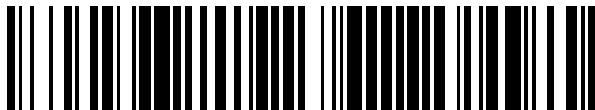


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 923 757**

(51) Int. Cl.:

A61K 48/00	(2006.01)	C07K 2/00	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)	C12N 15/117	(2010.01)
C12N 15/85	(2006.01)	C12P 21/00	(2006.01)
A61K 31/7115	(2006.01)	A61K 31/7105	(2006.01)
C12N 9/88	(2006.01)	C12N 15/88	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)	C12N 15/00	(2006.01)
A61K 9/127	(2006.01)	A61P 3/00	(2006.01)
A61K 9/14	(2006.01)	A61P 3/10	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)	A61P 9/10	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/US2012/069610**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13090648**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12858350 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2022 EP 2791160**

(54) Título: **Composiciones de ARNm modificado**

(30) Prioridad:

16.12.2011 US 201161576705 P
02.04.2012 US 201261618957 P
17.05.2012 US 201261648244 P
10.08.2012 US 201261681712 P
04.09.2012 US 201261696381 P
03.10.2012 US 201261709303 P
03.10.2012 WO PCT/US2012/058519
11.10.2012 US 201261712490 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2022

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

DE FOUGEROLLES, ANTONIN;
WOOD, KRISTY M.;
ELBASHIR, SAYDA M.;
AFEYAN, NOUBAR B.;
VALENCIA, PEDRO y
SCHRUM, JASON P.

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 923 757 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

Composiciones de ARNm modificado

5 ANTECEDENTES

- En general, las moléculas de ácido nucleico exógenas no modificadas, particularmente los ácidos nucleicos virales, introducidas en la célula inducen una respuesta inmunitaria innata que da como resultado la producción de citocinas e interferón (IFN) y, en última instancia, la muerte celular. Es de gran interés para la terapia, el diagnóstico, los reactivos y los ensayos biológicos poder administrar un ácido nucleico, p. ej., un ácido ribonucleico (ARN), en una célula, para provocar la traducción intracelular del ácido nucleico y la producción de la proteína codificada en lugar de generar una respuesta inmunitaria innata. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar composiciones de formulación que comprendan un agente de administración que pueda facilitar de manera efectiva la administración in vivo de ácidos nucleicos a células diana sin generar una respuesta inmunitaria innata.
- 15 El documento US 2009/0286852 A1 (Kariko y col.), publicado el 19 de noviembre de 2009, se refiere a moléculas de ARN, oligorribonucleótidos y polirribonucleótidos que comprenden, por ejemplo, pseudouridina o un nucleósido modificado, vectores de terapia génica que los comprenden, procedimientos de terapia génica y procedimientos de silenciamiento de la transcripción génica que comprende los mismos, procedimientos para reducir la inmunogenicidad de los mismos y procedimientos para sintetizarlos.
- 20

RESUMEN

- 25 La presente invención se define en las reivindicaciones y proporciona una composición farmacéutica que comprende un ARNm de 1-metil-pseudouridina-modificado que codifica un polipéptido de interés, en el que el ARNm se formula como una nanopartícula lipídica. Otros aspectos de la invención también se definen en las reivindicaciones.

- 30 La presente descripción proporciona, entre otras cosas, composiciones de formulación que comprenden moléculas de ácido nucleico modificadas que pueden codificar una proteína, un precursor de proteína o una forma parcial o totalmente procesada de la proteína o un precursor de proteína. Las composiciones de formulación pueden incluir además una molécula de ácido nucleico modificada y un agente de administración. La presente descripción proporciona además ácidos nucleicos útiles para codificar polipéptidos capaces de modular la función y/o actividad de una célula.

- 35 En un aspecto, se describe un procedimiento para producir un polipéptido de interés en una célula o tejido de mamífero. El procedimiento comprende poner en contacto la célula o tejido de mamífero con una formulación que comprende un ARNm modificado que codifica un polipéptido de interés. La formulación puede ser, pero no se limita a, nanopartículas, microesferas de polí(ácido láctico-co-glicólico)(PLGA), lipoides, lipoplex, liposomas, polímeros, carbohidratos (incluyendo azúcares simples), lípidos catiónicos, gel de fibrina, hidrogel de fibrina, pegamento de fibrina, sellador de fibrina, fibrinógeno, trombina, nanopartículas lipídicas de eliminación rápida (reLNP) y combinaciones de los mismos. El ARNm modificado puede comprender un transcripto lVT purificado.

- 45 En un aspecto, la formulación que comprende el ARNm modificado es una nanopartícula que puede comprender al menos un lípido. El lípido puede seleccionarse de, entre otros, DLin-DMA, DLin-K-DMA, 98N12-5, C12-200, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA, DODMA, PLGA, PEG, PEG-DMG y lípidos PEGilados. En otro aspecto, el lípido puede ser un lípido catiónico tal como, entre otros, DLin-DMA, DLin-D-DMA, DLin-MC3-DMA, DLin-KC2-DMA y DODMA.

- 50 La proporción de lípidos a ARNm modificado en la formulación puede estar entre 10:1 y 30:10. El tamaño medio de la formulación de nanopartículas puede comprender el ARNm modificado entre 60 y 225 nm. El PDI de la formulación de nanopartículas que comprende el ARNm modificado está entre 0,03 y 0,15. El potencial zeta del lípido puede ser de -10 a +10 a un pH de 7.4.

- 55 Las formulaciones de ARNm modificado pueden comprender un lípido fusogénico, colesterol y un lípido PEG. La formulación puede tener una relación molar 50:10:38,5:1,5-3,0 (lípido catiónico:lípido fusogénico:colesterol:lípido PEG). El lípido PEG se puede seleccionar de, pero no se limita a, PEG-c-DOMG, PEG-DMG. El lípido fusogénico puede ser DSPC.

- 60 La célula o tejido de mamífero puede ponerse en contacto usando un dispositivo tal como, entre otros, una bomba de jeringa, una bomba osmótica interna y una bomba osmótica externa.

- 60 La formulación de ARNm modificado puede ser una microesfera de PLGA que puede tener un tamaño de entre 4 y 20

μm. El ARNm modificado puede liberarse de la formulación en menos del 50 % en un período de tiempo de 48 horas. La formulación de microesferas de PLGA puede ser estable en suero. La estabilidad se puede determinar en relación con el ARNm modificado no formulado en el 90 %.

5 El porcentaje en peso de carga de la microesfera de PLGA de ARNm modificado puede ser de al menos 0,05 %, al menos 0,1 %, al menos 0,2 %, al menos 0,3 %, al menos 0,4 % o al menos 0,5 %. La eficacia de encapsulación del ARNm modificado en la microesfera de PLGA puede ser de al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 % o al menos el 97 %.

10 Se puede formular una nanopartícula lipídica en un sellador tal como, entre otros, un sellador de fibrina.

Las células o tejidos de mamíferos pueden ponerse en contacto por una vía de administración tal como, pero sin limitación, intravenosa, intramuscular, intravítreo, intratecal, intratumoral, pulmonar y subcutánea. Las células o tejidos de mamíferos pueden ponerse en contacto utilizando un programa de dosificación dividida. La célula o tejido de mamífero puede ponerse en contacto mediante inyección. La inyección se puede realizar en tejido seleccionado del grupo que consiste en espacio intradérmico, epidermis, tejido subcutáneo y músculo. El polipéptido de interés se puede producir en la célula o tejido en un lugar sistémico desde el lugar de contacto.

15 20 El polipéptido de interés puede detectarse en suero hasta 72 horas después del contacto. El nivel del polipéptido de interés puede ser mayor que los niveles previos a la dosificación. El nivel del polipéptido de interés puede ser mayor en el suero de mujeres que en el suero de hombres.

La formulación de ARNm modificado puede comprender más de un ARNm modificado. La formulación puede tener dos o tres ARNm modificados.

25 30 La formulación que comprende el ARNm modificado puede comprender una nanopartícula lipídica eliminada rápidamente (reLNP) que puede comprender un lípido reLNP, un lípido fusogénico, colesterol y un lípido PEG en una relación molar de 50: 10: 38,5: 1,5 (lípido reLNP:lípido fusogénico: colesterol: PEG lípido). El lípido fusogénico puede ser DSPC y el lípido PEG puede ser PEG-c-DOMG. El lípido reLNP puede ser DLin-DMA con un éster interno o terminal o DLin-MC3-DMA con un éster interno o terminal. La relación en peso de lípidos totales a ARNm modificado puede estar entre 10:1 y 30:1.

La formulación que comprende ARNm modificado puede comprender un sellador de fibrina.

35 La formulación que comprende ARNm modificado puede comprender un lípido donde el lípido se selecciona del grupo que consiste en C12-200 y 98N12-5.

40 La formulación que comprende ARNm modificado puede incluir un polímero. El polímero se puede recubrir, cubrir, rodear, encerrar o comprender una capa de hidrogel o sellador quirúrgico. El polímero se puede seleccionar del grupo que consiste en PLGA, etilenvinilacetato, poloxámero y GELSITE®.

45 Un polipéptido de interés se puede producir en una célula o tejido de mamífero poniendo en contacto la célula o tejido de mamífero con una formulación de tampón que comprende un ARNm modificado que codifica el polipéptido de interés. La formulación de tampón se puede seleccionar de, pero no se limita a, solución salina tamponada con fosfato y lactato de Ringer. La formulación de tampón puede comprender una concentración de calcio de entre 1 y 10 mM. El ARNm modificado en la formulación de tampón puede comprender un transcripto IVT purificado.

50 55 60 Se puede producir un efecto farmacológico en un primate poniendo en contacto al primate con una composición que comprende un ARNm modificado formulado que codifica un polipéptido de interés. El ARNm modificado puede comprender un transcripto IVT purificado y/o puede formularse en nanopartículas, microesferas de polí(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), lipidoides, lipoplejos, liposomas, polímeros, carbohidratos (incluidos los azúcares simples), lípidos catiónicos, gel de fibrina, hidrogel de fibrina, pegamento de fibrina, sellador de fibrina, fibrinógeno, trombina, nanopartículas lipídicas de eliminación rápida (reLNP) y combinaciones de los mismos. El efecto farmacológico puede ser mayor que el efecto farmacológico asociado con un agente terapéutico y/o una composición conocida para producir dicho efecto farmacológico. La composición puede comprender un ARNm modificado formulado o no formulado. El efecto farmacológico puede resultar en un resultado terapéuticamente efectivo de una enfermedad, trastorno, condición o infección. Dicho resultado terapéuticamente efectivo puede incluir, pero no se limita a, tratamiento, mejora de uno o más síntomas, diagnóstico, prevención y retraso del inicio. El efecto farmacológico puede incluir, entre otros, cambios en el recuento de células, alteración de la química sérica, alteración de la actividad enzimática, aumento de la hemoglobina y aumento del hematocrito.

En un aspecto, la presente descripción proporciona una composición de formulación que comprende una molécula de

- ácido nucleico modificada y un agente de administración. La molécula de ácido nucleico modificada puede seleccionarse del grupo que consiste en ADN, ADN complementario (ADNc), ARN, ARN mensajero (ARNm), agentes inductores de ARNi, agentes de ARNi, siARN, ARNsh, miARN, ARN antisentido, ribozimas, ADN catalítico , ARN que inducen la formación de triple hélice, aptámeros, vectores y combinaciones de los mismos. Si la molécula de ácido nucleico modificada es ARNm, el ARNm puede derivar de ADNc.
- En un aspecto, la molécula de ácido nucleico modificada puede comprender al menos una modificación y una región traducible. En algunos casos, el ácido nucleico modificado comprende al menos dos modificaciones y una región traducible. La modificación puede estar ubicada en el esqueleto y/o un nucleósido de la molécula de ácido nucleico.
- La modificación puede localizarse tanto en un nucleósido como en un enlace de cadena principal.
- En un aspecto, una modificación se puede ubicar en el enlace del esqueleto de la molécula de ácido nucleico modificada. El enlace de la columna vertebral puede modificarse reemplazando uno o más átomos de oxígeno. La modificación del enlace principal puede comprender reemplazar al menos un enlace fosfodiéster con un enlace fosforotioato.
- En un aspecto, una modificación puede ubicarse en un nucleósido de la molécula de ácido nucleico modificada. La modificación en el nucleósido puede localizarse en el azúcar de dicho nucleósido. La modificación del nucleósido puede ocurrir en la posición 2' del nucleósido.
- La modificación de nucleósido descrita en esta invención puede incluir un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2- tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil- 2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1 - metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1- deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxicitidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina, 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza- adenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoladenosina, N6-treonilcarbamoladenosina, 2-metiltio-N6-treonil carbamoladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina, 2-metoxi-adenina, inosina, 1-metilinosina, wyosina, wybudosina, 7 -deaza-guanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina , 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina , 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina. En otro aspecto, las modificaciones se seleccionan independientemente del grupo que consiste en 5-metilcitosina, pseudouridina y 1-metilpseudouridina.
- En un aspecto, una modificación puede ubicarse en una nucleobase de la molécula de ácido nucleico modificada. La modificación de la nucleobase se puede seleccionar del grupo que consiste en citosina, guanina, adenina, timina y uracilo. La modificación en la nucleobase se puede seleccionar del grupo que consiste en deaza-adenosina y deaza-guanosina, y el enlazador se puede unir en una posición C-7 o C-8 de dicha deaza-adenosina o deaza-guanosina. La nucleobase modificada se puede seleccionar del grupo que consta de citosina y uracilo, y el enlazador se puede unir a la nucleobase modificada en una posición N-3 o C-5. El enlazador unido a la nucleobase puede seleccionarse del grupo que consiste en dietilenglicol, dipropilenglicol, trietylenglicol, tripropilenglicol, tetraetylenglicol, alquilo divalente, alquenilo, resto alquinilo, éster, amida y resto éter.
- En un aspecto, se pueden ubicar dos modificaciones de la molécula de ácido nucleico en los nucleósidos de la molécula de ácido nucleico modificada. Los nucleósidos modificados se pueden seleccionar de 5-metilcitosina y pseudouridina.
- En un aspecto, dos modificaciones de la molécula de ácido nucleico modificada pueden ubicarse en un nucleótido o un nucleósido. En un aspecto, la presente descripción proporciona una formulación que comprende una molécula de ácido nucleico tal como, entre otros, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y un agente de administración. La molécula de ácido nucleico puede comprender una cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos de longitud. Además, la molécula de ácido nucleico puede comprender al menos una tapa (cap) terminal 5' tal como, entre otros, Cap0, Cap1, ARCA, inosina, N1-metil-guanosina, 2'fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8 -oxo-

guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un ácido nucleico de SEQ ID NO: 6, una tapa terminal 5' que es Cap1, una cola poli A de aproximadamente 160 nucleótidos de longitud y un agente de administración.

5 En un aspecto, la presente descripción proporciona un ácido nucleico de SEQ ID NO: 7, una tapa terminal 5' que es Cap1, una cola poli A de aproximadamente 160 nucleótidos de longitud y un agente de administración.

10 En un aspecto, la presente descripción proporciona un ácido nucleico de SEQ ID NO: 9, una tapa terminal 5' que es Cap1, una cola poli A de aproximadamente 160 nucleótidos de longitud y un agente de administración.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un ácido nucleico de SEQ ID NO: 10, una tapa terminal 5' que es Cap1, una cola poli A de aproximadamente 160 nucleótidos de longitud y un agente de administración.

15 En un aspecto, el agente de administración comprende al menos un procedimiento para mejorar la administración seleccionado del grupo que consiste en lipídoides, liposomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas lipídicas eliminadas rápidamente (reLNP), polímeros, lipoplejos, péptidos, proteínas, hidrogeles, selladores, modificaciones químicas, conjugación, células y potenciadores. El lipidoide, la nanopartícula lipídica y las nanopartículas lipídicas eliminadas rápidamente que se pueden usar como agente de administración pueden incluir un lípido que se puede seleccionar del grupo que consiste en C12-200, MD1, 98N12-5, DLin-DMA, DLin-K-DMA, DLin-KC2-DMA, DLin-MC3-DMA, PLGA, PEG, PEG-DMG, lípidos PEGilados y análogos de los mismos. La nanopartícula lipídica rápidamente eliminada puede tener un enlace éster en el extremo terminal de la cadena lipídica, o un enlace éster puede ser un enlace interno ubicado a la derecha o izquierda de un carbono saturado en la cadena lipídica. La nanopartícula lipídica eliminada rápidamente que se puede usar como agente de administración puede ser, pero no se limita a, DLin-MC3-DMA y DLin-DMA.

En un aspecto, la nanopartícula lipídica puede comprender PEG y al menos un componente tal como, entre otros, colesterol, lípido catiónico y lípido fusogénico.

30 En un aspecto, la nanopartícula lipídica puede comprender al menos uno de PEG, colesterol, lípido catiónico y lípido fusogénico.

