la polimerización del ARN hasta que finaliza la reacción. Normalmente, se utiliza una reacción por lotes por conveniencia y para obtener tanto ARN como se necesite de dichas reacciones para sus experimentos. En algunas realizaciones, se utiliza un sistema "alimentado por lotes" (véase, por ejemplo, JEFFREY A. KERN, BATCH AND FED-BATCH STRATEGIES FOR LARGE-SCALE PRODUCTION OF RNA BY IN VITRO TRANSACTION (Universidad de Colorado) (1997))) para aumentar la eficiencia de la reacción de transcripción *in vitro*. Se combinan todos los componentes, pero a continuación se añaden cantidades adicionales de algunos de los reactivos con el tiempo, tales como los nucleótidos y el magnesio, para intentar mantener las condiciones de reacción constantes. Además, en algunas realizaciones, el pH de la reacción se puede mantener en 7,4 controlándolo con el tiempo y añadiendo KOH según sea necesario.

Para sintetizar un ARN protegido con caperuza mediante transcripción *in vitro*, se incluye un análogo de caperuza (por ejemplo, N-7 metil GpppG; es decir, m⁷GpppG) en la reacción de transcripción. En algunas realizaciones, la ARN polimerasa incorporará el análogo de caperuza tan fácilmente como cualquiera de los otros nucleótidos; es decir, no hay sesgo para el análogo de caperuza. En algunas realizaciones, el análogo de caperuza se incorporará en el extremo 5' por la enzima guanilil transferasa. En algunas realizaciones, el análogo de caperuza se incorporará solo en el extremo 5' porque no tiene un trifosfato 5'. En algunas realizaciones que utilizan una ARN polimerasa T7, T3 y SP6, el nucleótido +1 de sus respectivos promotores es habitualmente un residuo G y si tanto GTP como m⁷GpppG están presentes en concentraciones iguales en la reacción de transcripción, entonces cada uno tiene la misma probabilidad de incorporarse en la posición +1. En algunas realizaciones, m⁷GpppG está presente en estas reacciones en concentraciones varias veces más altas que el GTP para aumentar las posibilidades de que una transcripción tenga una caperuza en 5'. En algunas realizaciones, se utiliza un kit mMESSAGING mMACHINE® (Cat. #1344, Ambion, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, donde se recomienda que la relación de caperuza a GTP sea 4:1 (6 mM: 1,5 mM). En algunas realizaciones, a medida que aumenta la relación del análogo de caperuza a GTP en la reacción, la relación de ARN protegido con caperuza a ARN protegido sin caperuza aumenta proporcionalmente. Las consideraciones de eficiencia de protección con caperuza deben equilibrarse con consideraciones de rendimiento. Aumentar la relación de análogo de caperuza a GTP en la reacción de transcripción produce rendimientos más bajos de ARN total porque la concentración de GTP se vuelve limitante cuando se mantiene constante la concentración total de caperuza y GTP. Por lo tanto, el rendimiento final de ARN depende de la concentración de GTP, que es necesaria para el alargamiento de la transcripción. Los demás nucleótidos (ATP, CTP, UTP) están presentes en exceso.

En realizaciones particulares, el ARNm se sintetiza mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica un gen de elección. En algunas realizaciones, la transcripción *in vitro* incluye la adición de una estructura de caperuza 5', Caperuza 1 (Figura 2C), que tiene un residuo 2'-O-metilo en el grupo 2' OH del anillo de ribosa de base 1, mediante conjugación enzimática de GTP a través de la guanilil transferasa. En algunas realizaciones, la transcripción *in vitro* incluye la adición de una estructura de caperuza 5', Caperuza O (Figura 2B), que carece del residuo 2'-O-metilo, mediante conjugación enzimática de GTP a través de la guanilil transferasa. En algunas

realizaciones, la transcripción *in vitro* incluye la adición de una caperuza 5' de cualquiera de las estructuras de caperuza descritas en el presente documento mediante conjugación enzimática de GTP a través de la guanilil transferasa. En algunas realizaciones, se incorporó una cola de poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud (según lo determinado por electroforesis en gel) mediante la adición de ATP junto con la poliA polimerasa. En algunas realizaciones, la cola de poli(A) tiene aproximadamente entre 100 y 250 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la cola de poli(A) tiene aproximadamente entre 50 y 300 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, los productos de transcripción *in vitro* incluyen regiones no traducidas 5' y 3'.

Sustratos sólidos para la captura de ARNm

En algunas realizaciones, el ARNm protegido con caperuza se captura en un sustrato sólido antes de ponerse en contacto con una sustancia de unión específica a caperuza. Estas realizaciones no están limitadas por el tipo de sustrato sólido. El único requisito de dichas realizaciones es que el sustrato sólido debe ser capaz de unirse directa o indirectamente a los ARNm protegidos con caperuza y, en algunas realizaciones, también a los ARNm no protegidos con caperuza. El sustrato puede ser una microplaca, una perla magnética, una partícula, una perla polimérica, una resina cromatográfica, un papel de filtro, nitrocelulosa, diazocelulosa, vidrio, látex, poliestireno, cloruro de polivinilo, propileno, polietileno, dextrano, sefarsa, agar, almidón, nailon, gel de sílice o hidrogel.

En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende un primer agente de captura que se une al ARNm que está protegido o no con caperuza. En algunas realizaciones, el primer agente de captura es una secuencia de polinucleótido monocatenario que corresponde a (es decir, es complementaria con) una secuencia en el ARNm monocatenario. Por lo tanto, cuando se une a un soporte sólido, el primer agente de captura de polinucleótido puede hibridarse con el ARNm. En un ejemplo particular, el primer agente de captura es un tramo de politimidina (por ejemplo, oligo-dT) que es capaz de hibridarse con la cola de poliA del ARNm. En algunas realizaciones, una región del extremo 3' no traducido puede ser la diana de un primer agente de captura (por ejemplo, un oligonucleótido de secuencia complementaria). En algunas realizaciones, las regiones codificantes específicas de genes del ARNm pueden ser la diana. El oligonucleótido de captura puede tener una longitud de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 15 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos o más.

Una amplia variedad de secuencias de ácidos nucleicos pueden unirse a un soporte sólido para facilitar la captura. Asimismo, la manera en que los agentes de captura de polinucleótidos se unen directa o indirectamente al soporte sólido no debe ser limitante de ninguna manera. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente de captura de polinucleótidos puede sintetizarse en la superficie de una manera adecuada para la desprotección pero no para la escisión del soporte de síntesis (véase, por ejemplo, Weiler et al., NUCL. ACIDS RES., 25(14): 2792-2799 (1997)). En algunas realizaciones, el agente de captura de polinucleótidos se puede unir covalentemente a una superficie mediante la reacción de un grupo funcional adecuado en las características de aislamiento con un grupo funcional de la superficie (véase, por ejemplo, Geiger et al., NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES 17(9-11):1717-1724 (1998)).

En una realización particular, el oligonucleótido del tramo de politimidina está biotinilado y, por lo tanto, es capaz de unirse a un soporte sólido recubierto de avidina o estreptavidina. Los oligonucleótidos del tramo de politimidina biotinilados están disponibles comercialmente (por ejemplo, Promega, Invitrogen). Alternativamente, los oligonucleótidos del tramo de politimidina o cualquier otro agente de captura de polinucleótidos se pueden sintetizar de forma personalizada y biotinar de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los residuos de biotina-11-dUTP se pueden agregar enzimáticamente, utilizando desoxinucleotidil transferasa terminal, al extremo 3' de un oligonucleótido sintético (véase, por ejemplo, Riley, LK et al., DNA, 5: 333-337 (1986)). También se encuentran disponibles comercialmente una amplia variedad de soportes sólidos recubiertos con avidina y estreptavidina (por ejemplo, microplacas Pierce de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina; Thermo Scientific).

Los oligonucleótidos se pueden sintetizar por medios convencionales, por ejemplo, mediante química de fosforamidita en un sintetizador de ADN comercial. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se sintetizan en un soporte de fase sólida, tal como se describe en Gryaznov y Letsinger, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 20: 3403-3409 (1992)). Brevemente, después de la desprotección, el hidroxilo 5' de una desoxitimidina enlazada a un soporte a través de un enlace succinilo estándar se fosfita mediante reacción con cloro-(diisopropiletilamino)-metoxifosfina en un disolvente apropiado, tal como diclorometano/diisopropiletilamina. Después de la activación con tetrazol, la timidina 5'-fosfitada se hace reaccionar con un 5'-trilit-O-3'-amino-3'-desoxinucleósido para formar un dímero nucleósido-timidina en el que los restos de nucleósido están unidos covalentemente por un enlace fosforamidato. El resto del oligonucleótido se sintetiza mediante química estándar de la fosforamidita. Después de escindir el enlace succinilo, el oligonucleótido con un grupo amino 3' terminal se genera escindiendo el enlace fosforamidato mediante tratamiento ácido, por ejemplo, ácido acético acuoso al 80% durante 18-20 horas a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, el primer agente de captura es una proteína. Se puede utilizar cualquier proteína que se una selectivamente al ARNm. En algunas realizaciones, una primera proteína de agente de captura se une al extremo 3' del ARNm (por ejemplo, proteínas de unión a poli(A)). En otras realizaciones, las primeras proteínas de agente de captura se unen al extremo 5' del ARNm (por ejemplo, anticuerpos anti-m⁷G). Las proteínas de ejemplo que pueden funcionar como primeros agentes de captura incluyen proteínas de unión a poli(A) ("PABP"), anticuerpos anti-m⁷G y

fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y factor de iniciación eucariota 4E (eIF-4E). Los procedimientos de captura de ARNm dependiente de caperuza se han descrito previamente (Edery, I. et al., MOL CELL BIOL, 15: 3363-3371 (1995)); publicación previa a la concesión en EE.UU. 2007/0281336) y pueden adaptarse a realizaciones de la invención.

Los procedimientos para la unión química de los primeros agentes de captura (ya sean proteínas o ácidos nucleicos) a superficies de soporte sólidas pueden implicar la reacción de un grupo nucleofílico (por ejemplo, una amina o tiol) del agente de captura que se va a inmovilizar, con un grupo electrófilo sobre la superficie del soporte sólido. Alternativamente, el nucleófilo puede estar presente en el soporte y el electrófilo (por ejemplo, ácido carboxílico activado) puede estar presente en las características antiadsorción. En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura se pueden unir a un soporte sólido mediante química de clic. En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura se unen mediante una 1,3-cicloadición de una azida con un alquino, opcionalmente en presencia de un catalizador de cobre. Los procedimientos de uso de la química de clic son conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Rostovtsev et al., Angew. CHEM INT. Ed. 41: 2596-99 (2002) y Sun et al., BIOCONJUGATE CHEM., 17: 52-57 (2006)).

En algunas realizaciones de la invención, los primeros agentes de captura se unen directamente a sustratos sólidos a través de procedimientos estándar de acoplamiento de amina N-etil-N'-(dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS). El acoplamiento de amina introduce ésteres de N-hidroxisuccinimida en la matriz de superficie mediante la modificación de los grupos carboximetilo con una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS) y N-etil-N'-(dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). Estos ésteres reaccionan a continuación espontáneamente con aminas y otros grupos nucleófilos en el resto de captura para formar enlaces covalentes. Esta es una técnica de funcionalización de superficie altamente estable y común. En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura se unen directamente al sustrato sólido utilizando un tampón de recubrimiento de 50 mM de NaHCO₃, pH 9,6.

Existen disponibles comercialmente numerosos tipos de soportes sólidos derivatizados con grupos amino, grupos de ácido carboxílico, isocianatos, isotiocianatos y grupos malimida, que pueden facilitar el acoplamiento del primer agente de captura al sustrato.