35 En un aspecto, el lípido fusogénico es disteroifosfatidilcolina (DSPC). En otro aspecto, el lípido PEG es PEG-DMG. En otro aspecto más, el lípido catiónico puede ser, entre otros, DLin-DMA, DLin-MC3-DMA, C12-200, 98N12-5 y DLin-KC2-DMA.

En un aspecto, la composición de nanopartículas lipídicas puede comprender 50 % en moles de lípido catiónico, 10 % en moles de DSPC, 1,5-3,0 % en moles de PEG y 37-38,5 % en moles de colesterol.

40 En un aspecto, se puede formular un ácido nucleico modificado con PLGA para formar una formulación de liberación sostenida. En otro aspecto, se puede formular un ácido nucleico modificado con PLGA y otros componentes activos y/o inactivos para formar una formulación de liberación sostenida. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico modificada puede incluir, entre otros, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

45 En un aspecto, una formulación de liberación sostenida puede comprender una microesfera de liberación sostenida. La microesfera de liberación sostenida puede tener un diámetro de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 um. En otro aspecto, la microesfera de liberación sostenida puede contener de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 por ciento en peso de al menos una molécula de ácido nucleico modificada.

50 En un aspecto, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir al menos un codón de parada antes de la región 3' no traducida (UTR). El codón de parada se puede seleccionar de TGA, TAA y TAG. En un aspecto, los ácidos nucleicos modificados incluyen el codón de parada TGA y un codón de parada adicional. En otro aspecto, el codón de parada de la adición puede ser TAA. En otro aspecto, el ácido nucleico modificado incluye tres codones de parada.

55 En un aspecto, la presente descripción proporciona una formulación de liberación controlada que comprende un ácido nucleico modificado que puede codificar un polipéptido de interés. El ácido nucleico modificado puede encapsularse o encapsularse sustancialmente en un agente de administración. El agente de administración puede estar revestido, cubierto, rodeado, encerrado o comprender una capa de polímero, hidrogel y/o sellador quirúrgico. En otro aspecto, la formulación de liberación controlada puede comprender una segunda capa de polímero, hidrogel y/o sellador quirúrgico.

En un aspecto, el agente de administración de la formulación de liberación controlada puede incluir, entre otros, lipídoides, liposomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas lipídicas eliminadas rápidamente, lipoplejos y nanopartículas lipídicas autoensambladas.

- 5 El polímero que se puede usar en la formulación de liberación controlada puede incluir, entre otros, PLGA, etilenvinilacetato, poloxámero y GEL SITE®. El sellador quirúrgico que puede usarse en la formulación de liberación controlada puede incluir, entre otros, polímeros de fibrinógeno, TISSEELL®, selladores basados en PEG y COSEAL®.
- 10 En un aspecto, el agente de administración de la formulación de liberación controlada comprende una nanopartícula lipídica o un agente de administración de nanopartículas lipídicas eliminadas rápidamente. En un aspecto, la nanopartícula lipídica o la nanopartícula lipídica rápidamente eliminada puede estar recubierta, sustancialmente recubierta, cubierta, sustancialmente cubierta, rodeada, sustancialmente rodeada, encerrada, sustancialmente encerrada o comprende una capa de polímero, hidrogel y/o sellador quirúrgico. En otro aspecto, el agente de administración puede ser una nanopartícula lipídica que puede estar recubierta, sustancialmente recubierta, cubierta, sustancialmente cubierta, rodeada, sustancialmente rodeada, encerrada, sustancialmente encerrada o comprende una capa de PLGA.
- 15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 20 Los objetos, características y ventajas anteriores y otros serán evidentes a partir de la siguiente descripción, como se ilustra en los dibujos adjuntos, en los que los mismos caracteres de referencia se refieren a las mismas partes en las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de varios aspectos.
- 25 La Fig. 1 ilustra estructuras de lípidos útiles en el estado de la técnica. Se muestran las estructuras para 98N12-5 (TETA5-LAP), DLin-DMA, DLin-K-DMA (2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano), DLin-KC2-DMA, DLin-MC3-DMA y C12-200.
- 30 La Fig. 2 es un plásmido representativo útil en las reacciones IVT enseñadas en esta invención. El plásmido contiene el inserto 64818, diseñado por los presentes inventores.
- La Fig. 3 es un perfil de gel de ARNm encapsulado modificado en microesferas de PLGA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 35 La administración de ácidos nucleicos a las células tiene muchas complicaciones no deseadas, incluida la integración del ácido nucleico en el genoma de la célula diana, lo que puede dar lugar a niveles de expresión imprecisos, la transferencia perjudicial del ácido nucleico a la progenie y a las células vecinas y un riesgo sustancial de causar mutaciones. Las moléculas de ácido nucleico modificadas de la presente descripción son capaces de reducir la actividad inmunitaria innata de una población de células en las que se introducen, aumentando así la eficacia de la producción de proteínas en esa población celular. Además, en esta invención se describen una o más actividades y/o propiedades ventajosas adicionales de los ácidos nucleicos y las proteínas de la presente descripción.

- 40
- 45 Además, en esta invención se proporcionan procedimientos para tratar a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad, trastorno y/o afección, los procedimientos que comprenden administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una composición descrita en esta invención en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad, trastorno y/o condición.

- A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta invención tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la materia.
- 50
- Moléculas de ácido nucleico modificado**

- 55 La presente descripción proporciona ácidos nucleicos, incluyendo ARN tal como ARNm, que contienen uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados (denominados "moléculas de ácido nucleico modificadas", "ARNm modificado" o "moléculas de ARNm modificadas") como se describe en esta invención. La modificación de las moléculas de ácido nucleico puede tener propiedades útiles que incluyen, entre otras, una disminución significativa o la ausencia de una inducción sustancial de la respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el ARNm modificado. Las moléculas de ácido nucleico modificadas también pueden mostrar eficiencia mejorada de la producción de proteína, retención intracelular de ácidos nucleicos y viabilidad de células contactadas así como que tienen inmunogenicidad reducida en comparación con moléculas de ácido nucleico no modificadas.

Se proporcionan moléculas de ácido nucleico modificadas que contienen una región traducible y una, dos o más de dos modificaciones de nucleósidos diferentes. Ejemplos de ácidos nucleicos para su uso en esta descripción incluyen ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos de treosa (TNA), ácidos nucleicos de glicol (GNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o un híbrido de los mismos. Las moléculas de ácido nucleico

5 modificadas incluyen ARN mensajero (ARNm). Como se describe en esta invención, las moléculas de ácido nucleico modificadas de la presente descripción pueden no inducir sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el ARNm modificado. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico modificada puede presentar una degradación reducida, en comparación con un ácido nucleico que no ha sido modificado, en una célula en la que se introduce la molécula de ácido nucleico modificada.

10 15 El término "ácido nucleico" incluye cualquier compuesto y/o sustancia que se incorpore o pueda incorporarse a una cadena de oligonucleótidos. Ejemplos de ácidos nucleicos para su uso de acuerdo con la presente descripción incluyen, entre otros, uno o más de ADN, ADNc, ARN que incluye ARN mensajero (ARNm), híbridos de los mismos, agentes inductores de ARNi, agentes de ARNi, siARN, ARNhC, miARN, ARN antisentido, ribozimas, ADN catalítico, ARN que induce la formación de triple hélice, aptámeros, vectores y similares.

20 En ciertos aspectos, es deseable degradar intracelularmente una molécula de ácido nucleico modificada introducida en la célula. Por ejemplo, sería deseable degradar una molécula de ácido nucleico modificada si se deseara una sincronización precisa de la producción de proteína. Por lo tanto, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico modificada que contiene un dominio de degradación, sobre el que se puede actuar de manera dirigida dentro de una célula.

25 En algunos aspectos, las moléculas de ácido nucleico modificadas pueden modificarse químicamente en el azúcar, la nucleobase (p. ej., en la posición 5' de la nucleobase) o el esqueleto de fosfato (p. ej., reemplazando el fosfato con otro resto como un tiofosfato). En algunos aspectos, la modificación puede dar como resultado una interrupción de una interacción principal de la pareja de unión al surco, lo que puede contribuir a una respuesta inmunitaria innata. En algunos aspectos, la composición de la formulación, cuando se administra a un sujeto, puede dar como resultado una biodisponibilidad, una ventana terapéutica o un volumen de distribución mejorados de la molécula de ácido nucleico modificada en relación con la administración de la molécula de ácido nucleico modificada sin la incorporación del agente de administración. En algunos aspectos, los nucleósidos y nucleótidos modificados de las moléculas de ácido nucleico modificadas se pueden sintetizar utilizando los compuestos protegidos con O descritos en la publicación internacional n.º WO2012138530-,

30 35 En ciertos aspectos, la molécula de ácido nucleico modificada puede comprender ARNm. En aspectos particulares, el ARNm modificado (ARNm) puede derivar de ADNc. En ciertos aspectos, el ARNm puede comprender al menos dos modificaciones de nucleósidos. En un aspecto, las modificaciones de nucleósidos se pueden seleccionar de 5'-metilcitosina y pseudouridina. En otro aspecto, al menos una de las modificaciones de nucleósidos no es 5'-metilcitosina y/o pseudouridina. En ciertos aspectos, el agente de suministro puede comprender formulaciones que permiten el suministro localizado y sistémico de ARNm. Las formulaciones de las moléculas de ácidos nucleicos modificados y/o ARNm pueden seleccionarse, entre otros, lipídicos, liposomas y nanopartículas lipídicas, nanopartículas lipídicas eliminadas rápidamente, polímeros, lipoplejos, péptidos y proteínas, al menos una modificación química y conjugación, potenciadores y/o células.

40 45 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas pueden incluir al menos dos codones de parada antes de la región 3' no traducida (UTR). El codón de parada se puede seleccionar de TGA, TAA y TAG. En un aspecto, los ácidos nucleicos incluyen el codón de parada TGA y un codón de parada adicional. En otro aspecto, el codón de parada de la adición puede ser TAA. En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas pueden comprender tres codones de parada.

50 Otros componentes de un ácido nucleico son opcionales en una molécula de ácido nucleico modificado pero estos componentes pueden ser beneficiosos.

Regiones no traducidas (UTR)

55 60 Las regiones no traducidas (UTR) de un gen se transcriben pero no se traducen. La UTR 5' comienza en el sitio de inicio de la transcripción y continúa hasta el codón de inicio pero no incluye el codón de inicio; mientras que la UTR 3' comienza inmediatamente después de un codón de parada y continúa hasta la señal de terminación de la transcripción. Cada vez hay más pruebas sobre las funciones reguladoras que desempeñan las UTR en términos de estabilidad de la molécula de ácido nucleico y traducción. Las características reguladoras de una UTR se pueden incorporar en las moléculas de ARNm modificadas para mejorar la estabilidad de la molécula. Las características específicas también se pueden incorporar para garantizar una regulación negativa controlada de la transcripción en caso de que se desvíen a sitios de órganos no deseados.

5' UTR e Iniciación a la traducción

- Las UTR 5' naturales tienen características que juegan un papel en el inicio de la traducción. Albergan firmas como las secuencias de Kozak que se sabe comúnmente que están involucradas en el proceso por el cual el ribosoma inicia la traducción de muchos genes. Las secuencias de Kozak tienen el consenso CCR(A/G)CCAUGG (SEQ ID NO: 1), donde R es una purina (adenina o guanina) tres bases aguas arriba del codón de inicio (AUG), seguida de otra 'G'. También se sabe que 5'UTR forma estructuras secundarias que están implicadas en la unión del factor de elongación.
- 5 Mediante la ingeniería de las características que normalmente se encuentran en genes abundantemente expresados de órganos diana específicos, se puede mejorar la estabilidad y la producción de proteínas de las moléculas de ARNm modificadas. Por ejemplo, la introducción de 5' UTR de ARNm expresado en el hígado, tal como albúmina, amiloide A sérico , la apolipoproteína A/B/E, la transferrina, la alfafetoproteína, la eritropoyetina o el factor VIII podrían utilizarse para potenciar la expresión de una molécula de ácido nucleico modificada, tal como un ARNm, en líneas celulares hepáticas o en el hígado. Del mismo modo, el uso de 5' UTR de otro ARNm específico de tejido para mejorar la expresión en ese tejido es posible para músculo (MyoD, Myosin, Myoglobin, Myogenin, Herculin), para células endoteliales (Tie-1, CD36), para células mieloides (C/EBP, AML1, G-CSF, GM-CSF, CD11b, MSR, Fr-1, i-NOS), para leucocitos (CD45, CD18), para tejido adiposo (CD36, GLUT4, ACRP30, adiponectina) y para pulmón células epiteliales (SP-A/B/C/D).
- 10 15 20 25 Se pueden incorporar otras secuencias no UTR en las UTR 5' (o 3' UTR) de las moléculas de ácido nucleico modificadas. Por ejemplo, se pueden incorporar intrones o porciones de secuencias de intrones en las regiones flanqueantes del ARNm modificado. La incorporación de secuencias intrónicas puede aumentar la producción de proteínas, así como los niveles de ARNm.

3' UTR y los elementos ricos de AU

- Se sabe que las UTR 3' tienen tramos de adenosinas y uridinas incrustados en ellas. Estas firmas ricas en AU son particularmente frecuentes en genes con altas tasas de recambio. En función de sus características de secuencia y propiedades funcionales, los elementos ricos en AU (ARE) se pueden separar en tres clases (Chen y col., 1995): Los ARE de clase I contienen varias copias dispersas de un motivo AUUUA dentro de las regiones ricas en U. C-Myc y MyoD contienen ARE de clase I. Los ARE de clase II poseen dos o más nonámeros superpuestos UUAUUUA(U/A)(U/A) (SEQ ID NO: 2). Las moléculas que contienen este tipo de ARE incluyen GM-CSF y TNF-a. Los AREs de clase III están menos definidos. Estas regiones ricas en U no contienen un motivo AUUUA. c-Jun y Myogenin son dos ejemplos bien estudiados de esta clase. Se sabe que la mayoría de las proteínas que se unen a los ARE desestabilizan al mensajero, mientras que se ha documentado que los miembros de la familia ELAV, sobre todo HuR, aumentan la estabilidad del ARNm. HuR se une a ARE de las tres clases. La ingeniería de los sitios de unión específicos de HuR en la UTR 3' de las moléculas de ácido nucleico conducirá a la unión de HuR y, por lo tanto, a la estabilización del mensaje in vivo.
- 30 35 40 45 50 La introducción, eliminación o modificación de los elementos ricos en AU (ARE) de 3' UTR se pueden utilizar para modular la estabilidad del ARNm modificado. Cuando se diseña un ARNm modificado específico, se pueden introducir una o más copias de un ARE para hacer que el ARNm modificado sea menos estable y, por lo tanto, restringir la traducción y disminuir la producción de la proteína resultante.
- Asimismo, los ARE pueden identificarse y eliminarse o mutarse para aumentar la estabilidad intracelular y, por lo tanto, aumentar la traducción y producción de la proteína resultante. Los experimentos de transfección se pueden realizar en líneas celulares relevantes, utilizando ARNm modificado y la producción de proteínas se puede analizar en varios puntos de tiempo posteriores a la transfección. Por ejemplo, las células se pueden transfectar con diferentes moléculas de ingeniería ARE y usando un kit ELISA para la proteína relevante y analizando la proteína producida a las 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas y 7 días después de la transfección.

Incorporación de sitios de unión de microARN

- Los microARN (o miARN) son ARN no codificantes de 19-25 nucleótidos de longitud que se unen a la UTR 3' de las moléculas de ácido nucleico y regulan a la baja la expresión génica ya sea reduciendo la estabilidad de la molécula de ácido nucleico o inhibiendo la traducción. El ARNm modificado puede comprender una o más secuencias diana de microARN, secuencias de microARN o semillas de microARN. Tales secuencias pueden corresponder a cualquier microARN conocido, tales como los que se enseñan en la publicación de EE. UU. US2005/0261218 y la publicación de EE. UU. US2005/0059005.
- Una secuencia de microARN comprende una región "semilla", es decir, una secuencia en la región de las posiciones 2-8 del microARN maduro, cuya secuencia tiene una perfecta complementariedad de Watson-Crick con la secuencia

diana de miARN. Una semilla de microARN puede comprender las posiciones 2-8 o 2-7 del microARN maduro. En algunos aspectos, una semilla de microARN puede comprender 7 nucleótidos (p. ej., los nucleótidos 2-8 del microARN maduro), donde el sitio complementario de la semilla en el objetivo de miARN correspondiente está flanqueado por una adenina (A) opuesta a la posición 1 del microARN. En algunos aspectos, una semilla de microARN puede comprender 6 nucleótidos (por ejemplo, los nucleótidos 2-7 del microARN maduro), donde el sitio complementario de la semilla en el objetivo de miARN correspondiente está flanqueado por una adenina (A) opuesta a la posición 1 del microARN. Véase, por ejemplo , Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP; Célula Mol. 6 de julio de 2007; 27 (1): 91-105. Las bases de la semilla de microARN tienen una completa complementariedad con la secuencia diana. Mediante la ingeniería de secuencias diana de microARN en la 3'UTR de ARNm modificado, se puede apuntar a la molécula para degradación o traducción reducida, siempre que el microARN en cuestión esté disponible. Este proceso reducirá el riesgo de efectos fuera del objetivo en la administración de moléculas de ácido nucleico. Se ha informado sobre la identificación de microARN, regiones diana de microARN y sus patrones de expresión y función en biología (Bonauer y col., Curr Drug Targets 2010 11:943-949; Anand and Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176; Contreras and Rao Leukemia 2012 26:404-413 (20 de diciembre de 2011. doi: 10.1038/leu.2011.356), Bartel Cell 2009 136:215-233, Landgraf y col., Cell, 2007 129:1401-1414.

Por ejemplo, si la molécula de ácido nucleico modificada es un ARNm modificado y no está destinado a ser administrado al hígado sino que termina allí, entonces miR-122, un microARN abundante en el hígado, puede inhibir la expresión del gen de interés si uno o varios sitios diana de miR-122 se modifican por ingeniería genética en la UTR 3' del ARNm modificado. La introducción de uno o múltiples sitios de unión para diferentes microARN puede diseñarse para disminuir aún más la longevidad, la estabilidad y la traducción de proteínas de una molécula de ácido nucleico modificada y/o ARNm modificado.

Como se usa en esta invención, el término "sitio de microARN" se refiere a un sitio diana de microARN o un sitio de reconocimiento de microARN, o cualquier secuencia de nucleótidos a la que se une o se asocia un microARN. Debe entenderse que la "unión" puede seguir las reglas tradicionales de hibridación de Watson-Crick o puede reflejar cualquier asociación estable del microARN con la secuencia diana en el sitio del microARN o junto al mismo.

Por el contrario, para los fines del ARNm modificado, los sitios de unión de microARN se pueden diseñar (es decir, eliminar) de secuencias en las que se encuentran de forma natural para aumentar la expresión de proteínas en tejidos específicos. Por ejemplo, los sitios de unión de miR-122 pueden eliminarse para mejorar la expresión de proteínas en el hígado. La regulación de la expresión en múltiples tejidos se puede lograr mediante la introducción o eliminación de uno o varios sitios de unión de microARN.

Los ejemplos de tejidos en los que se sabe que los microARN regulan el ARNm y, por lo tanto, la expresión de proteínas incluyen, entre otros, hígado (miR-122), músculo (miR-133, miR-206, miR-208), células endoteliales (miR -17-92, miR-126), células mieloídes (miR-142-3p, miR-142-Sp, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27), tejido adiposo (let -7, miR-30c), corazón (miR-1d, miR-149), riñón (miR-192, miR-194, miR-204) y células epiteliales de pulmón (let-7, miR-133, miR-126). El microARN también puede regular procesos biológicos complejos como la angiogénesis (miR-132) (Anand y Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176). En el ARNm modificado, pueden eliminarse o introducirse sitios de unión para los microARN que están implicados en tales procesos, para adaptar la expresión de la expresión del ARNm modificado a tipos de células biológicamente relevantes o al contexto de procesos biológicos relevantes.

Por último, a través de la comprensión de los patrones de expresión de microARN en diferentes tipos de células, el ARNm modificado puede diseñarse para una expresión más específica en tipos de células específicos o solo bajo condiciones biológicas específicas. A través de la introducción de sitios de unión de microARN específicos de tejido, podría diseñarse ARNm modificado que sería óptimo para la expresión de proteínas en un tejido o en el contexto de una condición biológica.

Los experimentos de transfección se pueden realizar en líneas celulares relevantes, utilizando ARNm modificado por ingeniería y la producción de proteínas se puede analizar en varios puntos de tiempo posteriores a la transfección. Por ejemplo, las células se pueden transfectar con diferentes ARNm modificados mediante ingeniería del sitio de unión de microARN y mediante el uso de un kit ELISA para la proteína relevante y el análisis de la proteína producida a las 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 7 días después de la transfección. Los experimentos *in vivo* también se pueden realizar utilizando moléculas diseñadas en el sitio de unión de microARN para examinar los cambios en la expresión específica de tejido del ARNm modificado formulado.

Tapa 5'

La estructura de la tapa 5' de un ARNm está involucrada en la exportación nuclear, aumentando la estabilidad del ARNm y se une a la proteína de unión a la tapa del ARNm (CBP), que es responsable de la estabilidad del ARNm en la célula y la competencia de traducción a través de la asociación de CBP con poli(A) proteína de unión para formar la especie de ARNm cíclico maduro. La tapa ayuda aún más a la eliminación de los intrones proximales 5' durante el

corte y empalme del ARNm.

- Las moléculas endógenas de ARNm pueden tener un extremo 5' rematado generando un enlace 5'-PPP-5'-trifosfato entre un residuo de tapa guanosina terminal y el nucleótido sentido transcrita en el extremo 5'-terminal de la molécula de ARNm. Esta tapa de 5'-guanilato se puede metilar luego para generar un residuo de N7-metil-guanilato. Los azúcares de ribosa de los nucleótidos transcritos terminales y/o anteterminales del extremo 5' del ARNm también pueden estar opcionalmente 2'-O-metilados. La desprotección en 5' a través de la hidrólisis y la escisión de la estructura de la tapa de guanilato puede dirigirse a una molécula de ácido nucleico, como una molécula de ARNm, para su degradación.
- Las modificaciones del ARNm modificado pueden generar una estructura de tapa no hidrolizable que evita la desprotección y, por lo tanto, aumenta la vida media del ARNm. Debido a que la hidrólisis de la estructura de tapa requiere la escisión de los enlaces fosforodiéster 5'-PPP-5', se pueden usar nucleótidos modificados durante la reacción de recubrimiento. Por ejemplo, se puede usar una Enzima de Recubrimiento de Vaccinia de New England Biolabs (Ipswich, MA) con nucleótidos de α-tio-guanosina de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear un enlace de fosforotioato en la tapa 5'-PPP-5'. Se pueden usar nucleótidos de guanosina modificados adicionales tales como nucleótidos de α-metil-fosfonato y seleno-fosfato.
- Las modificaciones adicionales incluyen, entre otras, la 2'-O-metilación de los azúcares de ribosa de los nucleótidos 5'-terminales y/o 5'-anteterminales del ARNm (como se mencionó anteriormente) en el grupo 2'-hidroxilo del anillo de azúcar. Se pueden usar múltiples estructuras distintas de tapa en 5' para generar la tapa en 5' de una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ARNm.
- Los análogos de tapa, que en esta invención también se denominan análogos de tapa sintéticos, tapas químicas, análogos de tapa química o análogos de tapa estructural o funcional, difieren de las tapas 5' naturales (es decir, endógenas, de tipo salvaje o fisiológicas) en su estructura química, manteniendo la función de tapa. Los análogos de tapa pueden sintetizarse químicamente (es decir, no enzimáticamente) o enzimáticamente y/o unirse a una molécula de ácido nucleico.
- Por ejemplo, la tapa análoga anti-reverso (ARCA) contiene dos guaninas unidas por un grupo 5'-5'-trifosfato, donde una guanina contiene un grupo metilo N7 así como un grupo 3'-O-metilo (es decir, N7,3'-O-dimetil-guanosina-5'-trifosfato-5'-guanosina (m7G-3'mppp-G; que puede designarse de manera equivalente como 3' O-Me-m7G(5')PPP(5')G). El átomo 3'-O de la otra guanina, no modificada, se une al nucleótido 5'-terminal de la molécula de ácido nucleico recubierta (por ejemplo, un ARNm o ARNm). La guanina N7- y 3'-O-metilada proporciona el resto terminal de la molécula de ácido nucleico recubierta (por ejemplo, ARNm o ARNm).
- Otra tapa ejemplar es mCAP, que es similar a ARCA pero tiene un grupo 2'-O-metilo en la guanosina (es decir, N7,2'-O-dimetil-guanosina-5'-trifosfato-5'-guanosina, m7Gm-PPP-G).
- Mientras que los análogos de tapa permiten la tapa concomitante de una molécula de ácido nucleico en una reacción de transcripción in vitro, hasta el 20 % de los transcritos pueden permanecer sin tapa. Esto, así como las diferencias estructurales de un análogo de tapa de una estructura de tapa 5' endógena de ácidos nucleicos producidos por la maquinaria de transcripción celular endógena, puede conducir a una capacidad de traducción reducida y una estabilidad celular reducida.
- El ARNm modificado también se puede recubrir después de la transcripción, usando enzimas, para generar estructuras de tapa 5' más auténticas. Como se usa en esta invención, la frase "más auténtica" se refiere a una característica que refleja o imita de cerca, ya sea estructural o funcionalmente, una característica endógena o de tipo salvaje. Es decir, una característica "más auténtica" es mejor representativa de una función y/o estructura celular endógena, de tipo salvaje, natural o fisiológica en comparación con características sintéticas o análogos, etc., del estado de la técnica, o que supera la correspondiente característica endógena, de tipo salvaje, natural o fisiológica en uno o más respectos. Ejemplos no limitantes de estructuras de tapa en 5' más auténticas son aquellas que, entre otras cosas, tienen unión mejorada de proteínas de unión a tapa, vida media aumentada, susceptibilidad reducida a las endonucleasas 5' y/o decapado en 5' reducido, en comparación con las estructuras de tapa 5' sintéticas conocidas en la técnica (o a una estructura de tapa en 5' de tipo salvaje, natural o fisiológica). Por ejemplo, la Enzima de Recubrimiento del Virus Vaccinia recombinante y la enzima 2'-O-metiltransferasa recombinante pueden crear un enlace canónico 5'-5'-trifosfato entre el nucleótido 5'-terminal de un ARNm y un nucleótido de la tapa de guanina en el que la guanina de la tapa contiene una metilación N7 y el nucleótido 5'-terminal del ARNm contiene un 2'-O-metilo. Tal estructura se denomina estructura Cap1. Esta tapa da como resultado una mayor competencia traduccional y estabilidad celular y una activación reducida de citocinas proinflamatorias celulares, en comparación, por ejemplo, con otras estructuras análogas de tapa 5' conocidas en la técnica. Las estructuras de tapa incluyen, entre otras, 7mG(5')PPP(5')N,pN2p (cap 0), 7mG(5')PPP(5')NlmpNp (cap 1), y 7mG(5')-PPP(5')NlmpN2mp (cap 2).

Debido a que el ARNm modificado se puede recubrir después de la transcripción, y debido a que este proceso es más eficiente, casi el 100 % del ARNm modificado se puede recubrir. Esto contrasta con ~80 % cuando un análogo de tapa se une a un ARNm en el curso de una reacción de transcripción *in vitro*.

- 5 Las tapas terminales de 5' pueden incluir tapas endógenas o análogos de tapas. Una tapa terminal 5' puede comprender un análogo de guanina. Los análogos de guanina útiles incluyen, entre otros, inosina, N1-metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2'-azido-guanosina.

Secuencias Virales

- 10 Se pueden diseñar e insertar secuencias virales adicionales tales como, entre otras, la secuencia potenciadora de la traducción del virus del enanismo amarillo de la cebada (BYDV-PAV) en la UTR 3' del ARNm modificado y pueden estimular la traducción del ARNm *in vitro*. *e in vivo*. Los experimentos de transfección se pueden realizar en líneas celulares relevantes y la producción de proteínas se puede analizar mediante ELISA a las 12 horas, 24 horas, 48 15 horas, 72 horas y el día 7 después de la transfección.

Secuencias IRES

- 20 Además, se proporciona ARNm modificado que puede contener un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). Identificado por primera vez como una característica del ARN del virus Picorna, IRES juega un papel importante en el inicio de la síntesis de proteínas en ausencia de la estructura de tapa 5'. Un IRES puede actuar como el único sitio de unión al ribosoma, o puede servir como uno de los múltiples sitios de unión a ribosomas de un ARNm. El ARNm modificado que contiene más de un sitio de unión al ribosoma funcional puede codificar varios péptidos o polipéptidos que los ribosomas traducen de forma independiente ("moléculas de ácido nucleico multicistrónico"). Cuando el ARNm 25 modificado se proporciona con un IRES, adicionalmente se proporciona opcionalmente una descripción de la segunda región traducible. Los ejemplos de secuencias IRES que pueden usarse de acuerdo con la descripción incluyen, sin limitación, aquellas de picornavirus (por ejemplo, FMDV), virus de plagas (CFFV), virus de la poliomielitis (PV), virus de la encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

Colas Poli-A

- 35 Durante el procesamiento del ARN, se puede agregar una cadena larga de nucleótidos de adenina (cola poli-A) a una molécula de ácido nucleico modificada, tales como moléculas de ARNm modificadas, para aumentar la estabilidad. Inmediatamente después de la transcripción, el extremo 3' del transcrito puede escindirse para liberar un hidroxilo 3'. A continuación, la poli-A polimerasa agrega una cadena de nucleótidos de adenina al ARN. El proceso, llamado poliadenilación, agrega una cola poli-A que puede tener entre, por ejemplo, aproximadamente 100 y 250 residuos de largo.

- 40 Se ha descubierto que las longitudes de cola de poli-A únicas proporcionan ciertas ventajas al ARNm modificado.

- 45 Generalmente, la longitud de una cola poli-A es mayor que 30 nucleótidos de longitud. En otro aspecto, la cola poli-A tiene más de 35 nucleótidos de longitud (por ejemplo, al menos o más de aproximadamente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.500 y 3.000 nucleótidos). En algunos aspectos, el ARNm modificado incluye de aproximadamente 30 a aproximadamente 3.000 nucleótidos (por ejemplo, de 30 a 50, de 30 a 100, de 30 a 250, de 30 a 500, de 30 a 750, de 30 a 1.000, de 30 a 1.500, de 30 a 2.000, de 30 a 2.500, de 50 a 100, de 50 a 250, de 50 a 500, de 50 a 750, de 50 a 1.000, de 50 a 1.500, de 50 a 2.000, de 50 a 2.500, de 50 a 3.000, de 100 a 500, de 100 a 750, de 100 a 1.000, de 100 a 1.500, de 100 a 2.000, de 100 a 2.500, de 100 a 3.000, de 500 a 750, de 500 a 1.000, de 500 a 1.500, de 500 a 2.000, de 500 a 2.500, de 500 a 3.000, de 1.000 a 1.500, de 1.000 a 2.000, de 1.000 a 2.500, de 1.000 a 3.000, de 1.500 a 2.000, de 1.500 a 2.500, de 1.500 a 3.000, de 2.000 a 3.000, de 2.000 a 2.500 y de 2.500 a 3.000).

- 55 En un aspecto, la cola poli-A está diseñada en relación con la longitud del ARNm modificado global. Este diseño puede basarse en la longitud de la región de codificación, la longitud de una característica o región particular (como las regiones flanqueantes) o en la longitud del producto final expresado a partir del ARNm modificado.

- 60 En este contexto, la cola poli-A puede tener una longitud del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % mayor que el ARNm modificado, la región o característica del mismo. La cola poli-A también puede diseñarse como una fracción de ARNm modificado al que pertenece. En este contexto, la cola poli-A puede ser del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % o más de la longitud total de la molécula o la longitud total de la molécula menos la cola poli-A. Además, los sitios

de unión diseñados y la conjugación de ARNm modificado para la proteína de unión a poli-A pueden mejorar la expresión.

Además, se pueden unir varios ARNm modificados distintos a la PABP (proteína de unión a poli-A) a través del extremo 5' utilizando nucleótidos modificados en el extremo 3' de la cola poli-A. Los experimentos de transfección se pueden realizar en líneas celulares relevantes y la producción de proteínas se puede analizar mediante ELISA a las 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y el día 7 después de la transfección.

En un aspecto, el ARNm modificado está diseñado para incluir un cuarteto poliA-G. El cuarteto G es una matriz cíclica de cuatro nucleótidos de guanina con enlaces de hidrógeno que pueden formarse mediante secuencias ricas en G tanto en el ADN como en el ARN. En este aspecto, el cuarteto G se incorpora al final de la cola poli-A. La molécula de ARNm resultante se analiza en cuanto a estabilidad, producción de proteínas y otros parámetros, incluida la vida media en varios puntos de tiempo. Se ha descubierto que el cuarteto de poliA-G da como resultado una producción de proteína equivalente al menos al 75 % de la observada usando una cola poli-A de 120 nucleótidos solo.

15

Modificaciones

Los ácidos nucleicos modificados y el ARNm modificado (ARNm) pueden contener una, dos o más modificaciones diferentes. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados y el ARNm pueden contener una, dos o más 20 modificaciones de nucleósidos o nucleótidos diferentes. En algunos aspectos, un ácido nucleico modificado o ARNm (por ejemplo, que tiene una o más moléculas de ARNm) introducido en una célula puede presentar una degradación reducida en la célula, en comparación con un ácido nucleico o ARNm no modificado.