En algunas realizaciones en las que los primeros agentes de captura son proteínas, las proteínas pueden biotinilarse de acuerdo con procedimientos conocidos y, posteriormente, unirse a sustratos sólidos recubiertos con avidina o estreptavidina. Existen reactivos y kits de marcaje disponibles comercialmente para biotinar específicamente anticuerpos y otras proteínas o péptidos con marcadores de biotina en aminas primarias (lisina y extremo N), el grupo reactivo más abundante en la superficie de las proteínas, para la detección de estreptavidina. Por ejemplo, las microplacas ELISA recubiertas con estreptavidina pueden recubrirse con proteína de interacción con proteína de unión a poliA biotinilada (PAIP2). En algunas realizaciones, la PAIP2 recombinante humana disponible comercialmente se biotina mediante marcadores de biotina modificados con amina para biotinar específicamente el extremo C utilizando el reticulante de carbodiimida EDC (EDAC).

En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura están marcados o de otro modo modificados para facilitar la unión al sustrato. Por ejemplo, en realizaciones en las que el primer agente de captura es una proteína (por ejemplo, PABP), la proteína puede producirse de forma recombinante y etiquetarse. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las proteínas del primer agente de captura están etiquetadas con glutatión S-transferasa (GST). En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura están etiquetados con FLAG, etiquetados con HA, etiquetados con His o etiquetados con myc.

En ciertas realizaciones, no es necesario utilizar un primer agente de captura. Como se mencionó anteriormente, las realizaciones de la invención incluyen la incorporación de análogos de caperuza biotinilados en muestras de ARNm sintetizados *in vitro* que se van a cuantificar. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 8.344.118, de Kore et al. Las muestras de ARNm protegidos con caperuza biotinilados se pueden unir directamente a sustratos sólidos recubiertos con avidina o estreptavidina.

En algunas realizaciones, un segundo agente de captura se une directamente a un sustrato sólido, que a su vez se une al primer agente de captura. En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es estreptavidina o avidina, que puede unirse a un primer agente de captura biotinilado (por ejemplo, una proteína de unión a poli(A) biotinilada). En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es Proteína A o Proteína G. En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es glutatión. En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es un sustrato recubierto de níquel, por ejemplo, Ni Sefarosa, NTA-agarosa, His60 Ni, resina HisPur o resina TALON. En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es un anticuerpo específico para el primer agente de captura; por ejemplo, un anticuerpo anti-HA o anti-myc.

Se entenderá que la elegancia de los procedimientos descritos en el presente documento reside, en parte, en su adaptabilidad. La presente divulgación contempla todas las configuraciones de las disposiciones descritas anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un ARNm es capturado por su extremo 3' (por ejemplo, mediante hibridación de oligo-dT inmovilizado o proteína de unión a poliA con la cola de poliA), y la presencia de una caperuza se cuantifica mediante la formación de un complejo entre una sustancia de unión específica a caperuza y el ARNm

protegido con caperuza. En otras realizaciones, sin embargo, es posible capturar ARNm protegido con caperuza por su extremo 5'; por ejemplo, mediante la formación de un complejo entre el ARNm protegido con caperuza y una sustancia de unión específica a caperuza inmovilizada sobre un soporte sólido, o si la caperuza está biotinilada mediante la interacción con una placa recubierta de estreptavidina). La presencia de ARNm protegida con caperuza se puede cuantificar a continuación mediante la adición de un primer agente de detección que se une directamente a una cola de poliA expuesta (es decir, una proteína de unión a poliA puede funcionar como un agente de detección en lugar de un agente de captura). La unión del primer agente de captura a la cola de poliA se puede visualizar mediante la adición de un segundo agente de captura que genera una señal detectable (por ejemplo, un anticuerpo anti-PABP conjugado con HRP).

Sustancia de unión específica a caperuza

Una "sustancia de unión específica a caperuza", tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a cualquier sustancia (proteína, molécula pequeña, etc.) que se une selectivamente a caperuzas de ARNm o análogos de caperuza como se describió anteriormente. Es deseable que una sustancia de unión específica a caperuza adecuada para la invención se una específica o selectivamente a una caperuza de ARNm o análogo de caperuza (por ejemplo, los descritos en el presente documento), y que el evento de unión sea detectable.

En algunas realizaciones, una sustancia de unión específica a caperuza es una proteína. En realizaciones particulares, la proteína es el factor de iniciación eucariota 4E ("eIF-4E"). El eIF-4E se ha utilizado en la purificación de ARNm basada en caperuza (véase, por ejemplo, Edery, I. et al., "An efficient strategy to isolate full-length cDNAs based on an mRNA cap retention procedure (CAPture)", MOL. CELL. BIOL., 15: 3363-3371 (1995), y sus propiedades de unión específicas a caperuza son adaptables para su uso en la presente invención.

En algunas realizaciones, una sustancia de unión específica a caperuza es un anticuerpo específico de caperuza que incluye, pero sin limitación, anticuerpos que se unen específicamente a m⁷G, m⁷GpppG, m⁷GpppA, m⁷GpppC; análogos de caperuza no metilados (por ejemplo, GpppG); análogo de caperuza dimetilado (por ejemplo, m^{2,7}GpppG), análogo de caperuza trimetilado (por ejemplo, m^{2,2,7}GpppG), análogos de caperuza simétricos dimetilados (por ejemplo, m⁷Gpppm⁷G) o análogos de caperuza anti-inverso (por ejemplo, ARCA; m^{7,2}OmeGpppG, m^{7,2}dGpppG, m^{7,3}OmeGpppG, m^{7,3}dGpppG y sus derivados de tetrafosfato). Los anticuerpos específicos de caperuza se pueden generar utilizando procedimientos estándar. A continuación se describen en detalle anticuerpos anti-m⁷G de ejemplo.

Se pueden utilizar otra proteína de unión específica a caperuza en realizaciones de la invención. Estas incluyen la subunidad 1 de la proteína de unión a caperuza nuclear, la subunidad 2 de la proteína de unión a caperuza nuclear, el complejo de unión a caperuza nuclear, etc.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión específicas a caperuza se modifican (por ejemplo, se biotinilan o se etiquetan) para facilitar la unión a un soporte sólido. Por ejemplo, los ensayos de unión a caperuza basados en GST-eIF-4E son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, McKracken, S. et al., "5'-capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II", Genes & Dev., 11: 3306-3318 (1997).

Como se mencionó anteriormente, la determinación cuantitativa de la cantidad del complejo entre la sustancia de unión específica a caperuza y el ARNm protegido con caperuza comprende medir una señal detectable asociada con la formación del complejo. En algunas realizaciones, la señal detectable está directamente asociada con la sustancia de unión específica a caperuza. En algunas realizaciones, la señal detectable está indirectamente asociada con la sustancia de unión específica a caperuza a través de un agente secundario que se une a la sustancia de unión específica a caperuza (véase, por ejemplo, la discusión de ELISA a continuación, en donde el agente secundario es un anticuerpo contra la sustancia de unión específica a caperuza). Independientemente de si la señal detectable está directa o indirectamente asociada con la sustancia de unión específica a caperuza, la señal detectable puede ser una señal fluorescente, una señal colorimétrica o una señal radiactiva. En general, la intensidad de la señal es directamente proporcional a la cantidad aproximada de dianas de ARNm protegidos con caperuza en la muestra. Las señales también pueden seleccionarse del grupo que consiste en ficoeritrina, alexa 532, estreptavidina-ficoeritrina y estreptavidina-Alexa 532. En algunas realizaciones, la señal se detecta mediante actividad enzimática (es decir, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), quimioluminiscencia, radiactividad, emisión infrarroja, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o cualquier otro procedimiento conocido por un experto en la materia.

Anticuerpos anti-caperuza m⁷G

En algunas realizaciones, una proteína de unión específica a caperuza es un anticuerpo anti-m⁷G. Los anticuerpos anti-m⁷G son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Los anticuerpos anti-m⁷G para su uso en realizaciones de la invención incluyen aquellos descritos en Meredith, R.D. y Erlanger, B.F., "Isolation and characterization of rabbit anti-m⁷G-5'P antibodies of high apparent affinity", NUCLEIC ACIDS RES., 6: 2179-2191 (1979). En realizaciones particulares, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-caperuza m⁷G (por ejemplo, disponible comercialmente en Synaptic Systems).

Los anticuerpos adicionales contra la caperuza m⁷G y análogos de caperuza se incluyen dentro del alcance de la presente invención y se pueden generar mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Como se utiliza en el presente documento, los anticuerpos anti-m⁷G incluyen cualquier anticuerpo o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a cualquier epítipo de las caperuzas m⁷G del ARNm. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpos" pretende incluir inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas que son específicamente reactivas a la proteína o péptido designado, o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de dominio único de tiburón (por ejemplo, IgNARo fragmentos de los mismos)) y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad biológica deseada. Los anticuerpos adecuados también incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de ratón, anticuerpos de cabra, anticuerpos de conejo, anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos conjugados (es decir, anticuerpos conjugados o fusionados a otras proteínas, radiomarcadores, citotoxinas) y fragmentos de anticuerpos.

Como se utiliza en el presente documento, un "fragmento de anticuerpo" incluye una parte de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región variable o de unión al antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; triacuerpos; tetracuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética o genéticamente modificada que actúa como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados, fragmentos "Fv", que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas de cadena única recombinantes en las que las regiones variables de cadena ligera y pesada están conectadas por un enlazador peptídico ("proteínas ScFv"), y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable.

Los anticuerpos anti-m⁷G se pueden generar utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los protocolos para la producción de anticuerpos se describen en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988). Típicamente, los anticuerpos se pueden generar en ratones, ratas, cobayas, hámsteres, camellos, llamas, tiburones u otros huéspedes apropiados. Alternativamente, los anticuerpos se pueden generar en pollos, produciendo moléculas de IgY (Schade et al., *ALTEX* 13(5):80-85 (1996)). En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados para la presente invención son anticuerpos de primates subhumanos. Por ejemplo, se pueden encontrar técnicas generales para generar anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos, por ejemplo, en Goldenberg et al., publicación de patente internacional n.º WO 91/11465 (1991)), y en Losman et al., *INT. J. CANCER*, 46: 310 (1990)). En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma (Milstein y Cuello, *NATURE*, 305: 537-40 (1983))). En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales también pueden elaborarse mediante procedimientos recombinantes (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. N.º 4.166.452).

Muchas de las dificultades asociadas con la generación de anticuerpos monoclonales por inmortalización de células B pueden superarse mediante la ingeniería y expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*, utilizando expresión en fagos. Para asegurar la recuperación de anticuerpos monoclonales de alta afinidad, una biblioteca combinatoria de inmunoglobulinas debe contener típicamente un tamaño de repertorio grande. Una estrategia típica utiliza ARNm obtenido de linfocitos o células del bazo de ratones inmunizados para sintetizar ADNc utilizando transcriptasa inversa. Los genes de cadena pesada y ligera se amplifican por separado mediante PCR y se ligan en vectores de clonación de fagos. Se producen dos bibliotecas diferentes, una que contiene los genes de cadena pesada y otra que contiene los genes de cadena ligera. El ADN de fago se aísla de cada biblioteca, y las secuencias de cadena pesada y ligera se ligan juntas y se empaquetan para formar una biblioteca combinatoria. Cada fago contiene un par aleatorio de ADNc de cadena pesada y ligera y, tras la infección de *E. coli* dirige la expresión de las cadenas de anticuerpos en las células infectadas. Para identificar un anticuerpo que reconoce el antígeno de interés, se coloca la biblioteca de fagos en placas y las moléculas de anticuerpo presentes en las placas se transfieren a filtros. Los filtros se incuban con antígeno marcado radiactivamente y a continuación se lavan para eliminar el exceso de ligando no unido. Un punto radiactivo en el autorradiograma identifica una placa que contiene un anticuerpo que se une al antígeno. Los vectores de clonación y expresión que son útiles para producir una biblioteca de fagos de inmunoglobulina humana se pueden obtener, por ejemplo, de STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, California).