Los ácidos nucleicos modificados y el ARNm pueden incluir cualquier modificación útil, tal como en el azúcar, la nucleobase (por ejemplo, una o más modificaciones de una nucleobase, y donde las modificaciones químicas pueden incluir tales como reemplazar o sustituir un átomo de una nucleobase de pirimidina con amino opcionalmente sustituido, tiol opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido (p. ej., metilo o etilo) o halo (p. ej., cloro o flúor o el enlace internucleósido (p. ej., una o más modificaciones en el esqueleto fosfodiéster). En ciertos aspectos, las modificaciones están presentes tanto en el azúcar como en el enlace internucleósido (p. ej., una o más modificaciones, tales como las presentes en los ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos treosa (TNA), ácidos nucleicos de glicol (GNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o híbridos de los mismos). En esta invención se describen modificaciones adicionales.

Como se describe en esta invención, los ácidos nucleicos modificados y el ARNm no inducen sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el ARNm. En ciertos aspectos, puede ser deseable degradar intracelularmente una molécula de ácido nucleico modificada o una molécula de ácido nucleico modificada introducida en la célula. Por ejemplo, la degradación de una molécula de ácido nucleico modificado o ARNm modificado puede ser preferible si se desea una sincronización precisa de los aspectos de producción de proteínas, proporcionados en esta invención. Por lo tanto, en algunos aspectos, en esta invención se proporciona una molécula 40 de ácido nucleico modificada que contiene un dominio de degradación, sobre el que se puede actuar de manera dirigida dentro de una célula. En otro aspecto, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos que comprenden un nucleósido o nucleótido que puede alterar la unión de un surco principal que interactúa, p. ej., uniendo, el socio con el ácido polinucleótido nucleico (p. ej., donde el nucleótido modificado ha disminuido la afinidad de unión con el socio de interacción del surco principal, en comparación con un nucleótido no modificado).

45

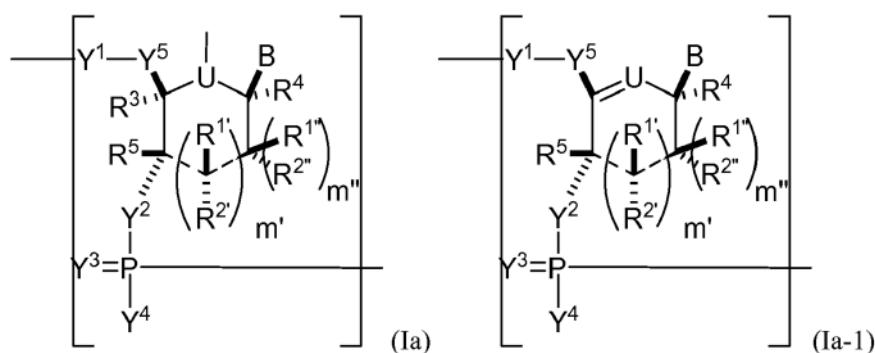
El ácido nucleico modificado y el ARNm pueden incluir opcionalmente otros agentes (p. ej., agentes inductores de ARNi, agentes de ARNi, siARN, shARN, miARN, ARN antisentido, ribozimas, ADN catalítico, ARNt, ARN que induce la formación de triple hélice, aptámeros, vectores, etc.). En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm pueden incluir uno o más ARN mensajero (ARNm) y uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados (por ejemplo, moléculas de ARNm). A continuación se detallan los detalles de estos ácidos nucleicos modificados y ARNm.

Ácidos nucleicos modificados

Los ácidos nucleicos modificados o ARNm pueden incluir una primera región de nucleósidos enlazados que codifican un polipéptido de interés, una primera región flanqueante ubicada en el extremo 5' de la primera región y una segunda región flanqueante ubicada en el extremo 3' de la primera región.

En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen varios nucleósidos enlazados que tienen la fórmula (Ia) o la fórmula (Ia-1):

60



o una de sus sales o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables, en los que

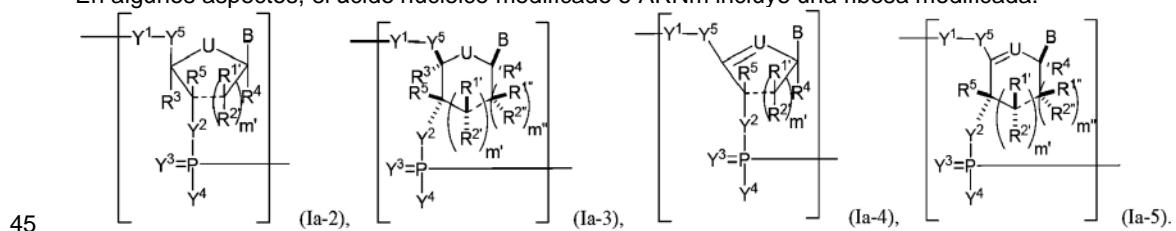
- 5 U es O, S, N(R^U)_{nu} o C(R^U)_{nu}, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada RU es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido;
--- es un enlace simple o está ausente;

10 cada uno de R^1 , R^2 , $R^{1''}$, $R^{2''}$, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 , si están presentes, es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido o están ausentes; donde la combinación de R^3 con uno o más de R^1 , $R^{1''}$, $R^{2''}$, R^2 o R^5 (por ejemplo, la combinación de R^1 y R^3 , la combinación de $R^{1''}$ y R^3 , la combinación de $R^{2''}$ y R^3 , la combinación de R^2 y R^3 o la combinación de R^5 y R^3) pueden unirse para formar alqueno opcionalmente sustituido o heteroalqueno opcionalmente sustituido y, tomado junto con los carbonos a los que se encuentran unidos, proporcionar un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico); donde la combinación de R^5 con uno o más de R^1 , $R^{1''}$, $R^{2''}$ o R^2 (por ejemplo, la combinación de R^1 y R^5 , la combinación de $R^{1''}$ y R^5 , la combinación de $R^{2''}$ y R^5 , o la combinación de R^2 y R^5) pueden unirse para formar alqueno opcionalmente sustituido o heteroalqueno opcionalmente sustituido y, tomado junto con los carbonos a los que se encuentran unidos, proporcionar un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico); y donde la combinación de R^4 y uno o más de R^1 , $R^{1''}$, $R^{2''}$, R^2 , R^3 o R^5 puede unirse para formar alqueno opcionalmente sustituido o heteroalqueno opcionalmente sustituido y, tomado junto con los carbonos a los que se encuentran unidos, proporcionar un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico); cada uno de m' y m'' es, independientemente, un entero de 0 a 3 (por ejemplo, de 0 a 2, de 0 a 1, de 1 a 3 o de 1 a 2); cada uno de Y^1 , Y^2 y Y^3 es, independientemente, O, S, Se, -NR^{N1}-, alqueno opcionalmente sustituido o heteroalqueno opcionalmente sustituido, donde R^N1 es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o ausente;

20 cada Y^4 es, independientemente, H, hidroxi, tiol, boranilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido; cada Y^5 es, independientemente, O, S, Se, alqueno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalqueno opcionalmente sustituido; n es un entero de 1 a 100.000; y

25 B es una nucleobase (por ejemplo, una purina, una pirimidina o derivados de estas), donde la combinación de B y R^1 , la combinación de B y $R^{1''}$, la combinación de B y $R^{1''''}$ o la combinación de B y $R^{2''}$ pueden, tomados junto con los carbonos a los que se encuentran unidos, formar opcionalmente un grupo bicíclico (por ejemplo, un heterociclico bicíclico) o donde la combinación de B, $R^{1''}$ y R^3 o la combinación de B, $R^{2''}$ y R^3 pueden formar opcionalmente un grupo tricíclico o tetracíclico (por ejemplo, un heterociclico tricíclico o tetracíclico, tal como en la Fórmula (Ilo)-(IIP) en esta invención).

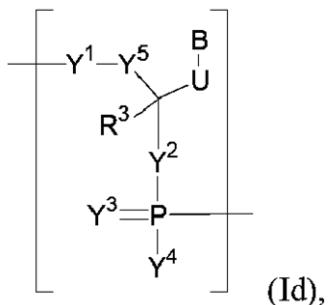
En algunos aspectos, el ácido nucleico modificado o ARNm incluye una ribosa modificada.



- 5 cada uno de R^{b1} , R^{b2} , R^{b3} , R^3 y R^5 es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido;
- 10 cada uno de Y^1 , Y^2 e Y^3 es, independientemente, O, S, Se, $-NR^{N1}-$, alquieno opcionalmente sustituido o heteroalquieno opcionalmente sustituido, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido;
- 15 cada Y^4 es, independientemente, H, hidroxi, tiol, boranilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;
- 20 cada Y^5 es, independientemente, O, S, Se, alquieno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalquieno opcionalmente sustituido;
- 25 n es un entero de 1 a 100.000; y
donde el anillo que incluye U puede incluir uno o más enlaces dobles.

En aspectos particulares, el anillo que incluye U no tiene un enlace doble entre $U-CB^3R^{b3}$ o entre $CB^3R^{b3}-C^{B2}R^{b2}$.

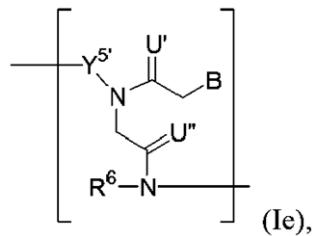
- 20 En algunos aspectos, el ácido nucleico modificado o el ARNm incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (Id):



- 25 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde

- U es O, S, $N(R^U)_{nu}$ o $C(R^U)_{nu}$, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido;
- 30 cada R^3 es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido;
- 35 cada uno de Y^1 , Y^2 e Y^3 es, independientemente, O, S, Se, $-NR^{N1}-$, alquieno opcionalmente sustituido o heteroalquieno opcionalmente sustituido, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido;
- 40 cada Y^4 es, independientemente, H, hidroxi, tiol, boranilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;
- 45 cada Y^5 es, independientemente, O, S, alquieno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalquieno opcionalmente sustituido;
- n es un entero de 1 a 100.000; y
B es una nucleobase (por ejemplo, una purina, una pirimidina o derivados de estas).

En algunos aspectos, las moléculas de ácido nucleico modificado o ARNm modificado incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (le):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

- 5 cada uno de U' y U'' es, independientemente, O, S, N(R^u)_{nu} o C(R^u)_{nu}, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^u es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido;

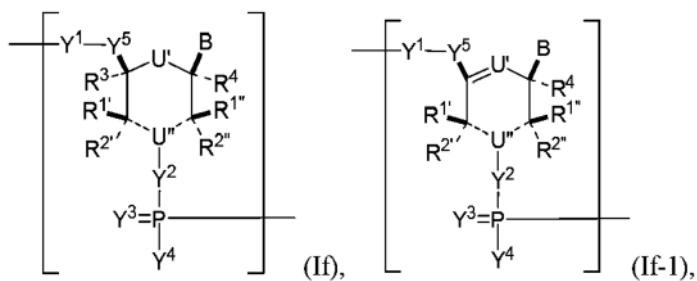
10 cada R⁶ es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido;

15 cada Y^{5'} es, independientemente, O, S, alquileno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno o etileno) o heteroalquileno opcionalmente sustituido;

n es un entero de 1 a 100.000; y

B es una nucleobase (por ejemplo, una purina, una pirimidina o derivados de estas).

En algunos aspectos, el ácido nucleico modificado o ARNm incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (If) o (If-1):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

- | | |
|----|--|
| 25 | cada uno de U' y U" es, independientemente, O, S, N, N(R ^u) _{nu} o C(R ^u) _{nu} , donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R ^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, U' es O y U" es N); --- es un enlace sencillo o ausente; |
| 30 | cada uno de R ¹ , R ² , R ¹ ', R ² ', R ³ y R ⁴ es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido o ausente; y donde la combinación de R ¹ y R ³ , la combinación de R ¹ ' y R ³ , la combinación de R ² ' y R ³ , o la combinación de R ² y R ³ se pueden tomar juntos para formar alquieno opcionalmente sustituido o heteroalquieno opcionalmente sustituido (por ejemplo, para producir un ácido nucleico bloqueado); cada uno de m' y m" es, independientemente, un entero de 0 a 3 (por ejemplo, de 0 a 2, de 0 a 1, de 1 a 3, o de 1 a 2); |
| 35 | cada uno de Y ¹ , Y ² e Y ³ es, independientemente, O, S, Se, -NR ^{N1} -, alquieno opcionalmente sustituido o heteroalquieno opcionalmente sustituido, donde R ^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o ausente; |
| 40 | cada Y ⁴ es, independientemente, H, hidroxi, tiol, boranilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido; |
| 45 | cada Y ⁵ es, independientemente, O, S, Se, alquieno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalquieno opcionalmente sustituido;
n es un entero de 1 a 100.000; y
B es una nucleobase (por ejemplo, una purina, una pirimidina o derivados de estas). |

En algunos aspectos del ácido nucleico modificado o ARNm (por ejemplo, (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVl), y (IXa)-(IXr)), el anillo que incluye U tiene uno o dos enlaces dobles.

- 5 En algunos aspectos del ácido nucleico modificado o ARNm (por ejemplo, Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), cada uno de R¹, R^{1'}, y R^{1''}, si está presente, es H. En aspectos adicionales, cada uno de R², R^{2'}, y R^{2''}, si está presente, es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxi, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi), o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, alcoxialcoxi es - (CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4 de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀). En algunos aspectos, s2 es 0, s1 es 1 o 2, s3 es 0 o 1 y R' es alquilo C₁₋₆.

10 En algunos aspectos del ácido nucleico modificado o ARNmm (por ejemplo, Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), cada uno de R², R^{2'}, y R^{2''}, si está presente, es H. En aspectos adicionales, cada uno de R¹, R^{1'}, y R^{1''}, si está presente, es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxi, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi), o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, alcoxialcoxi es - (CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀). En algunos aspectos, s2 es 0, s1 es 1 o 2, s3 es 0 o 1 y R' es alquilo C₁₋₆.

15 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), cada uno de R³, R⁴, y R⁵ es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi), o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, R³ es H, R⁴ es H, R⁵ es H o R³, R⁴ y R⁵ son todos H. En aspectos particulares, R³ es alquilo C₁₋₆ R⁴ es alquilo C₁₋₆, R⁵ es alquilo C₁₋₆ o R³, R⁴ y R⁵ son todos alquilo C₁₋₆. En aspectos particulares, R³ y R⁴ son ambos H y R⁵ es alquilo C₁₋₆.

20 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), R³ y R⁵ se unen para formar alquieno opcionalmente sustituido o heteroalquieno opcionalmente sustituido y, junto con los carbonos a los que se unen, proporcionan un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico, tal como análogos trans-3',4', donde R³ y R⁵ se unen para formar heteroalquieno (por ejemplo, -(CH₂)_{b1}O(CH₂)_{b2}O(CH₂)_{b3}-, donde cada uno de b1, b2, b3 y b3 son independientemente un entero, 0 a 3).

25 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), R³ y uno o más de R¹, R^{1'}, R², R^{2'}, o R⁵ se unen para formar alquieno opcionalmente sustituido o heteroalquieno opcionalmente sustituido y, tomados juntos con los carbonos a los que se unen, proporcionan un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico, R³ y uno o más de R¹, R^{1'}, R², R^{2'}, o R⁵ se unen para formar heteroalquieno (por ejemplo, -(CH₂)_{b1}O(CH₂)_{b2}O(CH₂)_{b3}-, donde b1, b2 y b3 son, independientemente, un entero de 0 a 3).

30 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), R⁵ y uno o más de R¹, R^{1'}, R², R^{2'}, o R^{2''} se unen para formar alquieno opcionalmente sustituido o heteroalquieno opcionalmente sustituido y, tomados juntos con los carbonos a los que se unen, proporcionan un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico, R⁵ y uno o más de R¹, R^{1'}, R², R^{2'}, o R^{2''} se unen para formar heteroalquieno (por ejemplo, -(CH₂)_{b1}O(CH₂)_{b2}O(CH₂)_{b3}-, donde b1, b2 y b3 son, independientemente, un entero de 0 a 3).

35 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), R⁵ y uno o más de R¹, R^{1'}, R², R^{2'}, o R^{2''} se unen para formar alquieno opcionalmente sustituido o heteroalquieno opcionalmente sustituido y, tomados juntos con los carbonos a los que se encuentran unidos, proporcionan un heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclico bicíclico, tricíclico o tetracíclico, R⁵ y uno o más de R¹, R^{1'}, R², R^{2'}, o R^{2''} se unen para formar heteroalquieno (por ejemplo, -(CH₂)_{b1}O(CH₂)_{b2}O(CH₂)_{b3}-, donde cada uno de b1, b2 y b3 es, independientemente, un entero de 0 a 3).

40 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), Y² es, independientemente, O, S, o -NR^{N1}-, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, Y² es NR^{N1}-, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo).

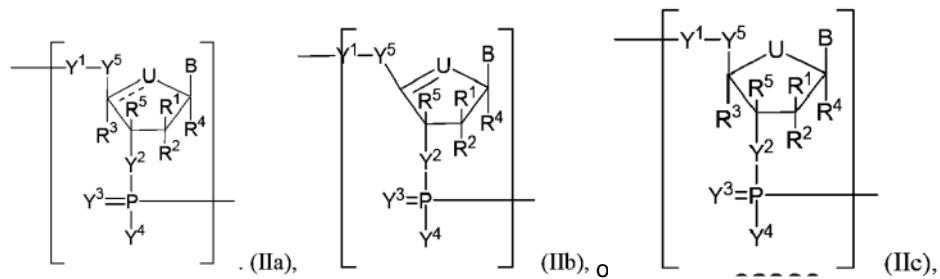
45 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), cada Y² es, independientemente, O, S, o -NR^{N1}-, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, -(CH₂)_{b1}O(CH₂)_{b2}O(CH₂)_{b3}-, donde cada uno de b1, b2 y b3 es, independientemente, un entero de 0 a 3).

50 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), cada Y³ es, independientemente, O o S.

55 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), R¹ es H; cada R² es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxi, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi)

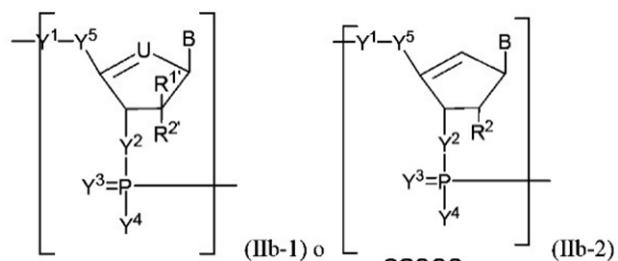
60 En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNmm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIP), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), R¹ es H; cada R² es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxi, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi)

- o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, donde $s1$ es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de $s2$ y $s3$, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, tal como donde $s2$ es 0, $s1$ es 1 o 2, $s3$ es 0 o 1, y R' es alquilo C₁₋₆); cada Y² es, independientemente, O o -NR^{N1}-, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo)); y cada Y³ es, independientemente, O o S (por ejemplo, S). En aspectos adicionales, R³ es H, halo (p. ej., fluoro), hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido (p. ej., metoxi o etoxi) o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aun otros aspectos, cada Y¹ es, independientemente, O o -NR^{N1}-, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo)); y cada Y⁴ es, independientemente, H, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido.
- En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), cada R¹ es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxi, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi) o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, tal como donde s2 es 0, s1 es 1 o 2, s3 es 0 o 1, y R' es alquilo C₁₋₆); R² es H; cada Y² es, independientemente, O o -NR^{N1}-, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo)); y cada Y³ es, independientemente, O o S (por ejemplo, S). En aspectos adicionales, R³ es H, halo (p. ej., fluoro), hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido (p. ej., metoxi o etoxi) o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aun otros aspectos, cada Y¹ es, independientemente, O o -NR^{N1}-, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo)); y cada Y⁴ es, independientemente, H, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido.
- En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), el anillo que incluye U está en la configuración β-D (por ejemplo, β-D-ribo).
- En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), el anillo que incluye U está en la configuración α-L (por ejemplo, α-L-ribo).
- En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), uno o más B no es pseudouridina (ψ) o 5-metil-citidina (m^5C). En algunos aspectos, aproximadamente del 10 % a aproximadamente el 100 % de la cantidad n de n nucleobases B no es ψ ni m^5C (por ejemplo, del 10 % al 20 %, del 10 % al 35 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 75 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 10 % al 98 %, del 10 % al 99 %, del 20 % al 35 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 75 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %, del 20 % al 98 %, del 20 % al 99 %, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 75 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 95 %, del 50 % al 98 %, del 50 % al 99 %, del 50 % al 100 %, del 75 % al 90 %, del 75 % al 95 %, del 75 % al 98 %, del 75 % al 99 % y del 75 % al 100 % de la cantidad n de B no es ψ ni m^5C). En algunos aspectos, B no es ψ ni m^5C .
- En algunos aspectos de los ácidos nucleicos modificados o ARNm (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(If-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr)), cuando B es una nucleobase no modificada seleccionada de citosina, guanina, uracilo y adenina, entonces al menos uno de Y¹, Y², o Y³ no es O.
- En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen una ribosa modificada. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIa)-(IIc):



- o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo. En aspectos particulares, U es O o C(R^U)_{nu}, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, U es —CH₂— o —CH—). En otros aspectos, cada uno de R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido o ausente (por ejemplo, cada R¹ y R² es, independientemente, H, halo, hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido; cada R³ y R⁴ es, independientemente, H u alquilo opcionalmente sustituido; y R⁵ es H o hidroxi), y — es un enlace sencillo o enlace doble.

En aspectos particulares, el ácido nucleico modificado o ARNm incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIb-1)-(IIb-2):

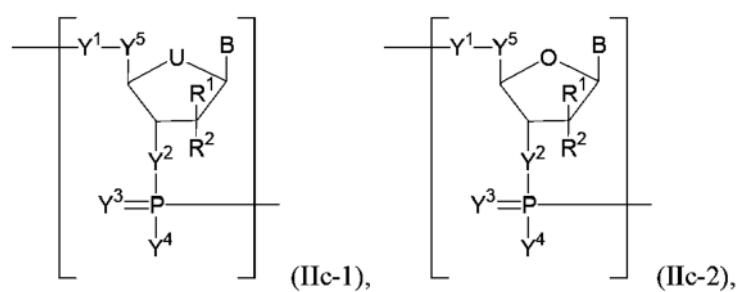


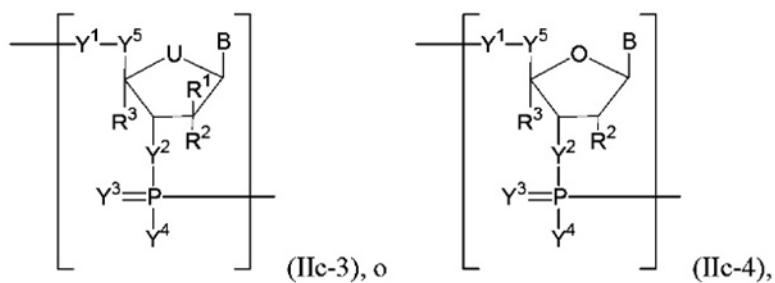
- 20 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo. En algunos aspectos, U es O o C(R^U)_n, donde n es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, U es —CH₂— o —CH—). En otros aspectos, cada uno de R¹ y R² es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido o ausente (por ejemplo, cada R¹ y R² es, independientemente, H, halo, hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, por ejemplo, H, halo, hidroxi, alquilo o alcoxi). En aspectos particulares, R es hidroxi o alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi, etoxi o cualquiera descrito en esta invención).

25

30 En aspectos particulares, el ácido nucleico modificado o ARNm incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIc-1)-(IIc-4):

30 En aspectos particulares, el ácido nucleico modificado o ARNm incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIc-1)-(IIc-4):

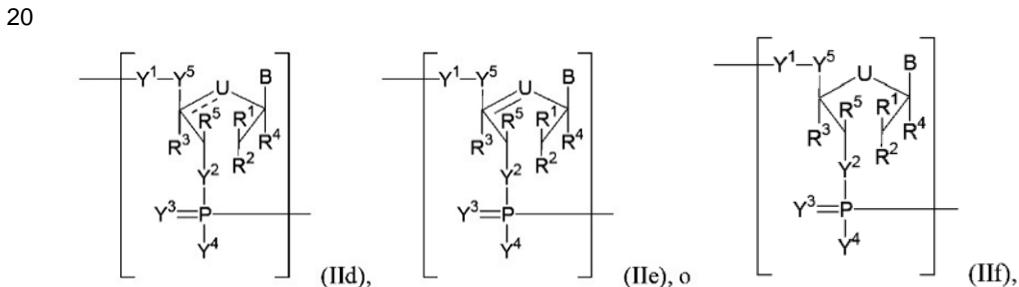




o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo. En algunos aspectos, U es O o C(R^U)_{nu}, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, U es —CH₂— o —CH—). En algunos aspectos, cada uno de R¹, R² y R³ es, independientemente, H, halo, hidroxi, tio, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido o ausente (por ejemplo, cada R¹ y R² es, independientemente, H, halo, hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido u alcoxi opcionalmente sustituido, por ejemplo, H, halo, hidroxi, alquilo o alcoxi; y cada R³ es, independientemente, H o alquilo opcionalmente sustituido). En casos particulares, R² es alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi, o cualquiera descrito en esta invención). En aspectos particulares, R¹ es alquilo opcionalmente sustituido, y R² es hidroxi. En otras realizaciones, R¹ es hidroxi, y R² es alquilo opcionalmente sustituido.

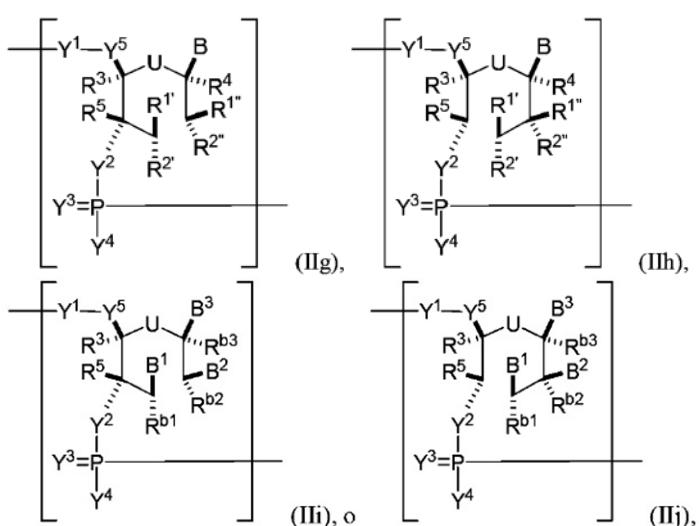
En aspectos adicionales, R³ es alquilo opcionalmente sustituido.

En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen una ribosa modificada acíclica. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IId)-(IIf):



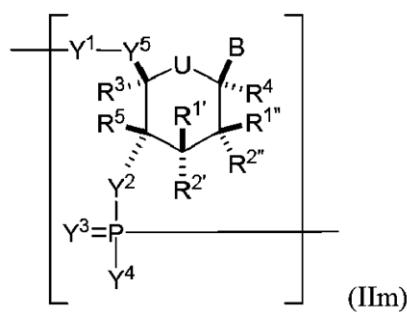
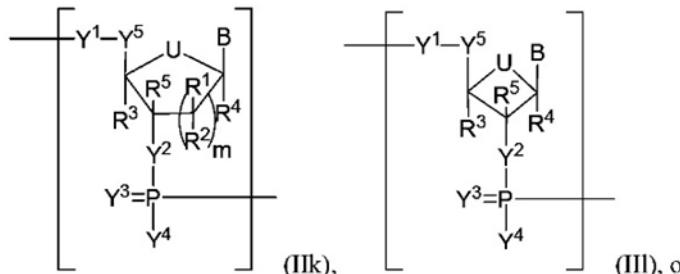
o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

25 En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen un hexitol modificado acíclico. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIg)-(IIj):

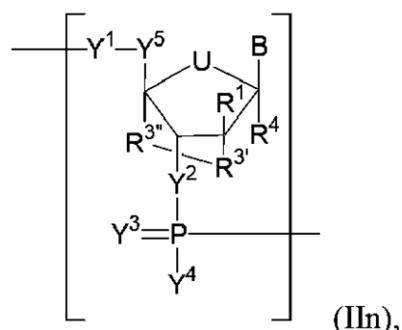


o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

- 5 En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen un resto de azúcar que tiene un anillo de ribosa contraído o expandido. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIk)-(IIl):

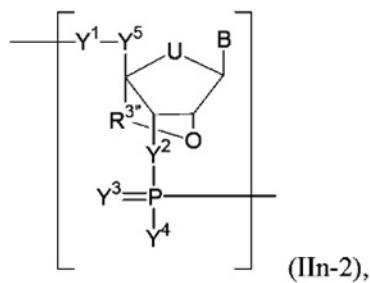
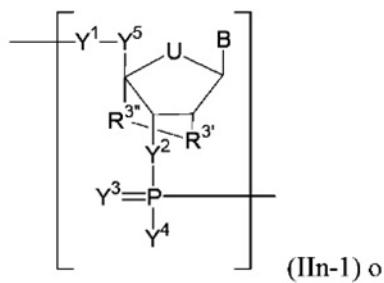


- 10 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada uno de R^{1'}, R^{1''}, R^{2'} y R^{2''} es, independientemente, H, halo, hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o ausente; y donde la combinación de R^{2'} y R³ o la combinación de R^{2''} y R³ se pueden tomar juntos para formar alquíleno opcionalmente sustituido o heteroalquíleno opcionalmente sustituido.
- 15 En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen una ribosa modificada bloqueada. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIIn):



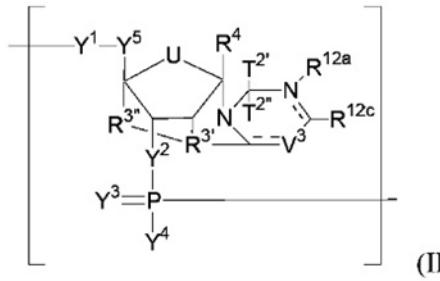
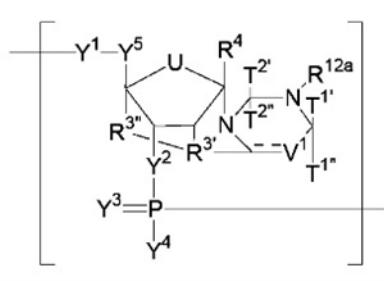
- 20 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde R^{3'} es O, S, o -NR^{N1}-, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido y R^{3''} es alquíleno opcionalmente sustituido (por ejemplo, -CH₂-, -CH₂CH₂- o -CH₂CH₂CH₂-) o heteroalquíleno opcionalmente sustituido (por ejemplo, -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂OCH₂-, o -CH₂CH₂OCH₂-) (por ejemplo, R^{3'} es O y R^{3''} es alquíleno opcionalmente sustituido (por ejemplo,-CH₂-, -CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂-)).

- 25 30 En algunos aspectos, el ácido nucleico modificado o ARNm incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIIn-1)-(II-n2):



o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde $R^{3''}$ es O, S, o $-NR^{N1}-$, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido y $R^{3''}$ es alquíleno opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, o $-CH_2CH_2CH_2-$) o heteroalquíleno opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2OCH_2-$, o $-CH_2CH_2OCH_2-$) (por ejemplo, $R^{3''}$ es O y $R^{3''}$ es alquíleno opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, o $-CH_2CH_2CH_2-$)).

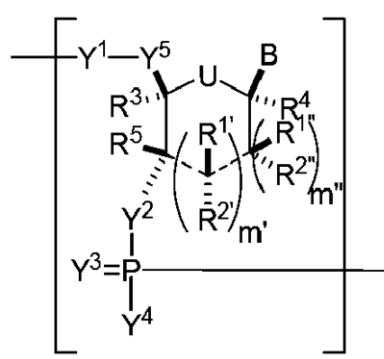
5 En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen una ribosa modificada bloqueada que
10 forma un heterociclo tetracíclico. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (Ilo):



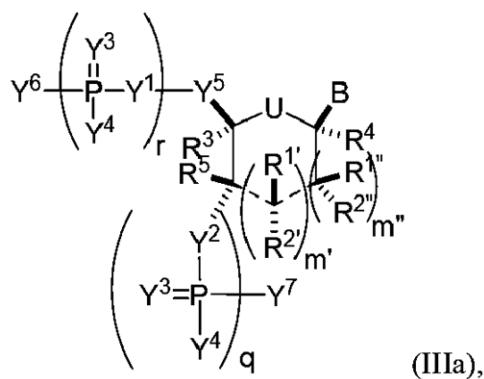
15 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde R^{12a} , R^{12c} , T^1 , $T^{1''}$, $T^{2''}$, V^1 y V^3 son como se describe en esta invención.

Cualquiera de las fórmulas para los ácidos nucleicos modificados o ARNm puede incluir una o más nucleobases descritas en esta invención (por ejemplo, Fórmulas (b1)-(b43)).

20 En un aspecto, en esta invención se proporcionan procedimientos para preparar ácidos nucleicos modificados o ARNm que comprenden al menos un nucleótido (por ejemplo, molécula de ARNm), donde el ácido nucleico modificado comprende n número de nucleósidos que tienen Fórmula (Ia), tal como se define en esta invención:

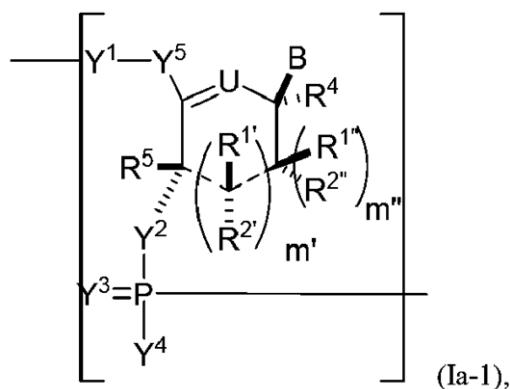


25 el procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa), tal como se define en esta invención:

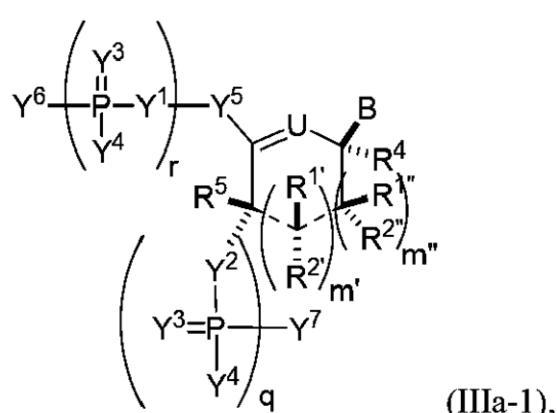


con una polimerasa de ARN y una plantilla de ADNc.