Se puede emplear una estrategia similar para obtener scFv de alta afinidad. Véase, por ejemplo, Vaughn et al., *NATURE BIOTECH.*, 14: 309-314 (1996)). Se puede construir una biblioteca scFv con un gran repertorio aislando genes V de donantes humanos no inmunizados utilizando cebadores de PCR correspondientes a todas las familias de genes de V_H, V_K y V_L conocidas. Después de la amplificación, los grupos V_K y V_L se combinan para formar un grupo. Estos fragmentos se ligan en un vector fagémido. El enlazador scFv, (Gly₄, Ser)₃ se liga a continuación en el fagémido en dirección 5' del fragmento V_L. Los fragmentos de V_H y enlazador-V_L se amplifican y ensamblan en la región JH. Los fragmentos de V_H-enlazador-V_L resultantes se ligan en un vector fagémido. La biblioteca de fagémidos se puede seleccionar utilizando filtros, como se describió anteriormente, o utilizando inmunotubos (Nunc; Maxisorp). Se pueden lograr resultados similares construyendo una biblioteca combinatoria de inmunoglobulinas a partir de linfocitos o células del bazo de conejos inmunizados y expresando las construcciones scFv en *P. pastoris*. Véase, por ejemplo, Ridder et al., *BIOTECHNOLOGY*, 13: 255-260 (1995). Además, tras el aislamiento de un scFv apropiado, se pueden

obtener fragmentos de anticuerpos con mayores afinidades de unión y tasas de disociación más lentas mediante procesos de maduración de la afinidad, tales como la mutagénesis de CDR3 y la redistribución de cadenas. Véase, por ejemplo, Jackson et al., BR. J. CANCER, 78: 181-188 (1998); Osbourn et al., IMMUNOTECHNOLOGY, 2: 181-196 (1996).

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica un CDR único. Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") se pueden obtener mediante la construcción de genes que codifican el CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick et al., METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY 2:106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), páginas 166-179 (Cambridge University Press 1995); y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, BirCHet al., (eds.), páginas 137-185 (Wiley-Liss, Inc. 1995).

En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados para la invención pueden incluir anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos son Ig quiméricas, cadenas o fragmentos de Ig (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de Abs) que contienen una secuencia mínima derivada de Ig no humana. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "de importación", que normalmente se toman de un dominio variable "de importación". La humanización se logra sustituyendo regiones determinantes de complementariedad (CDR) o secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Riechmann et al., NATURE, 332:323-7 (1988); Verhoeven et al., SCIENCE, 239:1534-6, (1988)). Dichos anticuerpos "humanizados" son Abs quiméricos (Patente de EE.UU. No. 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en Abs de roedores. Los anticuerpos humanizados incluyen Igs humanas (anticuerpo receptor) en los que los residuos de una CDR del receptor son reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos no humanos correspondientes reemplazan los residuos del marco ("framework") Fv de la Ig humana. Los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de marco o CDR importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que la mayoría, si no todas, las regiones CDR corresponden a las de una Ig no humana y la mayoría, si no todas, las regiones FR son las de una secuencia de consenso de Ig humana.

El uso de anticuerpos anti-m⁷G de alta afinidad es importante para la especificidad cuantitativa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-m⁷G o un fragmento del mismo adecuado para la presente invención tiene una afinidad de unión de o mayor que aproximadamente 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM, 10 pM, 1 pM, 500 fM, 400 fM, 300 fM, 200 fM, 100 fM, 50 fM, 10 fM, 1 fM. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-m⁷G o un fragmento del mismo adecuado para la presente invención tiene una afinidad de unión que varía entre aproximadamente 500 nM y 1 fM, entre 500 nM y 10 fM, entre 500 nM y 100 fM, entre 500 nM y 1 pM, entre 10 nM y 1 fM, entre 10 nM y 100 fM, entre 10 nM y 1 pM, entre 1 nM y 1 fM, entre 1 nM y 100 fM, entre 1 nM y 500 fM, entre 1 nM y 1 pM, entre 1 nM y 10 pM, entre 1 nM y 50 pM, entre 1 nM y 100 pM, entre 1 nM y 500 pM.

Cuantificación de la caperuza del ARNm basada en ELISA

Algunas realizaciones de la invención implican un procedimiento inventivo para la cuantificación de la eficiencia de la protección con caperuza durante la síntesis de ARN mensajero (ARNm) que comprende un ensayo basado en ELISA que utiliza un primer agente de captura (por ejemplo, un oligo poli-dT marcado con biotina) unido a un sustrato sólido (por ejemplo, una placa de 96 pocillos recubierta de estreptavidina o de 384 pocillos u otro). El primer agente de captura se utiliza para unir ARNm sintetizado in vitro. Una vez unido, una sustancia de unión específica a caperuza se dirige al resto de caperuza m⁷G como su antígeno. En algunas realizaciones basadas en ELISA, la sustancia de unión específica a caperuza primaria es un anticuerpo anti-m⁷G (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-m⁷G). Se utiliza un anticuerpo marcado secundario para visualización/cuantificación (véase la Figura 1). En algunas realizaciones, la sustancia de unión específica a caperuza es otra proteína específica de caperuza (por ejemplo, eIF-4E), y el anticuerpo secundario es específico de la proteína específica de la caperuza. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es o proporciona un agente de detección; por ejemplo, posee actividad enzimática para generar un sustrato detectable. Se puede sustituir y aplicar una variedad de agentes cromóforos/fluorescentes. Se puede utilizar una caperuza biotinilada sintetizada a medida (m⁷GpppG-Biotina) como control positivo. Esto representa un nuevo procedimiento para la cuantificación directa del resto de protección con caperuza en una construcción de ARNm recién sintetizada que es crucial para la caracterización adecuada. Los protocolos para ensayos ELISA y optimización de condiciones son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Thermo Scientific, "Elisa technical guide and protocols", TECH TIP N.º 65 (2010)) (*disponible en www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdf*).

Por lo tanto, en realizaciones basadas en ELISA de la invención, el agente secundario es un anticuerpo específico para la sustancia de unión selectiva a caperuza. En algunas realizaciones, el agente secundario está marcado de forma radiactiva o fluorescente. En realizaciones preferidas, el agente secundario comprende una enzima que convierte un sustrato en un producto detectable. En algunas realizaciones, la enzima es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. El producto puede ser cromogénico, quimiofluorescente o quimioluminiscente. En realizaciones particulares, el sustrato se selecciona entre los grupos que consisten en sal disódica de fosfato de *p*-nitrofenilo (PNPP), sal de diamonio de 2,2'-azinobis[ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico] (ABTS), diclorhidrato de *o*-fenilendiamina (OPD) o 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). En realizaciones particulares, el producto es cromogénico y absorbe luz a 370-652 nanómetros. Como se describió anteriormente, la intensidad de la señal es proporcional a la cantidad aproximada de dianas de ARN protegidos con caperuzón en el sustrato.

Se pueden utilizar controles para cuantificar la cantidad de ARNm protegido con caperuza. En algunas realizaciones, el control comprende una muestra de ARNm con una cantidad predeterminada de ARNm protegido con caperuza. En algunas realizaciones, el control comprende una cantidad predeterminada de caperuza sintetizada. En algunas realizaciones, se utiliza una caperuza biotinilada personalizada sintetizada (m⁷GpppG-Biotina) como control positivo.

En algunas realizaciones, los ensayos se hacen cuantitativos estableciendo una curva de calibración mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. En otras palabras, el grado de la reacción inmunológica se puede determinar de forma cualitativa o semicuantitativa mediante una comparación visual de la densidad óptica de muestras desconocidas con patrones conocidos o de forma cuantitativa mediante una comparación espectrofotométrica con curvas estándar preparadas utilizando una serie de muestras de concentración de caperuza conocida. Por ejemplo, la cuantificación se puede realizar creando un conjunto de patrones o calibradores de caperuza m⁷G que retienen el epítopo del anticuerpo primario y se pueden unir mediante un sustrato sólido. Estos patrones o calibradores se pueden diluir en serie, y el valor de señal resultante de cada concentración de patrón o calibrador probada se utiliza para generar una curva estándar; representando la concentración de patrones o calibradores protegidos con caperuza frente a los valores de señal resultantes. Una vez que se establece una curva cuantitativa estándar, se utiliza un ensayo para determinar los niveles de ARNm protegidos con caperuza en una muestra trazando la señal resultante en la curva estándar.

Kits

La presente invención proporciona además kits que comprenden diversos reactivos y materiales útiles para llevar a cabo los procedimientos inventivos de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos cuantitativos descritos en el presente documento pueden ser realizados por laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o laboratorios comerciales. La invención proporciona kits que pueden utilizarse en estos diferentes entornos.

Por ejemplo, los materiales y reactivos para cuantificar la eficiencia de la protección con caperuza del ARNm en una muestra de ARNm proporcionando una sustancia de unión específica a caperuza de acuerdo con los procedimientos de la invención se pueden reunir en un kit. En ciertas realizaciones, un kit de la invención comprende al menos uno o más reactivos que forman específicamente un complejo con una caperuza de ARNm, opcionalmente agentes para detectar la formación del complejo e instrucciones para utilizar el kit de acuerdo con un procedimiento de la invención.

Cada kit puede comprender preferiblemente el reactivo que hace que el procedimiento sea específico. Por lo tanto, para detectar/cuantificar la eficiencia de la protección con caperuza del ARNm, el reactivo que forma específicamente un complejo con la caperuza puede ser un anticuerpo. Los kits también pueden comprender agentes de detección o secundarios (por ejemplo, anticuerpos conjugados con HRP) que detectan la formación del complejo. Los kits también pueden comprender sustratos sólidos, opcionalmente conjugados con un segundo agente de captura para el aislamiento del ARNm (por ejemplo, placas de 96 pocillos biotiniladas). Los kits también pueden comprender primeros agentes de captura, por ejemplo, proteínas u oligonucleótidos que interactúan específicamente con el ARNm.

Los kits u otros artículos de fabricación según la invención pueden incluir uno o más recipientes para contener diversos reactivos. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas (por ejemplo, jeringas precargadas), ampollas. El recipiente puede estar formado a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico.

En algunas realizaciones, los kits de la presente invención pueden incluir niveles de control adecuados o muestras de control para determinar los niveles de control como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los kits de la invención pueden incluir instrucciones para usar el kit de acuerdo con uno o más procedimientos de la invención y pueden comprender instrucciones para la transcripción y la protección con caperuza *in vitro*.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis de ARNm

Se sintetizaron ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) y eritropoyetina humana (EPO) mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica cada gen respectivo. La transcripción *in vitro* incluyó la adición

de una estructura de caperuza 5', Caperuza 1, que tiene un residuo 2'-O-metilo en el grupo OH 2' del anillo de ribosa de la base 1, mediante conjugación enzimática de GTP a través de la guanilil transferasa. Se incorporó una cola de poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud (según se determinó mediante electroforesis en gel) mediante la adición de ATP junto con la poli A polimerasa (consulte las condiciones de reacción detalladas a continuación). El producto de transcripción *in vitro* incluyó regiones no traducidas 5' y 3', que se representan como X e Y, respectivamente, en las secuencias a continuación:

ARNm de eritropoyetina humana (EPO) (SEQ ID NO: 1)

X₁AUGGGGGGUGCACGAAUGUCCUGCCUGGCCUGUGGCCUUCUCCUGUCCCU
GCUGUCGCUCCCUUCUGGGCCUCCAGUCCUGGGCGCCCCACCAACGCCUCA
UCUGUGACAGCCGAGUCCUGGAGAGGUACCUCUUGGAGGCCAAGGAGGC
CGAGAAUAUCACGACGGGCUGUGCUGAACACUGCAGCUUGAAUGAGAAU
AUCACUGUCCAGACACCAAAGUUAUUUCUAUGCCUGGAAGAGGAUGG
AGGUCGGGCAGCAGGCCCGUAGAAGUCUGGCAGGGCCUGGCCCUGCUGUC
GGAAGCUGUCCUGCGGGGCCAGGCCCUUGUUGGUCAACUCUCCCCAGCCG
UGGGAGCCCCUGCAGCUGCAUGUGGAUAAAGCCGUCAGUGGCCUUCGCA
GCCUCACCACUCUGCUUCGGGCUCUGGGAGCCCAGAAGGAAGCCAUCUC
CCCUCAGAUGCCGCCUCAGCUGCUCCACUCCGAACAAUCACUGCUGAC
ACUUCGCCAAACUCUCCCGAGUCUACUCCAAUUUCCUCCGGGGAAAGC
UGAAGCUGUACACAGGGGGAGGCCUGCAGGACAGGGGACAGAUGAY₁

ARNm de la luciferasa de luciérnaga (FFL) optimizada por codones (SEQ ID NO: 2)

X₂AUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCCCAGCGCCAUUCUACCC
 ACUCGAAGACGGGACCGCCGCGGAGCAGCUGCACAAGCCAUGAAGCGC
 UACGCCCUGGUGCCCGGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUAUCGAGG
 UGGACAUAACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGA
 AGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGC
 AGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUCUUGCCCCGUGUUGGGUGCCCCUGUUC
 UCGGUGUGGCUGUGGGCCCCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCU
 GCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCACCGUCGUAUUCGUGAGCAAG
 AAAGGGCUGCAAAAGAUCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGAUCAUAC
 AAAAGAUAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAG
 CAUGUACACCUUCGUGACUUCCEAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUAC
 GACUUCGUGCCCCGAGAGCUUCGACCGGGACAAAACCAUCGCCUGAUCA
 UGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGCA
 CCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCCGCGACCCCAUCUUCGGC
 AACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGUGGUGCCAUAUACCC
 ACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCG
 GGUCGUGCUAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUG
 CAAGACUAUAAGAUAUCAAUCUGCCCUGCUGGUGCCCAACUAUUUAGCU
 UCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA
 CGAGAUCCGCGAGCGGCGGGGCGCCGCUAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCC
 GUGGCCAAACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGA
 CAGAAACAACCAGCGCCAUCUUGAUCACCCCCGAAGGGGACGACAAGCC
 UGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCCUAAGGUGGUGGAC
 UUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCG
 UCCGUGGCCCCAUGAUAUGAGCGGCUACGUUAACAACCCCGAGGCUAC
 AAACGCUUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCC
 UACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCGUGGACCGGCUGAAGAGCC
 UGAUCAAUAACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGCAU
 CCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGUGCGCCGGCCUGCCCG
 ACGACGAUGCCGGCGAGCUGCCCCGCCGAGUCGUCGUGCUGGAACACGG
 UAAAACCAUGACCGAGAAGGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUU
 ACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGC
 CUAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCGCAAGAUCGCGAGAUUCU
 CAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAY₂

Las secuencias UTR 5' y 3' para X1/Y1 y X2/Y2 fueron las siguientes:

X₁ =

GGACAGAUCCGUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
 GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCGGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUCCCCG
 5 UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ ID NO: 3)

X₂ = GGAUCCUACC (SEQ ID NO: 4)

Y₁ =

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGCCA
 CUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 5)

Y₂ = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 6)

La síntesis de ARNm se llevó a cabo en condiciones completamente libres de ARNasa. Todos los tubos, viales, puntas de pipeta, pipetas, tampones, etc. debían estar libres de nucleasas. El ARN mensajero se sintetizó a partir de una plantilla de ADN linealizado. Para producir la construcción de precursor de ARNm (IVT) deseada, se preparó una mezcla de ~100 µg de ADN linealizado, rNTP (3,33 mM), DTT (10 mM), ARN polimerasa T7, inhibidor de ARNasa, pirofosfatasa y tampón de reacción (10x, 800 mM de Hepes (pH 8,0), 20 mM de espermidina, 250 mM de MgCl₂, pH 7,7) con agua libre de ARNasa hasta un volumen final de 2,24 ml. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante entre 20 y 120 minutos. Una vez finalizado, la mezcla se trató con aDNasa I durante 15 minutos más y se detuvo en consecuencia.

El producto de ARNm purificado de la etapa de IVT mencionada anteriormente se desnaturalizó a 65 °C durante 10 minutos. Por separado, se mezclaron partes de GTP (20 mM), S-adenosil metionina, inhibidor de ARNasa, 2'-O-metiltransferasa y guanilil transferasa con tampón de reacción (10x, 500 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 60 mM de KCl, 12,5 mM de MgCl₂) hasta una concentración final de 8,3 ml. Tras la desnaturalización, el ARNm se enfrió en hielo y a continuación se añadió a la mezcla de reacción. La solución combinada se incubó a 37 °C durante 20-90 minutos. Al finalizar, se añadieron alícuotas de ATP (20 mM), PolyA polimerasa y tampón de reacción de cola (10x, 500 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2,5 M de NaCl, 100 mM de MgCl₂) y la mezcla de reacción total se incubó adicionalmente a 37 °C durante aproximadamente 20-45 minutos. Al finalizar, la mezcla de reacción final se detuvo y se purificó en consecuencia.

Ejemplo 2: Cuantificación de la eficiencia de la protección con caperuza utilizando el procedimiento ELISA de captura de oligo-dT basado en biotina-estreptavidina

Este ejemplo ilustra un procedimiento ELISA de ejemplo para cuantificar la eficiencia de protección con caperuza. Una realización de ejemplo se representa en la Figura 1. Una microplaca de estreptavidina disponible comercialmente se lavó 3 veces con tampón de lavado (0,05 % Tween 20, 0,01 M PBS pH 7,2) y se secó. Se añadió 5' biotina Oligo dT20 disponible comercialmente a 1-5 pmol/pocillo en un volumen final de 100 µl y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante una hora. La placa se lavó tres veces con tampón de lavado y se bloqueó durante 1 hora con 320 µl de tampón de bloqueo (0,01 M PBS, 0,5 % BSA, 0,15 % Tween 20).

Las muestras de ARN mensajero se desnaturalizaron durante 10 minutos a 94 °C y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µl de tampón de hibridación (4xSSC, 20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 0,15 % Tween 20) a cada pocillo que contenía 20 pmol -1 µmol de ARNm y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con tampón de lavado que contenía EDTA 2 mM.

Se aplicó un anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal de ratón anti-caperuza m⁷G (dilución 1:2000-1:25000 en alícuotas de 100 µl) a cada pocillo de la placa y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. La placa se lavó tres veces con un tampón de lavado que contenía EDTA 2 mM. Después del lavado, se añadieron 100 µl de un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1:40.000), a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con un tampón de lavado que contenía EDTA 2 mM.

Para detectar la interacción de los anticuerpos primarios y secundarios, se preparó una solución de sustrato cromogénico de TMB (3,3',5,5'- tetrametilbencidina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se añadió a cada pocillo en alícuotas de 100 µl y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 100 µL de H₂SO₄ 2N.

El TMB produjo un color azul reconocible al detectar HRP. Después de la adición de H₂SO₄, el color cambió a amarillo con una absorbancia máxima a 450 nm, que se leyó utilizando un lector de placas Molecular Devices.

Se encontró que un pocillo con absorbancia a 450 nm indicó la presencia de un ARNm protegido con caperuza. La medición cuantitativa del ARNm protegido con caperuza por muestra se determina a partir de los valores de absorbancia promedio de la muestra seguido de la interpolación de una curva estándar (que representa gráficamente la concentración frente a la absorbancia) generada a partir de controles positivos diluidos en serie de la molécula pequeña de caperuza m⁷G conjugada con biotina unida a placas recubiertas con estreptavidina y detectada por el anticuerpo monoclonal de ratón para la caperuza m⁷G (Synaptic Systems).

Ejemplo 3: Cuantificación de la eficiencia de la protección con caperuza mediante ELISA de captura basado en proteína de unión a poliA

Este ejemplo ilustra otro procedimiento ELISA de ejemplo que utiliza placas ELISA recubiertas con proteína de unión a poliA. Específicamente, una placa ELISA se recubre con proteína de unión a poliA ("PABP") a 1 µg/ml utilizando un tampón de recubrimiento (50 mM NaHCO₃, pH 9,6). Posteriormente, la placa se lava y se bloquea con tampón de bloqueo (1xPBS, 0,05 % Tween 20, 2 % BSA) y se incuba durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, la placa se lava tres veces con tampón de lavado (1xPBS, 0,05 % Tween 20).

Las muestras de ARNm se desnaturalizan durante 10 minutos a 94 °C y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, las muestras se diluyen hasta una concentración de aproximadamente (20 pmol-1 µmol)

en tampón de hibridación (4xSSC, 20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 0,15 % Tween 20) que contiene ARN. Se añaden aproximadamente 100 µl a cada pocillo y se incuban durante una hora a temperatura ambiente.

Se aplica un anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal de ratón anti-caperuza m⁷G (dilución 1:2000-1:25000 en alícuotas de 100 µl) a cada pocillo de la placa y se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. La placa se lava tres veces con un tampón de lavado que contiene EDTA 2 mM seguido de la adición de anticuerpo secundario conjugado con HRP de cabra anti-Fc de IgG de ratón (Pierce 31439) a una dilución 1:40 000 e incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 3 veces con tampón de lavado, se prepara TMB y se añade como se indicó anteriormente. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se detiene la reacción añadiendo H₂SO₄ 2N y se lee la placa a 450 nm como se indicó anteriormente.

En realizaciones alternativas, se utilizan microplacas disponibles comercialmente que se han recubierto previamente con un anticuerpo específico para PAIP2. Se añaden 100 µl de PAIP2 recombinante humano disponible comercialmente (Cusabio®) a 0,1 µg/ml - 10 µg/ml por pocillo utilizando un tampón de recubrimiento (50 mM NaHCO₃, pH 9,6), seguido de una incubación de una hora a temperatura ambiente. El PAIP2 recombinante humano presente se une al anticuerpo inmovilizado. Después de eliminar cualquier sustancia no unida, se añaden muestras de ARNm a los pocillos como se indicó anteriormente para cuantificar la eficiencia de la protección con caperuza. Se aplica un anticuerpo primario, anti-caperuza m⁷G monoclonal de ratón (dilución 1:2000-1:25000 en alícuotas de 100 µl) a cada pocillo de la placa y se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. La placa se lava tres veces con tampón de lavado que contiene 2 mM de EDTA. Después del lavado, se añaden 100 µl de un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1:40.000), a cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lava tres veces y a continuación se añade la solución de sustrato cromogénico TMB. Se detiene el revelado del color, se mide la intensidad del color y se cuantifica la cantidad de ARNm protegido con caperuza utilizando una curva estándar como se indicó anteriormente.