- 5 En un aspecto adicional, se proporcionan en esta invención procedimientos para amplificar ácidos nucleicos modificados o ARNm que comprenden al menos un nucleótido (por ejemplo, molécula de ARNm), donde el procedimiento comprende: hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa), como se define en esta invención, con un cebador, una plantilla de ADNc y una polimerasa de ARN.
- 10 En un aspecto, se proporcionan en esta invención procedimientos para preparar ácidos nucleicos modificados o ARNm que comprenden al menos un nucleótido (por ejemplo, molécula de ARNm), donde el ácido nucleico modificado comprende n número de nucleósidos que tienen la Fórmula (Ia-1), tal como se define en esta invención:



- 15 el procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa-1), tal como se define en esta invención:

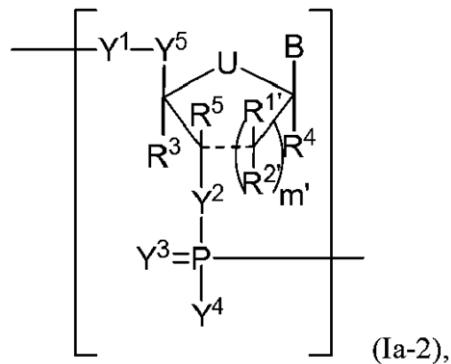


- 20 con una polimerasa de ARN y una plantilla de ADNc.

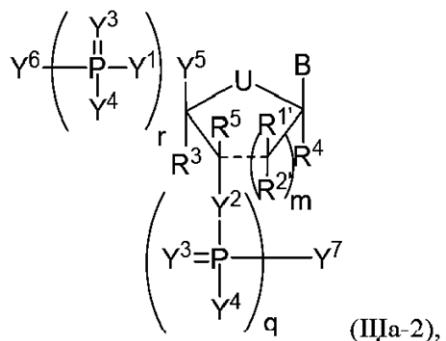
En un aspecto adicional, se proporcionan en esta invención procedimientos para amplificar ácidos nucleicos modificados o ARNm que comprende al menos un nucleótido (por ejemplo, molécula de ARNm), comprendiendo el

procedimiento: hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa-1), tal como se define en esta invención, con un cebador, una plantilla de ADNc y una polimerasa de ARN.

- 5 En un aspecto, se proporcionan en esta invención procedimientos para preparar ARNm modificado que comprende al menos un nucleótido (por ejemplo, molécula de ARNm), donde el polinucleótido comprende n número de nucleósidos que tienen la Fórmula (Ia-2), tal como se define en esta invención:



- 10 el procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa-2), como se define en esta invención:



- 15 con una polimerasa de ARN y una plantilla de ADNc.

- En un aspecto adicional, se proporcionan en esta invención procedimientos para amplificar ARNm modificado que comprende al menos un nucleótido (por ejemplo, molécula de ARNm), comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa-2), como se define en esta invención, con un cebador, una plantilla de ADNc y una polimerasa de ARN.

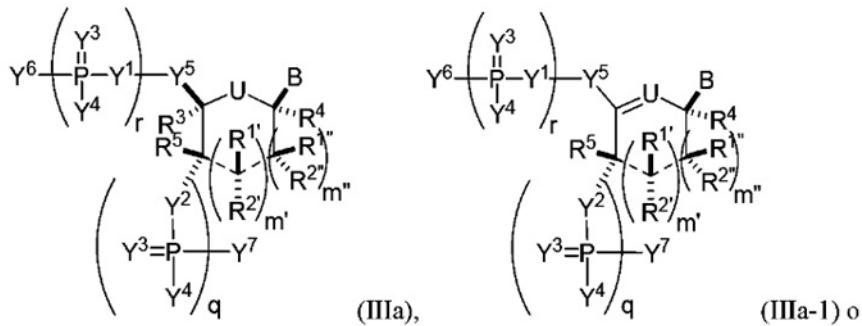
En algunos aspectos, la reacción se puede repetir de 1 a aproximadamente 7.000 veces. En cualquiera de las realizaciones de esta invención, B puede ser una nucleobase de Fórmula (b1)-(b43).

- 25 Los ácidos nucleicos modificados y ARNm pueden incluir opcionalmente regiones flanqueantes 5' y/o 3', que se describen en esta invención.

Moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) modificadas

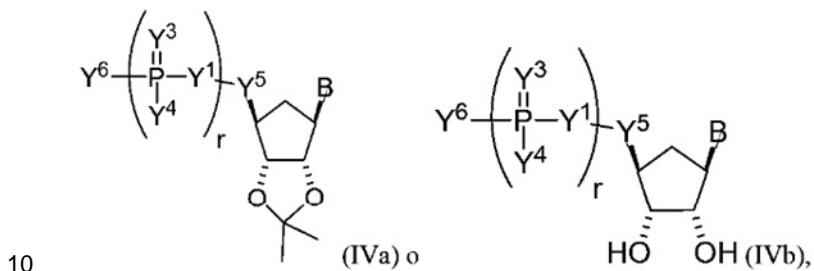
- 30 La presente descripción también incluye los bloques de construcción, por ejemplo, ribonucleósidos modificados, ribonucleótidos modificados, de las moléculas de ARN (o ARNm) modificadas. Por ejemplo, el ARNm puede ser útil para preparar los ácidos nucleicos modificados o ARNm.

En algunos aspectos, la molécula de bloque de construcción tiene la Fórmula (IIIa) o (IIIa-1):



sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde los sustituyentes son como se describe en esta invención (por ejemplo, para la Fórmula (Ia) y (Ia-1)), y donde cuando B es una nucleobase no modificada seleccionada de citosina, guanina, uracilo y adenina, entonces al menos uno de Y¹, Y² o Y³ no es O.

En algunos aspectos, la molécula de bloque de construcción, que puede incorporarse en un ácido nucleico modificado o ARNmm, tiene la Fórmula (IVa)-(IVb):

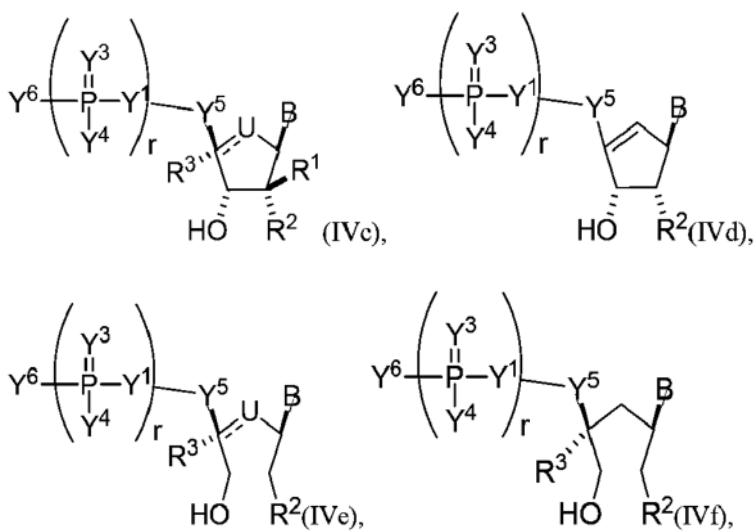


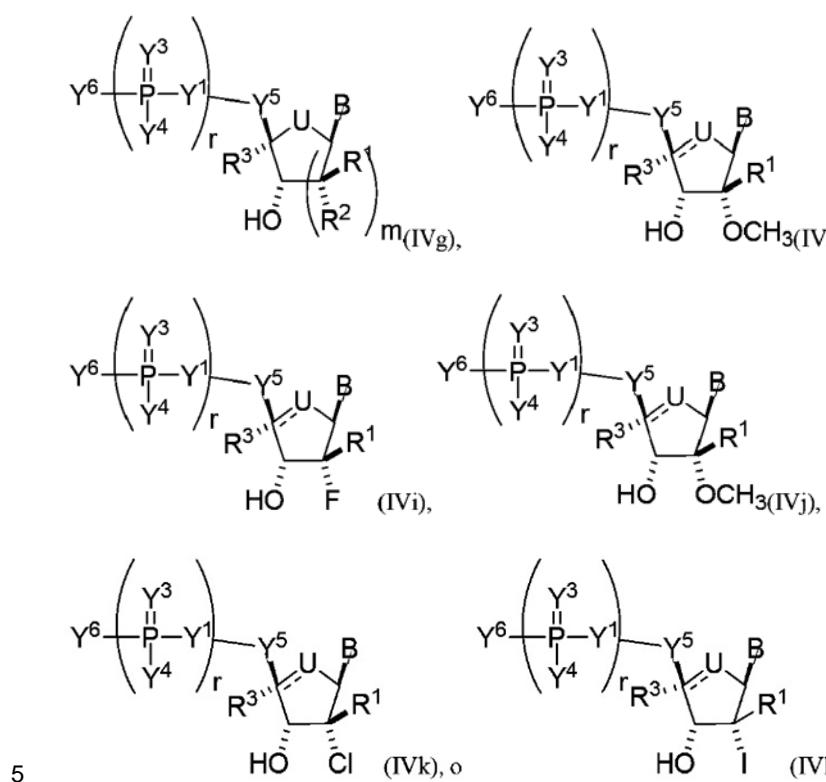
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).

15 En aspectos particulares, la Fórmula (IVa) o (IVb) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23), y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29), o (b30)). En aspectos particulares, la Fórmula (IVa) o (IVb) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como los casos de fórmula (b10) o (b32)). En aspectos particulares, la Fórmula (IVa) o (IVb) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)). En aspectos particulares, la Fórmula (IVa) o (IVb) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

20

En algunos aspectos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNm, tiene la Fórmula (IVc)-(IVk):



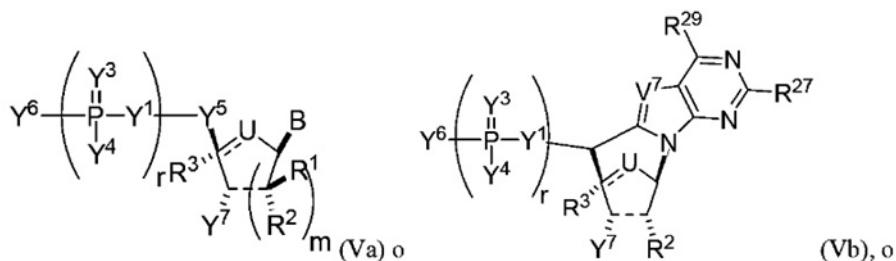


o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).

- En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IVc)-(IVk) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)).
- 10 En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IVc)-(IVk) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).
- En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IVc)-(IVk) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)).
- 15 En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IVc)-(IVk) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

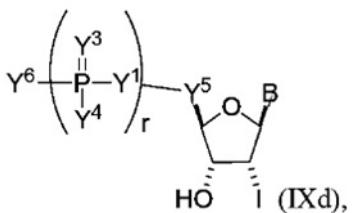
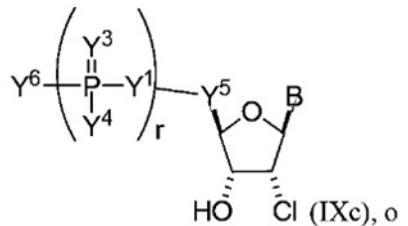
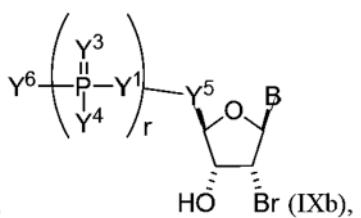
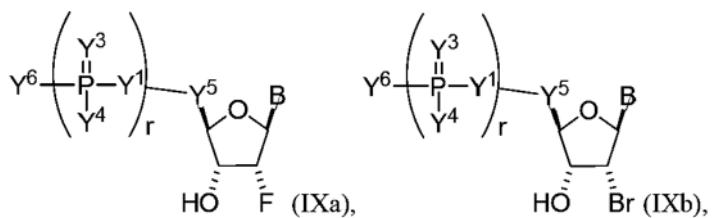
En otros aspectos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm tiene la fórmula (Va) o (Vb):

20

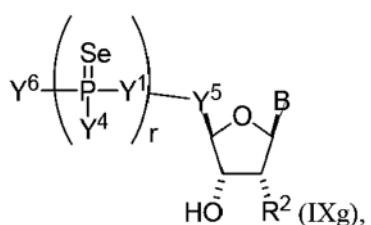
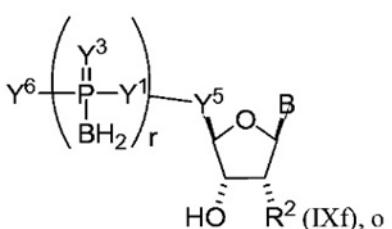
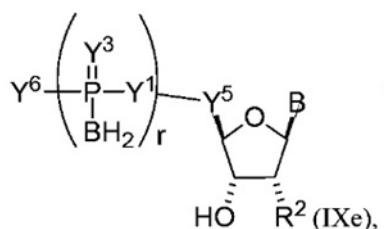


sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).

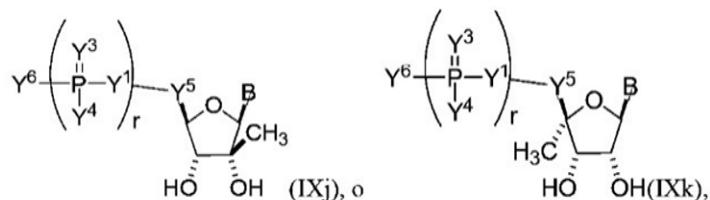
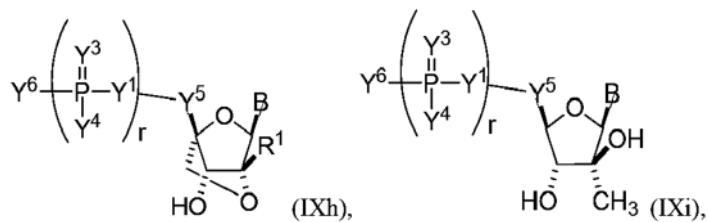
- 25 En otros aspectos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm tiene la fórmula (Ix-a)-(Ix-d):



- 5 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)). En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXa)-(IXd) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)). En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXa)-(IXd) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).
- 10 En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXa)-(IXd) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)).
- En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXa)-(IXd) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).
- 15 En otros aspectos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm tiene la fórmula (IXe)-(IXg):



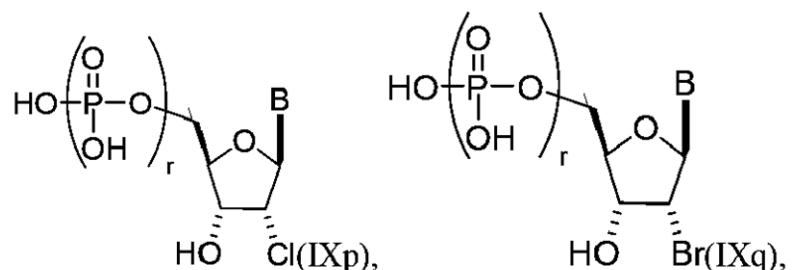
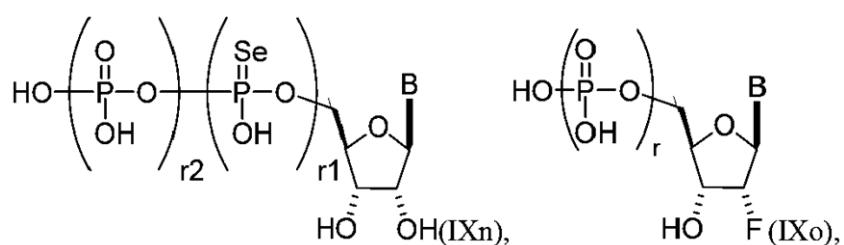
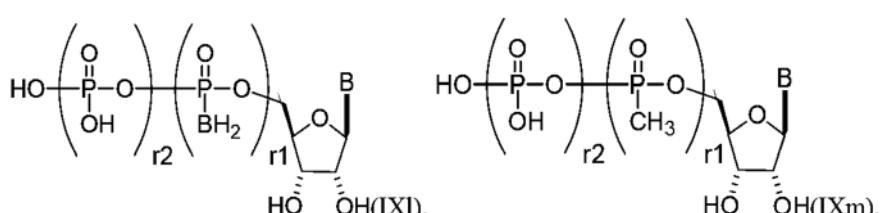
- 20 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).
- 25 En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXe)-(IXg) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)).
- En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXe)-(IXg) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).
- 30 En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXe)-(IXg) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)).
- En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXe)-(IXg) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).
- 35 En otros aspectos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm tiene la fórmula (IXh)-(IXk):

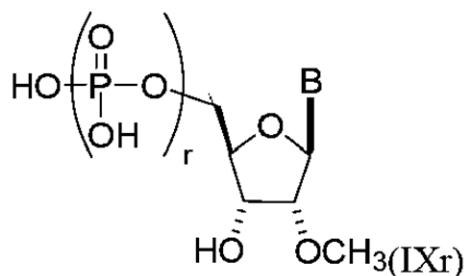


5 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)). En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXh)-(IXk) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)). En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXh)-(IXk) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).