Ejemplo 4: Evaluación de la protección con caperuza en 5' del ARNm en la producción de proteínas *in vivo*

En este ejemplo, se evaluó el impacto de la protección con caperuza en 5' del ARNm en la producción de proteínas *in vivo* y su impacto potencial en la eficacia de la terapia basada en ARNm. Específicamente, se evaluó el impacto de la protección con caperuza en 5' en la producción *in vivo* de alfa-galactosidasa A (alfa-Gal A), que es deficiente en la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Fabry es una enfermedad de almacenamiento lisosomal hereditaria ligada al cromosoma X que se caracteriza por un deterioro renal grave, angioqueratomas y anomalías cardiovasculares, incluyendo agrandamiento ventricular e insuficiencia de la válvula mitral. La enfermedad de Fabry también afecta el sistema nervioso periférico, causando episodios de dolor agonizante y ardiente en las extremidades. La enfermedad de Fabry es causada por una deficiencia en la enzima alfa-galactosidasa A (alfa-Gal A). La alfa-Gal A es la glicohidrolasa lisosomal que escinde los restos terminales de alfa-galactosilo de varios glicoconjugados. La enfermedad de Fabry produce un bloqueo del catabolismo del glicoesfingolípido neutro, ceramida trihexósido (CTH), y la acumulación de este sustrato enzimático dentro de las células y en el torrente sanguíneo.

Se han aislado y secuenciado el ADNc y el gen que codifica la alfa-Gal A humana, GLA. La alfa-Gal A humana se expresa como un polipéptido de 429 aminoácidos, de los cuales los 31 aminoácidos N-terminales son el péptido señal. La enzima humana se ha expresado en células de ovario de hámster chino (CHO) (Desnick et al., Patente No. US 5,356,804; Ioannou et al., J. CELL BIOL. 119: 1137 (1992))) y células de insectos (Calhoun et al., WO 90/11353).

Las personas que padecen la enfermedad de Fabry pueden ser tratadas mediante terapia de reemplazo enzimático con alfa-Gal A humana (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. N.º 6.458.574). Enfoques adicionales que modulen o complementen la expresión de la deficiencia de alfa-Gal A, y por lo tanto mejoren la deficiencia subyacente, serían útiles en el desarrollo de terapias apropiadas para trastornos asociados. Dichos enfoques incluyen procedimientos de administración intracelular de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm de GLA) que son capaces de corregir defectos genéticos existentes y/o proporcionar funciones beneficiosas a una o más células diana. Después de la administración exitosa a los tejidos y células diana, las composiciones y los ácidos nucleicos transfectan la célula diana, y los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm de GLA) se pueden traducir en el producto génico de interés (por ejemplo, alfa-GAL A) o pueden de otro modo modular/regular la presencia o expresión del producto génico de interés. Dichos procedimientos se han descrito previamente; véase, por ejemplo, publicación previa a la concesión en EE. UU. 2011/0244026.

En este ejemplo, se evaluó el impacto de la protección con caperuza en 5' en la producción de proteínas *in vivo*. El ARNm de GLA humano se sintetizó mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica el gen, a lo que siguió la adición de una estructura de caperuza en 5', ya sea Caperuza O o Caperuza 1 (Fechter, P. et al., J. GEN. VIROLOGY, 86: 1239-1249 (2005)). También se añadió una cola de poli(A) en 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, determinada mediante electroforesis en gel. Las regiones 5' y 3' no traducidas presentes en el ARNm de GLA se representan como X e Y en la SEQ ID NO: 7, tal como se indica a continuación:

ARNm de alfa-galactosidasa (GLA) (SEQ ID NO: 7):

X₂AUGCAGCUGAGGAACCCAGAACUACAUCUGGGCUGCGCGCUUGCGCUUCGCUUC
 CUGGCCCUCGUUCCUGGGACAUCCUGGGGCUAGAGCACUGGACAAUGGAUUGG
 CAAGGACGCCUACCAUGGGCUGGCUGCACUGGGAGCGCUUCAUGUGCAACCUUGA
 CUGCCAGGAAGAGCCAGAUUCCUGCAUCAGUGAGAAGCUCUUCAUGGAGAUGGCA
 GAGCUC AUGGUCUCAGAAGGCUGGAAGGAUUGCAGGUUAUGAGUACCUCUGCAUUG
 AUGACUGUUGGAUGGCUCUCCCAAAGAGAUUCAGAAGGCAGACUUCAGGCAGACCC
 UCAGCGCUUCCUCAUGGGAUUCCGCCAGCUAGCUAAUUAUGUUCACAGCAAAGGA
 CUGAAGCUAGGGAUUUAUGCAGAUUGUUGGAAAUA AAAACCUGCGCAGGCUUCCCCUG
 GGAGUUUUGGAUACUACGACAUUGAUGCCCAGACCUUUGCUGACUGGGGAGUAGA
 UCUGCUAAAAUUUGAUGGUUGUUAUCUGUGACAGUUUGGAAAAUUUGGCAGAUUGG
 UUAUAAGCACAUUGUCCUUGGCCUGAAUAGGACUGGCAGAAAGCAUUGUGUACUCC
 UGUGAGUGGCCUCUUUAUAUGUGGCCCUUUCAAAAGCCCCAAUUAUACAGAAAUCC
 GACAGUACUGCAAUCACUGGCCGAAAUUUUGCUGACAUUGAUGAUUCCUGGAAAAG
 UAUAAAGAGUAUCUUGGACUGGACAUCUUUUAACCAGGAGAGAAUUGUUGAUGU
 UGCUGGACCAGGGGGUUGGAAUGACCCAGAU AUGUUAUGAUUGGCAACUUUGG
 CCUCAGCUGGAAUCAGCAAGUAACUCAGAUGGCCCUUCUGGGCUAUC AUGGCUGCU
 CCUUUAUUC AUGUCUAAUGACCUC CGACACAUCAGCCCUC AAGCCAAAGCUCUCC
 UUCAGGAUAAGGACGUAAUUGCCAUC AAUCAGGACCCCUUGGGCAAGCAAGGGUA
 CCAGCUUAGACAGGGAGACAACUUUGAAGUGUGGGAACGACCUCUCUCAGGCUUA
 GCCUGGGCUGUAGCUAUGAUAAACCGGCAGGAGAUUGGUGGACCUCGCUCUUAUA
 CCAUCGCAGUUGCUUCCCUUGGGUAAAGGAGUGGCCUGUAAUCCUGCCUGCUUCAU
 CACACAGCUCCUCCCUUGUGAAAAGGAAGCUAGGGUUCUAUGAAUGGACUUCAAGG
 UUAAGAAGUCACAUA AAUCCACAGGCACUGUUUUGCUUCAGCUAGAAAAUACAA
 UGCAGAUUGUCAUUA AAAAGACUUA CUUUAAY₂

5 X = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 4)

Y = UUUGAAU (SEQ ID NO:6)

10 En algunas realizaciones también se utiliza una alfa-galactosidasa optimizada por codones con inserto de poliA (CO-GLA-PoliA) (SEQ ID NO: 8):

XI AUGCAGCUGAGGAACCCAGAGCUCCAUUCUGGAUGUGCACUGGCACUUAAGAUU
 UCUCGCGCUUGUGUCGUGGGACAUCCCCGGAGCCAGGGCGCUGGAUAAUGGGCUC
 GCCCGGACUCCCACAAUGGGUUGGCUGCACUGGGAGCGCUUUAUGUGCAAUCUGG
 ACUGCCAGGAAGAGCCCGAUAGCUGUAUUUCGGAGAAGCUCUUAUGGAAAUGGC
 GGAGUUGAUGGUGUCCGAAGGGUGGAAGGAUGCGGGGAUAUGAGUAUCUGUGUAU
 CGAUGACUGCUGGAUGGCACCGCAGCGAGAUAUCGGAGGGGGCGAUUGCAGGCCGAC
 CCUCAGCGCUUCCCUCAUGGAAUUCGGCAGCUGGCCAACUACGUACACUCAAAG
 GACUUAAGUUGGGGAUCUACGCGGACGUCGGUAAUAAGACAUGCGCUGGGUCCCC
 GGGGAGCUUCGGAUACUAUGAUUAUUGAUGCCCAGACCUUCGCGGACUGGGGAGUG
 GACUUGCUUAAGUUUGAUGGUUGUACUGUGACUCAUUGGAAAACUUGGCGGAU
 GGGUAUAAACAUAUGUCCUUGGCCUUGAAUCGGACAGGGCGGUUGCAUCGUCUACA
 GCUGCGAAUGGCCUUGUAUAUGUGGGCCGUUCCAGAAACCCAAACUACACCGAAAU
 UCGCCAGUAUUGCAAUCACUGGAGAAACUUCGCCCGAUUUCGACGAUUCGUGGAAA
 UCAAUCAAGUCCAUCUUGACUGGACGUCCUUAACCAAGAGAGAAUCGUAGAUG
 UGGCCGGACCGGGAGGAUGGAACGACCCUGAUUUGCUUGUAAUUGGCAACUUGG
 ACUCUCGUGGAACCAAGCAAGUAACGCAAAUGGCACUCUGGGCUAUAUGGCUGCG
 CCCCUGUUAUGUCAAAACGACCUCAGGCACAUCUCGCCCGCAGGCCGAAAGCCUUGC
 UUCAAGAUAAAGGACGUCAUCCCGAUUAAUCAGGACCCCGCUGGGGAAGCAGGGCUA
 UCAGCUUAGACAGGGCGACAAUUUUGAGGUCUGGGAGCGACCCCUAGCGGACUC
 GCAUGGGCGGUGGCAUGAUCAAUAGGCAGGAAAUUGGUGGGCCGAGGUCGUAC
 ACUAUCGCCGUCGCGUCGUUGGGAAAGGGUGUGGCGUGUAAUCCAGCGUGCUUUA
 UCACCCAACUGCUGCCCGUCAAGCGCAAACUGGGUUUUUACGAAUGGACGAGCAG
 ACUUCGCUCACACAUUAACCCAACGGGUACGGUGUUGCUCCAGCUCGAGAAUACA
 AUGCAAAUGUCACUUAAGAUUUGCUCUGACGGGUGGCAUCCCUUGUGACCCCUCC
 CCAGUGCCUUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCU
 AAUAAAAUUAAGUUGCAUAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

El ARNm de GLA se almacenó en agua a una concentración final de 1 mg/ml a -80 °C hasta el momento de su uso.

5 Todas las concentraciones de ARNm se determinaron mediante absorción ($y_{\max}$ 260 nm).

Las formulaciones adecuadas para la administración *in vivo* de ARNm con Caperuza O de GLA, ARNm con Caperuza
 1 de GLA, ARNm de GLA y otros controles incluyen una mezcla lipídica multicomponente de proporciones variables
 que emplea uno o más lípidos catiónicos, lípidos auxiliares y lípidos PEGilados. Los lípidos catiónicos pueden incluir
 10 (pero no exclusivamente) DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano),
 DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan,
 I., "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. CONTR. REL., 107: 276-
 287 (2005)), DLin-KC2-DMA (Semple, SC et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery", NATURE
 BIOTECH., 28: 172-176 (2010), C12-200 (Love, KT et al. "Lipid-like materials for low-dose *in vivo* gene silencing",
 15 PROC NATL ACAD SCI. USA, 107: 1864-1869 (2010))), HGT4003, ICE, a base de dialquilamino, a base de imidazol,
 a base de guanidinio, etc. Los lípidos auxiliares pueden incluir (pero no exclusivamente) DSPC (1,2-distearoil-sn-
 glicero-3-fosfolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-
 fosfoetanolamina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-
 fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)), colesterol, etc. Los lípidos PEGilados pueden
 20 incluir (pero no exclusivamente) una cadena de poli(etilenglicol) de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a
 un lípido con cadena(s) alquílica(s) de longitud C6-C20. La encapsulación lipídica del ARNm se calculó realizando el
 ensayo Ribogreen con y sin la presencia de 0,1 % de Triton-X 100. Los tamaños de partícula (dispersión dinámica de
 luz (DLS)) y los potenciales zeta se determinaron utilizando un instrumento Malvern Zetasizer en soluciones de PBS
 1x y KCl 1 mM, respectivamente.

Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de C12-200, DOPE, Chol y DMG-PEG2K y se diluyeron
 con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (10 mM de
 citrato/150 mM de NaCl, pH 4,5) de ARNm de CO-GLA (Caperuza 0 o Caperuza 1) a partir de una solución madre de
 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una
 30 suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con PBS 1x (pH
 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C. Concentración final = 0,72 mg/ml de ARNm de GLA (encapsulado). Zprom.

= 85,5 nm (Dv(50) = 61,9 nm; Dv(90) = 113 nm).

Para determinar si el tipo de caperuza incorporada en el ARNm de GLA influía en la producción de proteínas cuando el ARNm se encapsulaba en lípidos basados en C12-200, se llevó a cabo un experimento en el que se inyectó a ratones de tipo salvaje (CD-1) especies de ARNm de GLA protegidos con caperuza y posteriormente se monitorizó la producción de proteína GLA humana. Las especies de ARNm protegidas con caperuza incluían Caperuza 0 (no metilado en la posición 2'-O) y Caperuza 1 (metilado en 2'-O).

Los estudios anteriores se realizaron utilizando ratones CD-1 macho de aproximadamente 6-8 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Las muestras se introdujeron mediante una única inyección en bolo en la vena de la cola de una dosis total equivalente de 30 microgramos de ARNm de GLA, EPO, FIX o AIAT encapsulado. Las concentraciones séricas de proteína GLA se determinaron a las seis horas. Todos los animales fueron sacrificados mediante asfixia con CO₂ 6 horas después de la administración de la dosis ($\pm$ 5 %) seguida de una toracotomía y una recogida de sangre cardíaca terminal. Se recogió sangre completa (volumen máximo obtenible) mediante punción cardíaca en animales sacrificados en tubos separadores de suero, se dejó coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, se centrifugó a 22 °C $\pm$ 5 °C a 9300 g durante 10 minutos y se extrajo el suero. Para la recogida de sangre provisional a las seis horas, se recogieron aproximadamente 40-50 μ L de sangre completa mediante punción de la vena facial o corte de la cola. Las muestras recogidas de animales no tratados se utilizaron como niveles de referencia de GLA para comparar con los animales del estudio. Se extrajo el hígado y el bazo de cada ratón, se dividieron en tres partes y se almacenaron en formalina tamponada neutra al 10% o se congelaron rápidamente y se almacenaron a 80 °C.

La producción de proteína GLA humana se midió mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("ELISA"). Se siguieron los procedimientos ELISA estándar empleando IgG anti-Replagal G-188 de oveja como anticuerpo de captura con IgG anti-Replagal de conejo como anticuerpo secundario (de detección). Se utilizó IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para la activación de la solución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se detuvo utilizando H₂SO₄ 2N después de 20 minutos. La detección se controló mediante absorción (450 nm) en un instrumento Molecular Device Flex Station. Se utilizaron suero de ratón no tratado y proteína Replagal[®] humana como controles negativos y positivos, respectivamente.

Tal como se ilustra en la Figura 3, tras la inyección intravenosa de especies protegidas con caperuza de ARNm de CO-GLA cargadas en las nanopartículas lipídicas basadas en C12-200, se pudo detectar un nivel sustancial de proteína GLA humana en suero de ratón en 6 horas. Cabe destacar que hubo un aumento estadísticamente significativo en la producción de proteína cuando se empleó ARNm con una estructura Caperuza 1 en comparación con uno de una estructura Caperuza 0. Estos resultados demostraron la importancia de tener la capacidad de caracterizar y cuantificar la eficiencia de protección con caperuza del proceso de síntesis de ARNm.

Ejemplo 5: ELISA de caperuza utilizando placas recubiertas con Oligo dT

Este ejemplo demuestra el uso de placas ELISA recubiertas con oligo dT en ensayos de cuantificación de protección con caperuza. Específicamente, se probaron oligo-T20 mejorado con LNA (Exiqon) para determinar su eficiencia de unión en placas de amino con inmovilizador Nunc (Thermo Scientific) en un rango de 0,1 pmol/pocillo a 500 pmol/pocillo en 100 μ l de tampón de recubrimiento (50 mM NaHCO₃ pH 9,6). Las placas se incubaron durante 1,5 horas rotando a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con 200 μ l de tampón de lavado (1xPBS, 0,05 % Tween 20) y se secaron con toallas de papel. La capacidad de unión del ARNm se probó con ARNm protegido con caperuza/sin caperuza en un rango de 7,8 ng/pocillo a 500 ng/pocillo en 100 μ l de tampón de unión (fosfato de sodio 50 mM pH 7,0) y se incubó durante 90 minutos rotando a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200 μ l de tampón de lavado y se secaron con toallas de papel. 2 μ l de anticuerpo anti-caperuza (Sysy) se conjugaron directamente con HRP utilizando el kit de marcaje de IgG₁ de ratón con peroxidasa de rábano picante Zenon (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ l. El anticuerpo conjugado con HRP se mezcló a 0,8 μ l/ml en tampón de bloqueo (1x PBS, 2 % BSA, 0,05 % Tween 20) y se agregó a 100 μ l/pocillo y se incubó durante 1 hora rotando a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200 μ l de tampón de unión y se secaron con toallas de papel. La solución de sustrato TMB EIA se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron 100 μ l de esta solución a cada pocillo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo después de 10 minutos añadiendo 100 μ l de H₂SO₄ 2N y se leyó utilizando un lector de placas Molecular Devices a 450 nm. La **Figura 4** muestra resultados de ejemplo de cuantificación de la protección con caperuza en ARNm protegido o no con caperuza medidos mediante ELISA. La señal detectada se deriva de la interacción del anticuerpo anti-caperuza con la estructura de caperuza en las muestras de ARN.

Este ejemplo demuestra que la cuantificación de la protección con caperuza se puede optimizar utilizando placas ELISA reubiertas con oligo dT como sustratos de captura.

Ejemplo 6: Cuantificación de la eficiencia de la protección con caperuza utilizando ELISA de captura de oligo dT

En este ejemplo, se demostró además que la eficiencia de protección con caperuza en varias muestras de ARNm se

puede cuantificar de manera efectiva utilizando ELISA de captura de oligo dT.

Específicamente, se prepararon placas de captura de ARNm recubiertas con oligo dT mediante la unión de 50 pmol de oligo-T20 mejorado con LNA (Exiqon) en 100 µl de tampón de recubrimiento por pocillo en placas de amino con inmovilizador Nunc (Thermo Scientific). Las placas se incubaron durante 1,5 horas rotando a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de lavado (1×PBS, 0,05 % de Tween 20) y se secaron con toallas de papel. Se sintetizó oligo con protección de caperuza de N7 metilo [N7MeGppp]-AAAAAAAAAAAA AAAAA (Biosynthesis) para las mediciones de la curva estándar. Se añadieron 64 ng de oligonucleótidos protegidos con caperuza N7 metilo y 64 ng de ARNm protegido con caperuza sintetizado comercialmente con una cola de poliA de 200 pb o internamente con una cola de poliA de 500 pb por pocillo en 100 µl de tampón de unión a ARN (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0) y se incubaron durante 90 minutos con rotación a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de lavado y se secaron con papel absorbente. Se conjugaron 2 µl de anticuerpo anti-caperuza (Sysy) directamente con HRP utilizando el kit de marcado de IgG₁ de ratón con peroxidasa de rábano picante Zenon (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. El anticuerpo conjugado con HRP se mezcló a 0,8 µl/ml en tampón de bloqueo (1x PBS, 2 % BSA, 0,05 % Tween 20) y se añadió a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora rotando a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de unión y se secaron con toallas de papel. La solución de sustrato TMB EIA se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron 100 µl de esta solución a cada pocillo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo después de 10 minutos añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 2N y se leyó utilizando el lector de placas Molecular Devices a 450 nm. La **Figura 5** muestra resultados de ejemplo de cuantificación de la protección con caperuza en varias muestras de ARNm (por ejemplo, ciertos ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) de fabricación propia, ARNm de FFL comercial y un ARN protegido con caperuza N7 Metilo estándar) medidos mediante ELISA.

Este ejemplo demuestra que se puede utilizar ELISA (tal como ELISA de captura de oligo dT) para cuantificar eficazmente la eficiencia de protección con caperuza en muestras de ARNm.

Equivalencias y alcance

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando únicamente la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a la descripción anterior, sino que es el que se establece en las reivindicaciones adjuntas.

En las reivindicaciones, artículos, tales como "un", "una" y "el" o "la" pueden significar uno o más de uno, a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de dichos anticuerpos, y la referencia a "la célula" incluye la referencia a una o más células conocidas por los expertos en la materia, y así sucesivamente. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o de otro modo son relevantes para un producto o proceso determinado, a menos que se indique lo contrario o de otro modo sea evidente a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea o de otro modo es relevante para un producto o proceso determinado. La invención incluye realizaciones en las que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o de otro modo son relevantes para un producto o proceso determinado. Además, se debe entender que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que dependa de otra reivindicación puede modificarse para incluir una o más limitaciones que se encuentren en cualquier otra reivindicación que dependa de la misma reivindicación base. Además, cuando las reivindicaciones mencionan una composición, se debe entender que se incluyen procedimientos de uso de la composición para cualquiera de los fines descritos en el presente documento, y se incluyen procedimientos de fabricación de la composición de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de fabricación descritos en el presente documento u otros procedimientos conocidos en la técnica, a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para una persona con conocimientos ordinarios en la técnica que surgiera una contradicción o inconsistencia.

Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo Markush, se debe entender que cada subgrupo de los elementos también se divulga, y cualquier elemento o elementos se puede eliminar del grupo. Se debe entender que, en general, cuando se hace referencia a la invención, o aspectos de la invención, como que comprenden elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc. Para fines de simplicidad, esas realizaciones no se han establecido específicamente en haec verba en el presente documento. Se observa que el término "que comprende" pretende ser abierto y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales.

Cuando se dan rangos o intervalos, se incluyen puntos finales. Además, se debe entender que, a menos que se indique lo contrario o que sea evidente de otro modo a partir del contexto y la comprensión de una persona con conocimientos ordinarios en la materia, los valores que se expresan como rangos pueden asumir cualquier valor específico o subrango dentro de los rangos de estado en diferentes realizaciones de la invención, hasta la décima

parte de la unidad del límite inferior del rango, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, se debe entender que cualquier realización particular de la presente invención que se encuentre dentro de la técnica anterior puede excluirse explícitamente de una o más de las reivindicaciones. Dado que dichas realizaciones se consideran conocidas por una persona con conocimientos ordinarios en la materia, pueden excluirse incluso si la exclusión no se establece explícitamente en el presente documento. Cualquier realización particular de las composiciones de la invención puede excluirse de una o más de las reivindicaciones, por cualquier motivo, ya sea que esté o no relacionado con la existencia de la técnica anterior.

Las publicaciones analizadas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo aquí expuesto debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder a dicha divulgación en virtud de una divulgación previa.