10 En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXh)-(IXk) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)). En casos particulares, una de las Fórmulas (IXh)-(IXk) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

15 En otros aspectos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNm tiene la fórmula (IXl)-(IXr):





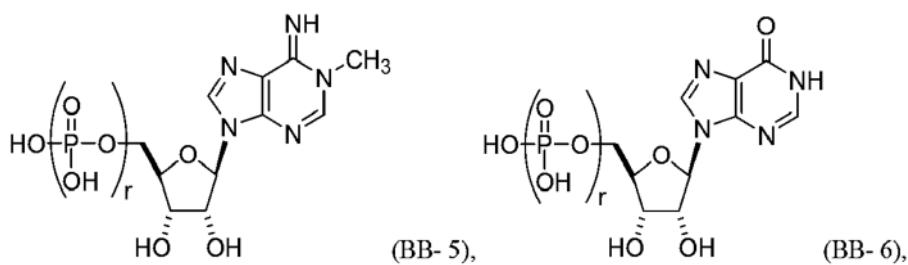
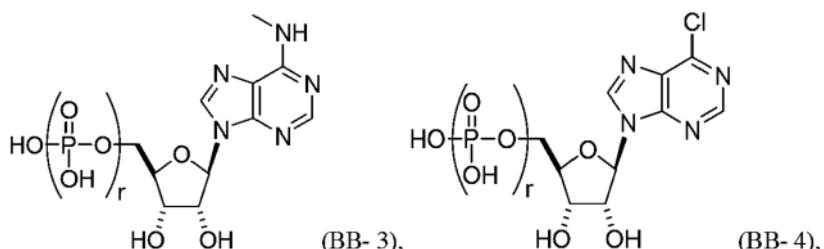
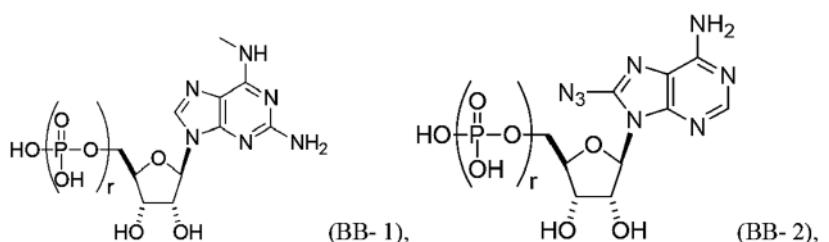
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r1 y r2 es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5) y B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).

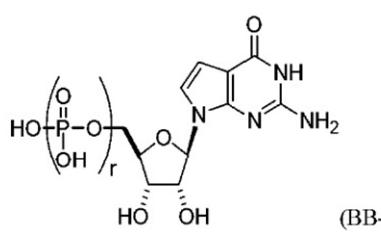
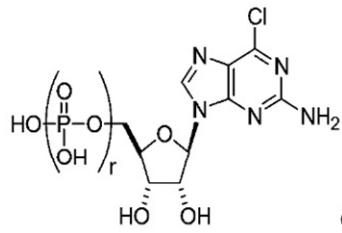
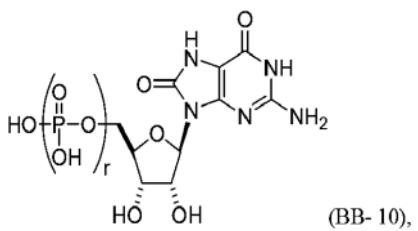
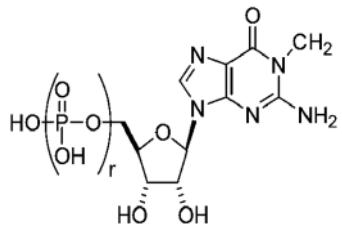
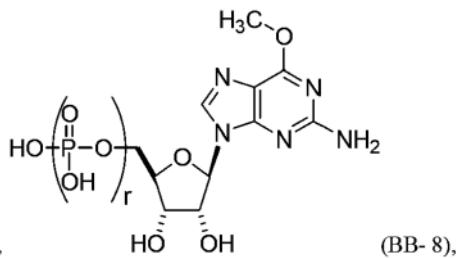
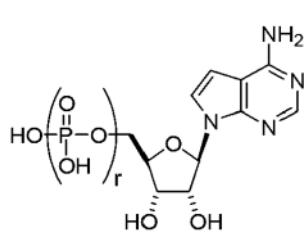
- 3 En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXI)-(IXr) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)).

10 En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXI)-(IXr) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).

15 En aspectos particulares, una de las Fórmulas (IXI)-(IXr) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)). En casos particulares, una de las Fórmulas (IXI)-(IXr) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

En algunos aspectos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en moléculas de ácido nucleico modificado o ARNm, se puede seleccionar del grupo que consiste en:

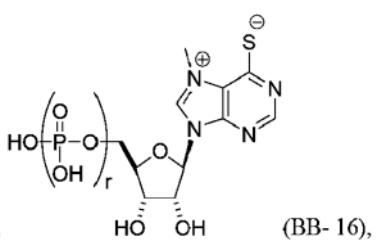
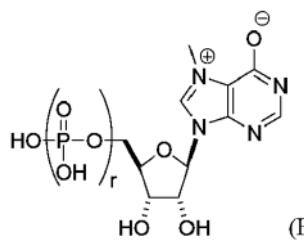
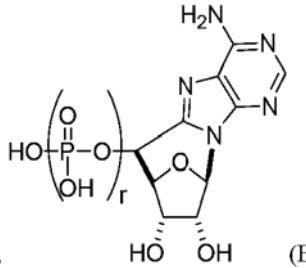
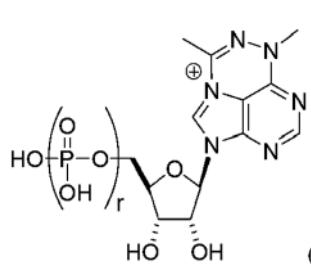


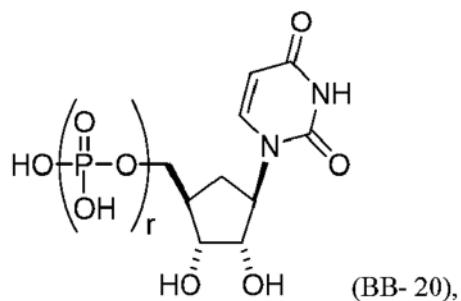
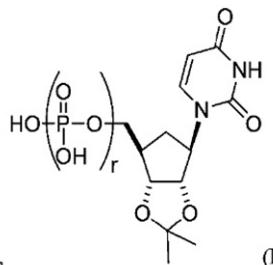
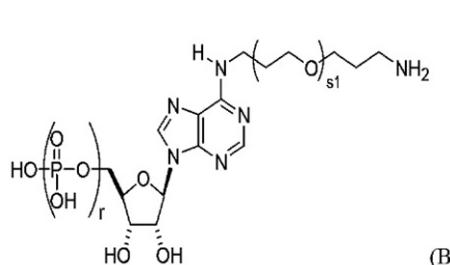
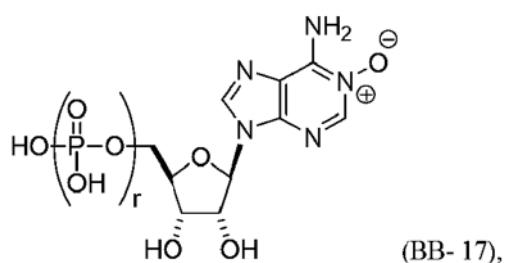


- 5 sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

En algunos aspectos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNm, se puede seleccionar del grupo que consiste en:

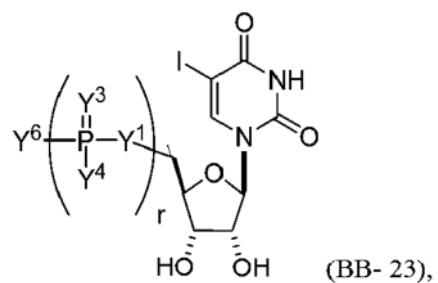
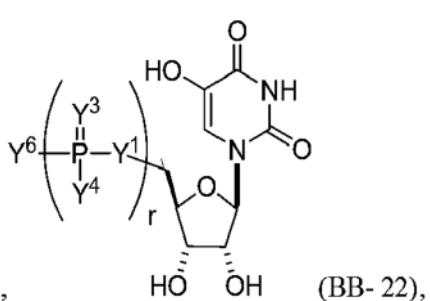
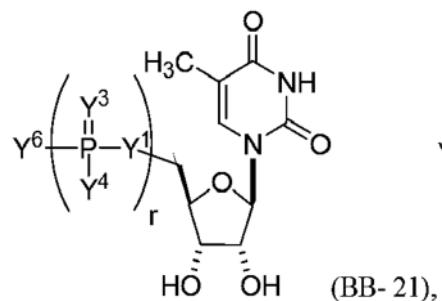
10

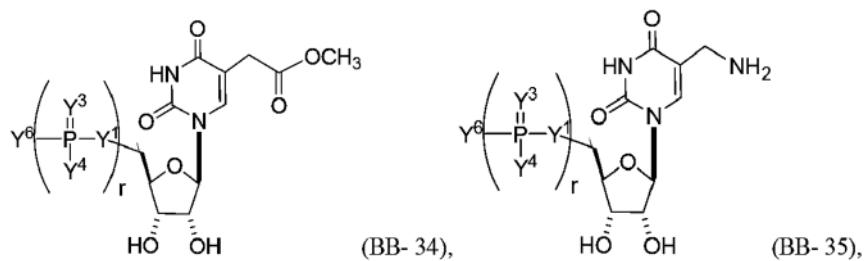
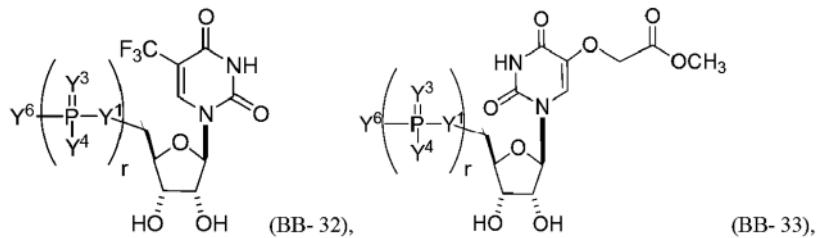
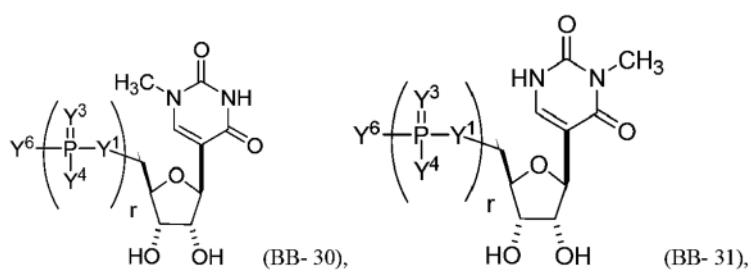
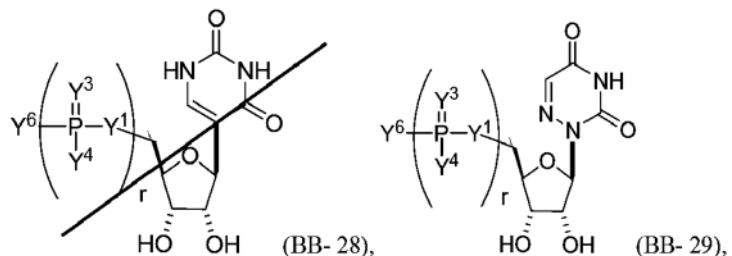
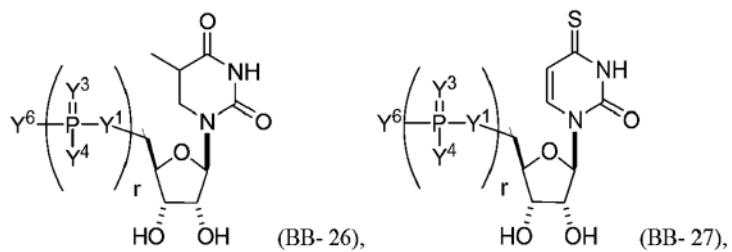
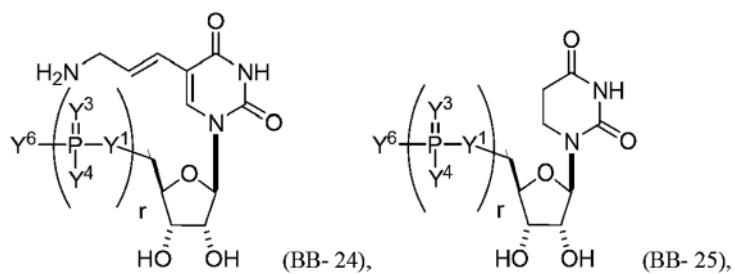