Otras realizaciones

Los expertos en la materia entenderán fácilmente que lo anterior representa simplemente ciertas realizaciones preferidas de la invención. Se pueden realizar diversos cambios y modificaciones a los procedimientos y composiciones descritos anteriormente sin apartarse del espíritu o alcance de la presente invención, tal como se establece en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para cuantificar la eficiencia de protección con caperuza del ARNm, comprendiendo el procedimiento:

(i) una reacción de transcripción *in vitro* que comprende:

- (a) la transcripción *in vitro* del ARNm; y
(b) la incorporación de un análogo de caperuza,

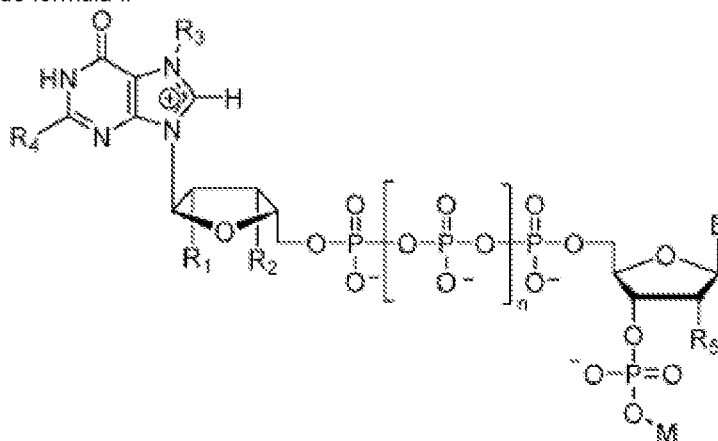
(ii) una etapa de cuantificación que comprende:

- (a) proporcionar una sustancia de unión específica a caperuza en condiciones que permitan la formación de un complejo entre la sustancia de unión específica a caperuza y el ARNm protegido con caperuza; y
(b) determinar cuantitativamente la cantidad del complejo en comparación con un control, cuantificando de este modo la eficiencia de protección con caperuza del ARNm,

en el que la transcripción *in vitro* comprende al menos una ARN polimerasa de fago, una plantilla de ADN que contiene un promotor de polimerasa de fago, nucleótidos y un tampón que contiene una sal de magnesio.

2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la caperuza:

(a) tiene una estructura de fórmula I:



en la que,

B es una nucleobase, opcionalmente en la que la nucleobase es guanina;

R₁ se selecciona entre un halógeno, OH y OCH₃;

R₂ se selecciona entre H, OH y OCH₃;

R₃ es CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃ o nulo;

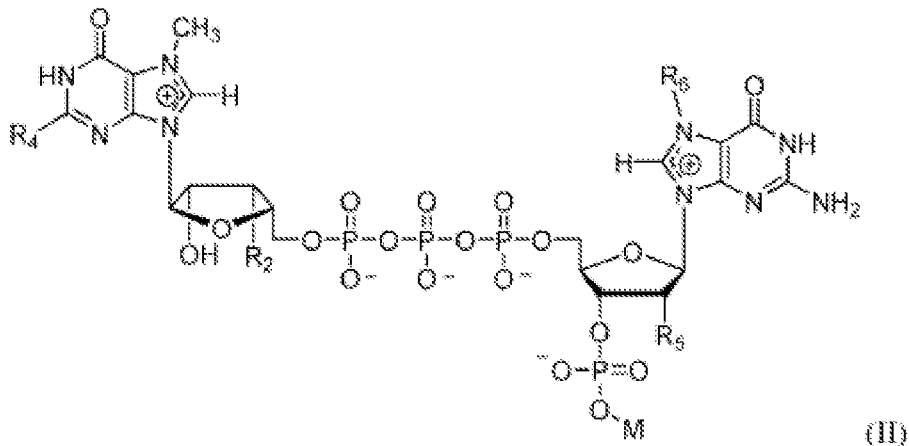
R₄ es NH₂;

R₅ se selecciona entre OH, OCH₃ y un halógeno;

n es 1, 2 o 3; y

M es un nucleótido del ARNm; y/o

(b) es una caperuza de m⁷G con una estructura de fórmula II:



en la que,

R₂ es H o CH₃;

R₄ es NH₂;

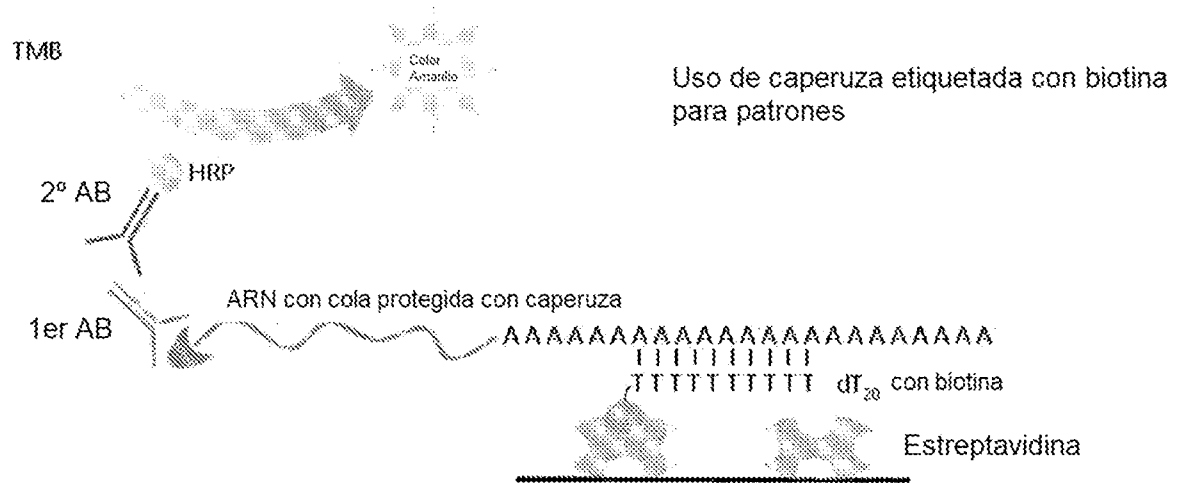
R₅ es OH u OCH₃;

R₆ es H o CH₃; y
M es un nucleótido del ARNm.

- 5 3. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la ARN polimerasa del fago se selecciona entre T7, T3 y SP6.
4. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los nucleótidos comprenden (a) ATP, CTP, GTP y UTP o (b) un análogo de A, C, G o U en forma fosforilada.
- 10 5. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia de unión específica a caperuza es:
 - (i) una proteína de unión específica a caperuza seleccionada del grupo que consiste en factor de iniciación eucariota 4E (eIF-4E), subunidad 1 de proteína de unión a caperuza nuclear, subunidad 2 de proteína de unión a caperuza nuclear y complejo de unión a caperuza nuclear; o
 - 15 (ii) un anticuerpo específico a caperuza, opcionalmente en el que la sustancia de unión específica a caperuza es un anticuerpo anti-m⁷G, opcionalmente en el que la etapa de determinar cuantitativamente la cantidad del complejo comprende realizar un ensayo ELISA.
- 20 6. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de determinar cuantitativamente la cantidad del complejo comprende medir una señal detectable asociada con el complejo, opcionalmente en el que
 - (i) la señal detectable está directamente asociada con la sustancia de unión específica a la caperuza, o
 - (ii) la señal detectable está indirectamente asociada con la sustancia de unión específica a la caperuza a través de un agente secundario que se une a la sustancia de unión específica a la caperuza, opcionalmente en el que el agente secundario es un anticuerpo secundario,
 - 25 opcionalmente en el que la señal detectable es una señal fluorescente, una señal colorimétrica o una señal radiactiva, opcionalmente en el que la señal fluorescente se genera convirtiendo un sustrato enzimático en un producto cromogénico, quimiofluorescente o quimioluminiscente mediante una enzima asociada directa o indirectamente con la sustancia de unión específica a la caperuza, opcionalmente en el que el sustrato enzimático se selecciona entre los grupos que consisten en sal disódica de fosfato de p-pitrofenilo (PNPP), sal de diamonio de 2,2'-azinobis[ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico] (ABTS), diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB),
 - 30 opcionalmente en el que la enzima es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.
- 35 7. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el control comprende (i) una muestra de ARNm con una cantidad predeterminada de ARNm protegido con caperuza, o (ii) una cantidad predeterminada de caperuza sintetizada.
- 40 8. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cuantificación de la eficiencia de protección con caperuza del ARNm comprende (i) cuantificar la cantidad absoluta de ARNm protegido con caperuza en la muestra de ARNm, y/o (ii) cuantificar el porcentaje de ARNm protegido con caperuza en la muestra de ARNm.
- 45 9. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento comprende además una etapa de captura del ARNm en un sustrato, opcionalmente en el que el ARNm es capturado por (i) un oligo poli-T que se une a la cola poli-A del ARNm o (ii) una proteína de unión a poli-A o un anticuerpo, opcionalmente en el que el sustrato es una microplaca, una perla magnética, una partícula, una perla polimérica, una resina cromatográfica, un papel de filtro, nitrocelulosa, diazocelulosa, vidrio, látex, poliestireno, cloruro de polivinilo, propileno, polietileno, dextrano, sefarosa, agar, almidón, nailon, gel de sílice o hidrogel, opcionalmente en el que el sustrato está recubierto con avidina o estreptavidina, opcionalmente en el que el oligo poli-T o la proteína de unión a poli-A o el anticuerpo están biotinilados.
- 50 10. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el análogo de caperuzón se incorpora mediante la adición de guanilil transferasa recombinante.
- 55 11. Kit para cuantificar la eficiencia de protección con caperuza del ARNm, comprendiendo el kit:
 - una sustancia de unión específica a caperuzón;
 - uno o más reactivos para detectar un complejo entre la sustancia de unión específica a caperuza y un ARNm protegido con caperuza, y
 - un control para cuantificar el ARNm protegido con caperuza, en el que el control comprende una cantidad predeterminada de ARNm protegido con caperuza o una cantidad predeterminada de caperuza sintetizada.
- 60 12. Kit de la reivindicación 11, en el que (a) la sustancia de unión específica a caperuza es un anticuerpo específico de la caperuza, opcionalmente en el que el anticuerpo específico de la caperuza es un anticuerpo anti-m⁷G, y/o (b) el kit comprende además un sustrato para capturar ARN.
- 65 13. Procedimiento de fabricación de ARNm que comprende una etapa de cuantificación de la eficiencia de protección con caperuza del ARNm de acuerdo con un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

14. Procedimiento de la reivindicación 13, en el que el procedimiento comprende una etapa de ajuste de una condición de fabricación en función del resultado de la cuantificación de la eficiencia de protección con caperuza del ARNm, opcionalmente en el que la etapa de cuantificación se lleva a cabo antes de liberar un lote de ARNm.

Ensayo de protección con caperuza del ARNm utilizando ELISA



1er Ab: anti-caperuza m₃G-/m⁷G monoclonal de ratón
 2º Ab: ab con HRP de cabra anti-ratón

FIG. 1

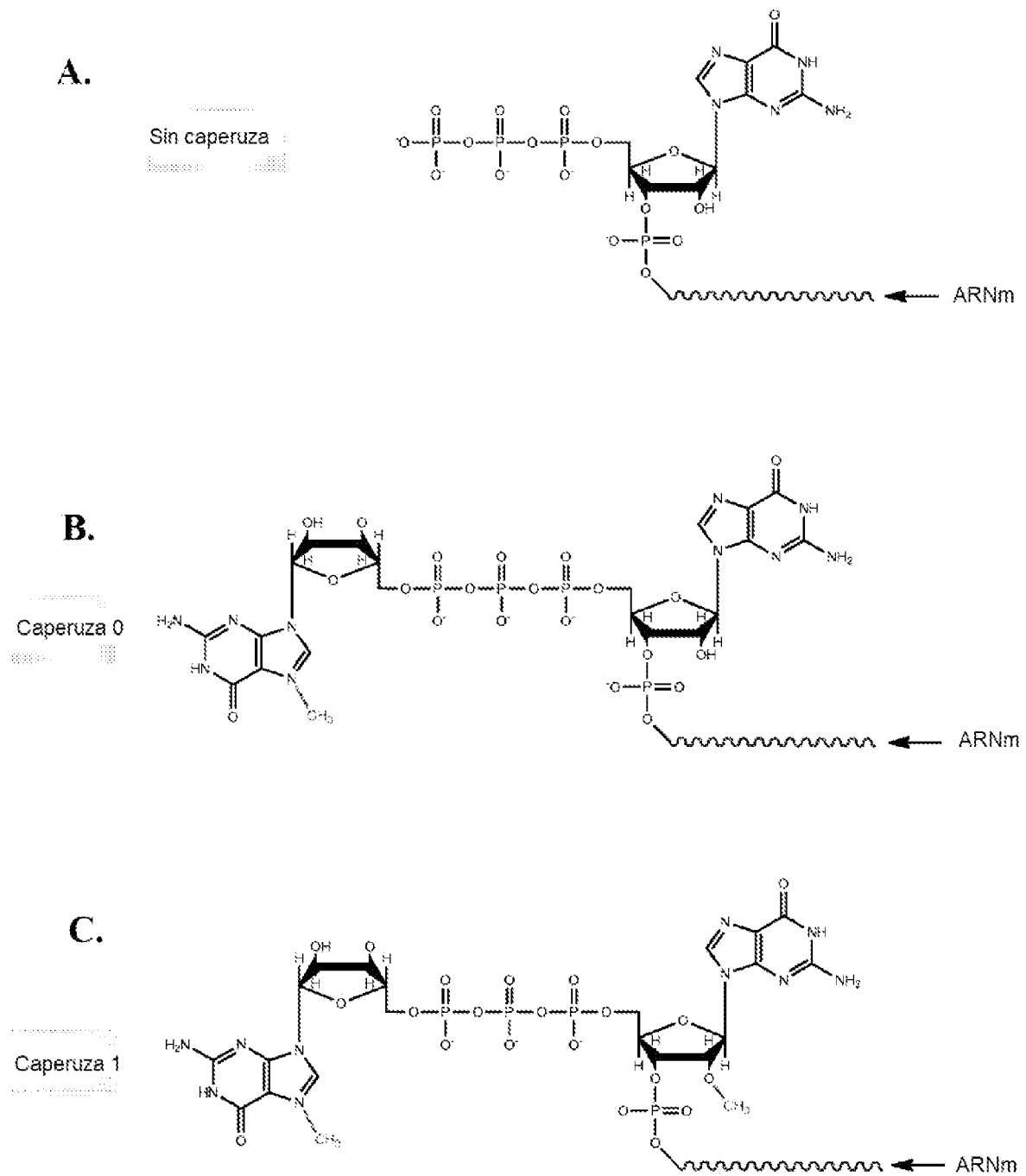


FIG. 2

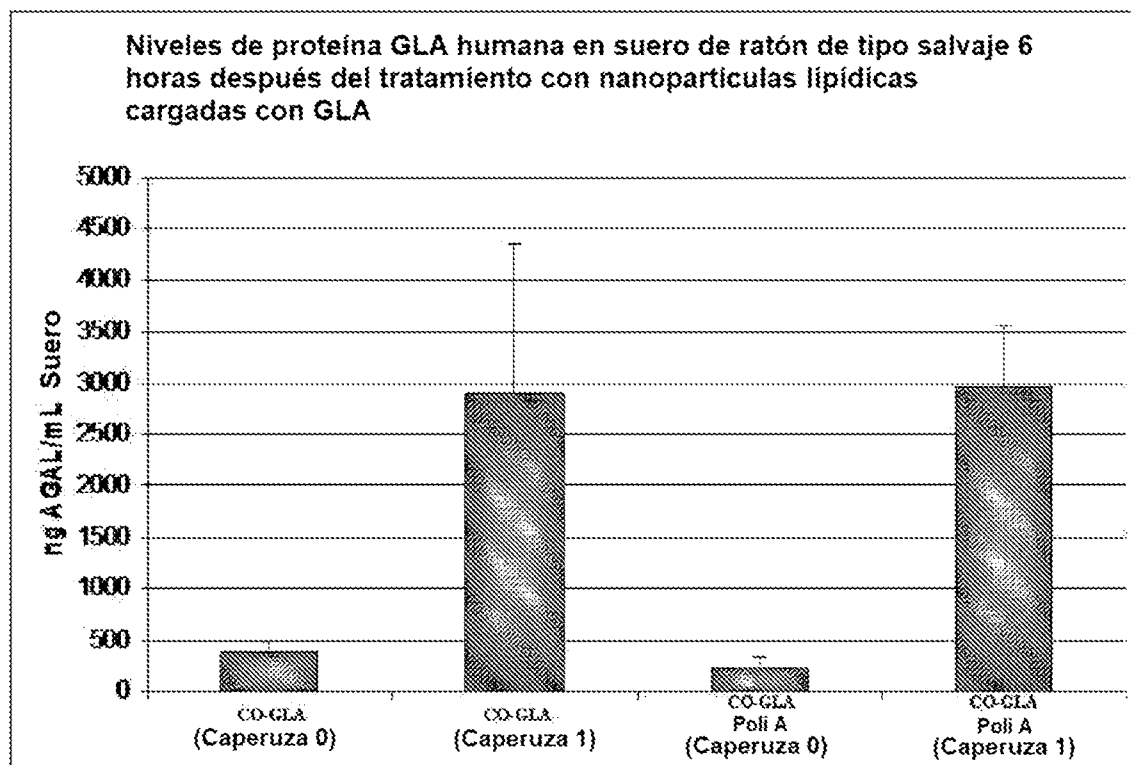


FIG. 3

**ELISA de caperuza con oligo dT con LNA que
recubre placas amino con inmovilizador Nunc**

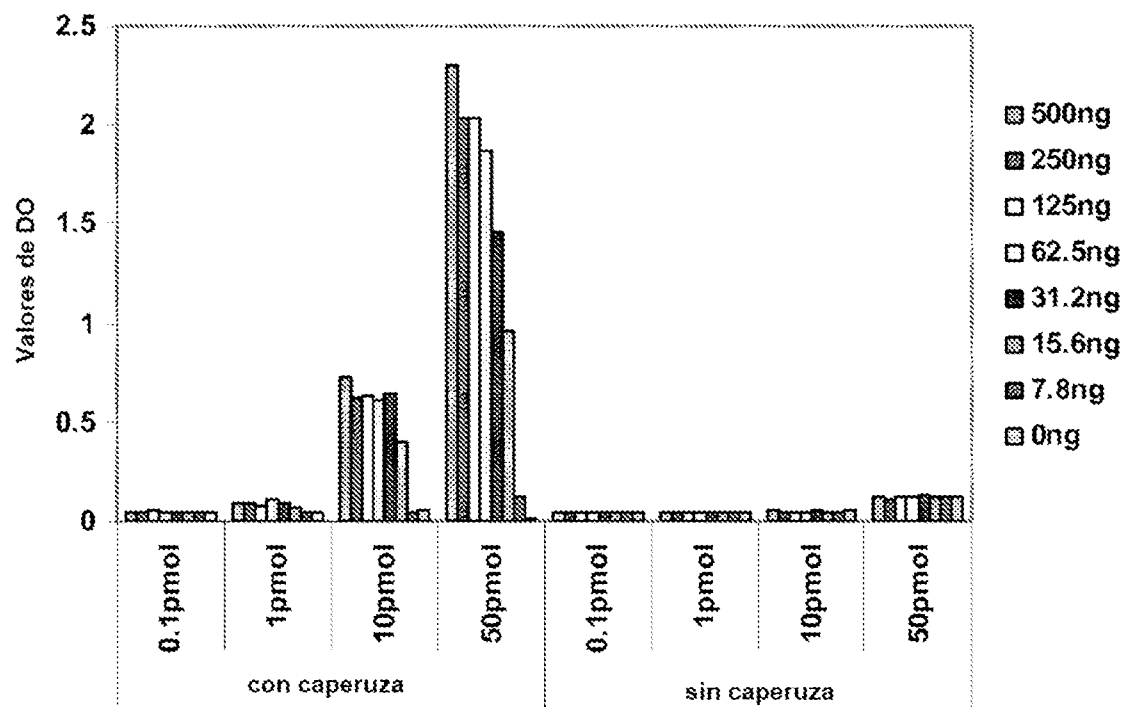


FIG. 4

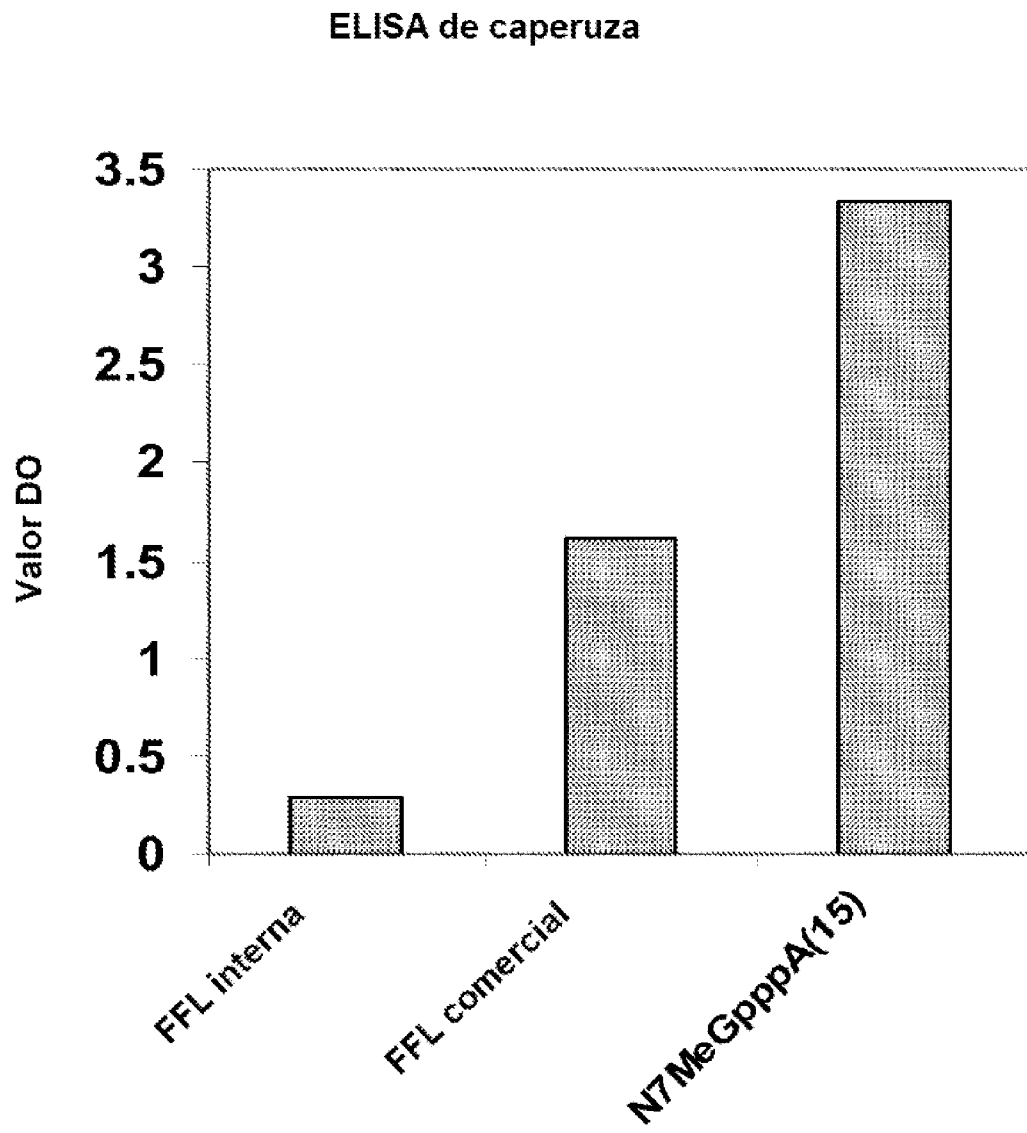


Fig. 5