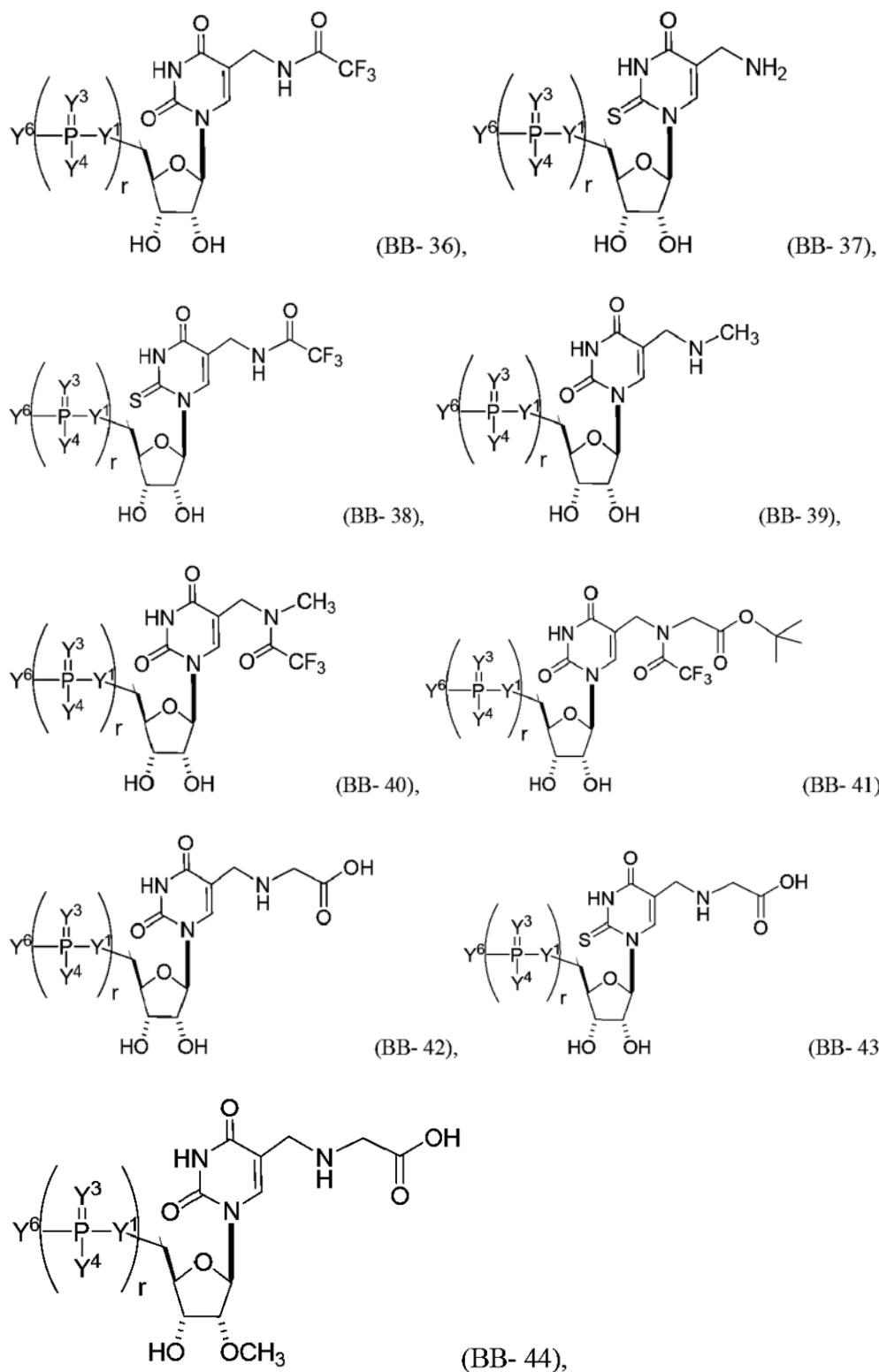


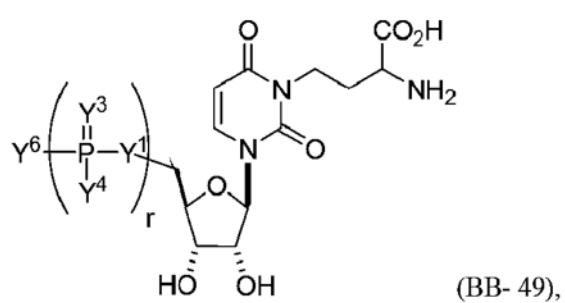
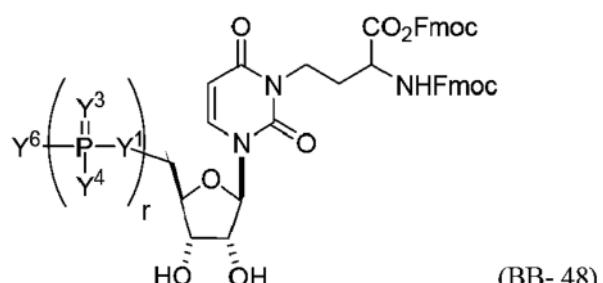
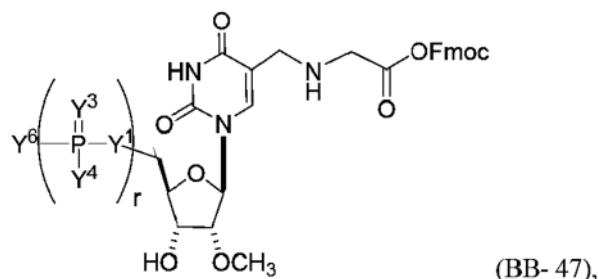
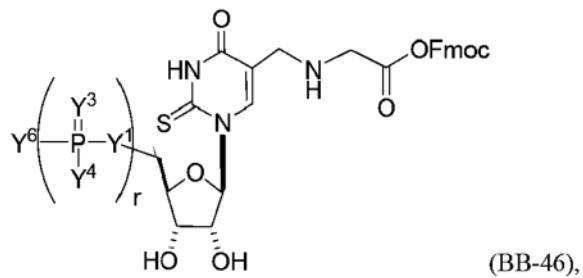
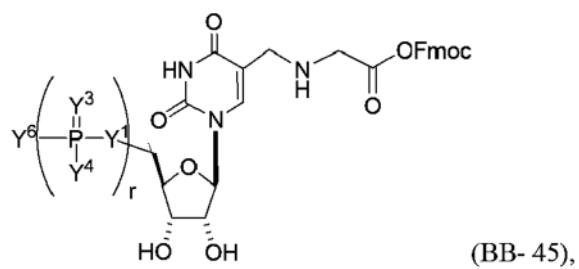
- 5 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5) y s1 es como se describe en esta invención.

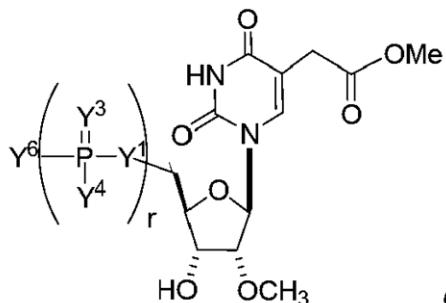
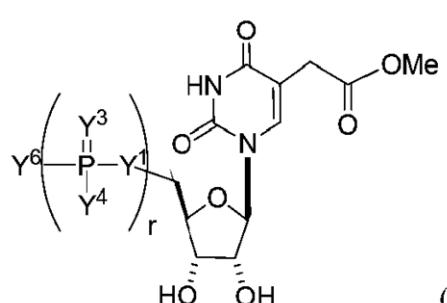
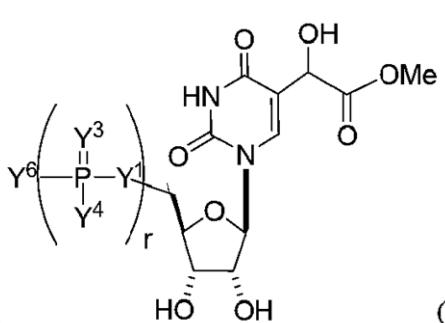
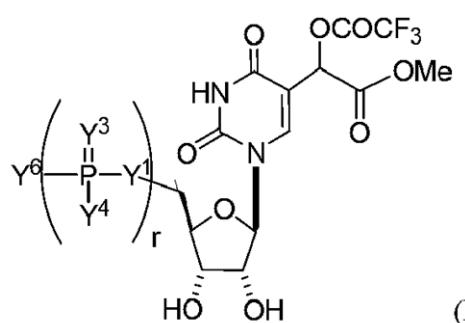
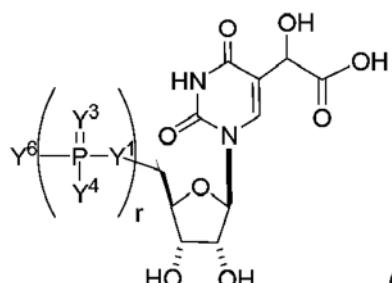
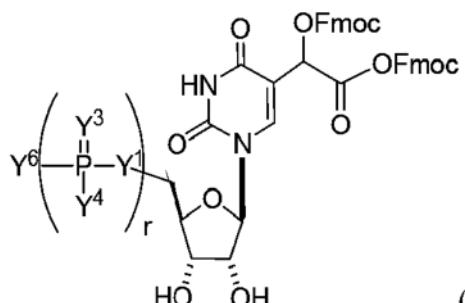
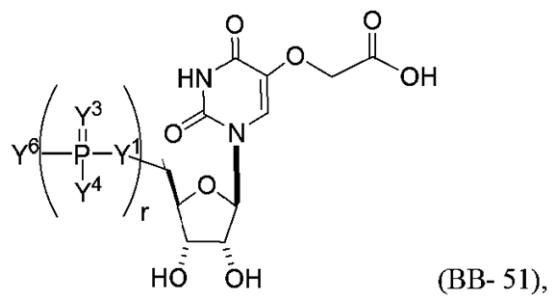
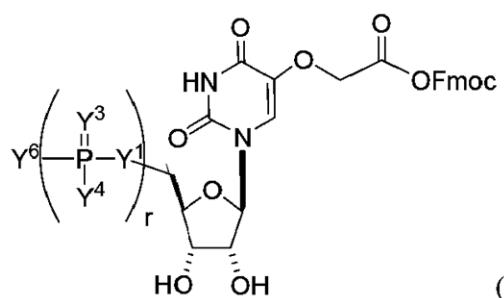
En algunos aspectos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un ácido nucleico (por ejemplo, ARN, ARNm, o ARNmm), es una uridina modificada (por ejemplo, que se selecciona del grupo que consiste en:

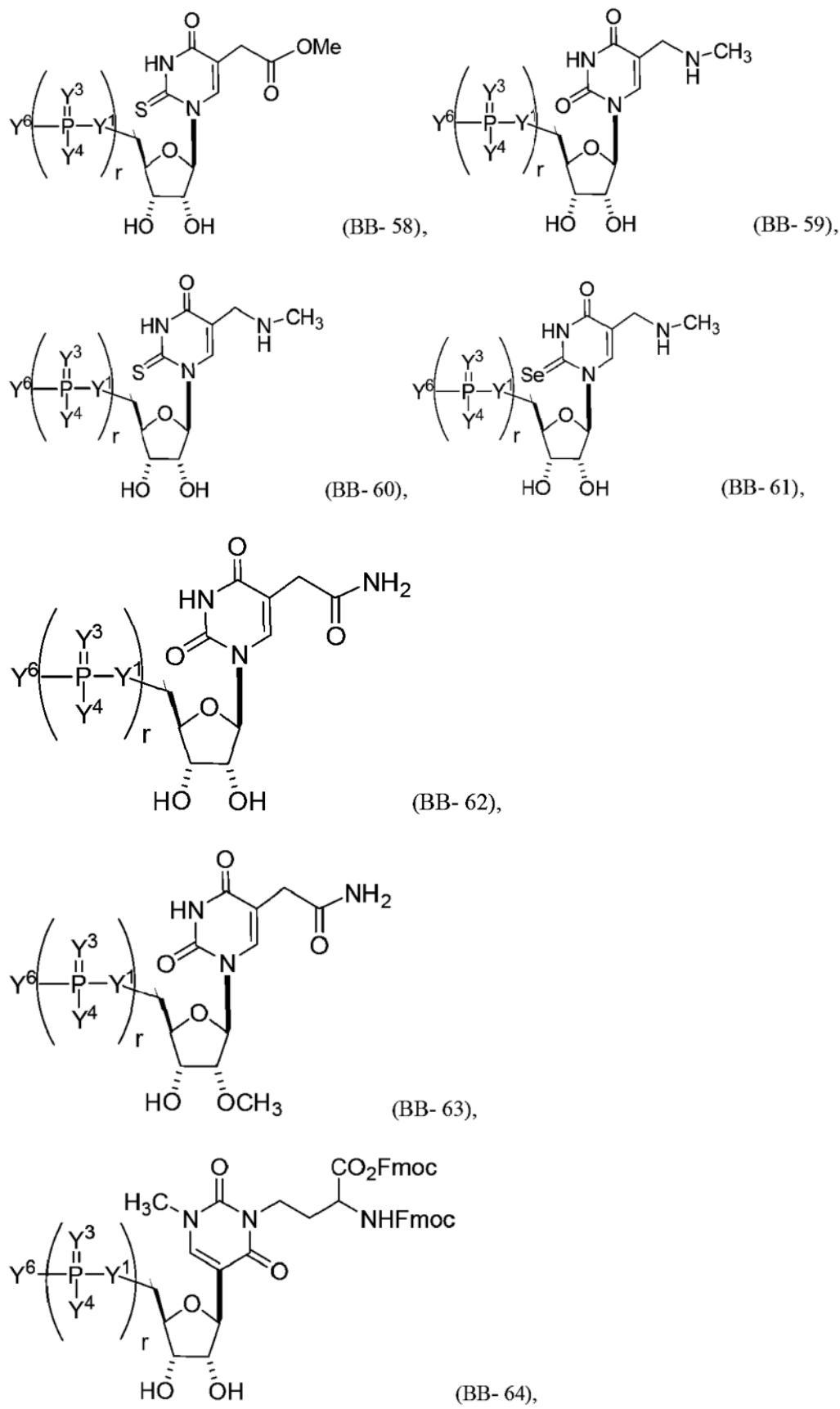


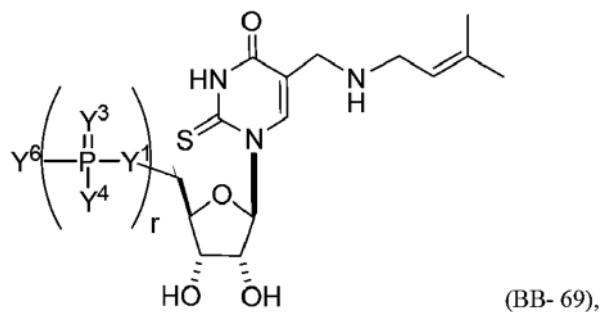
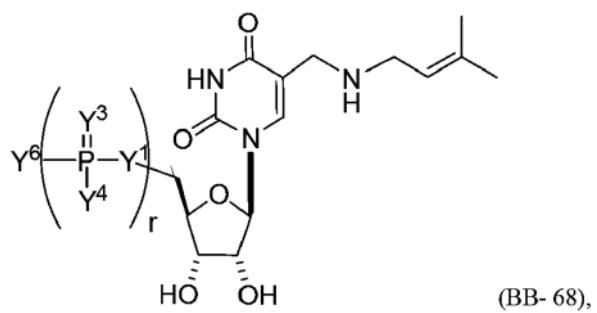
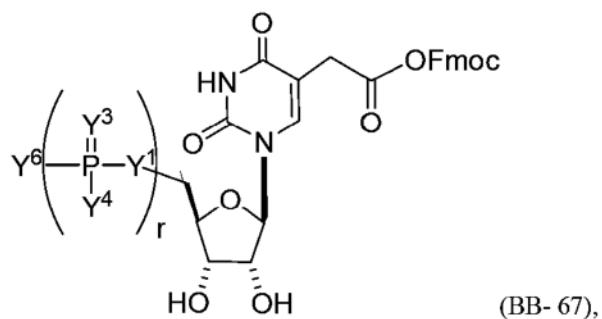
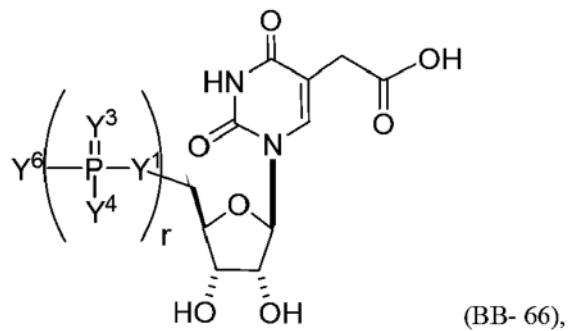
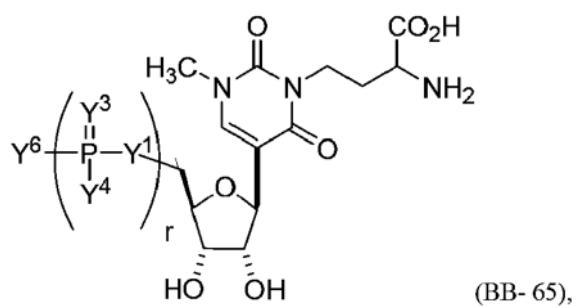


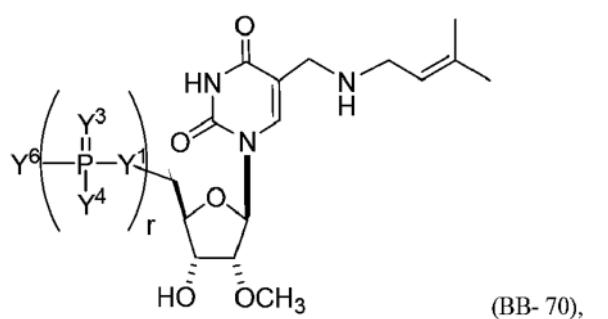




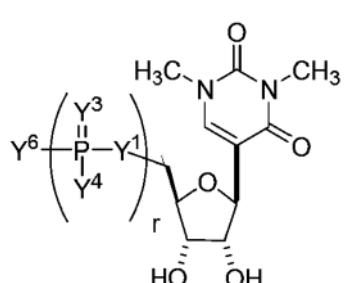




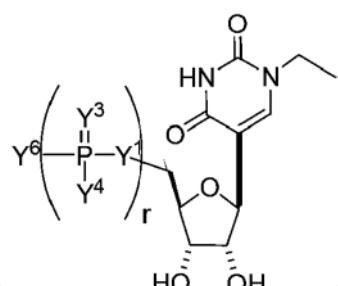




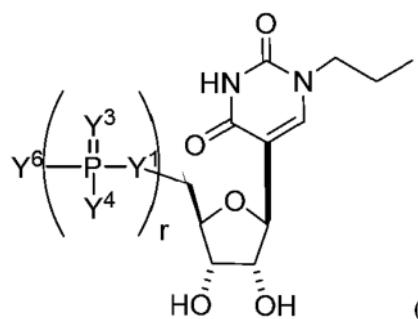
(BB- 70),



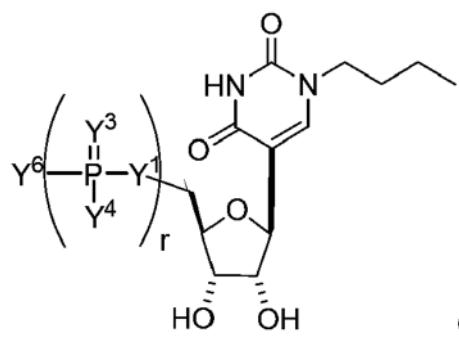
(BB- 71),



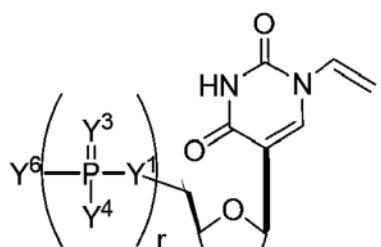
(BB- 72),



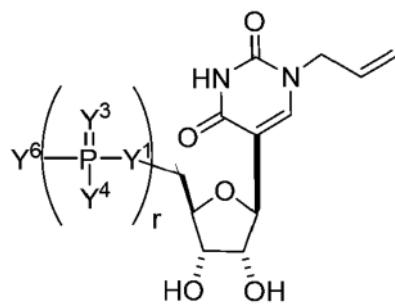
(BB- 73),



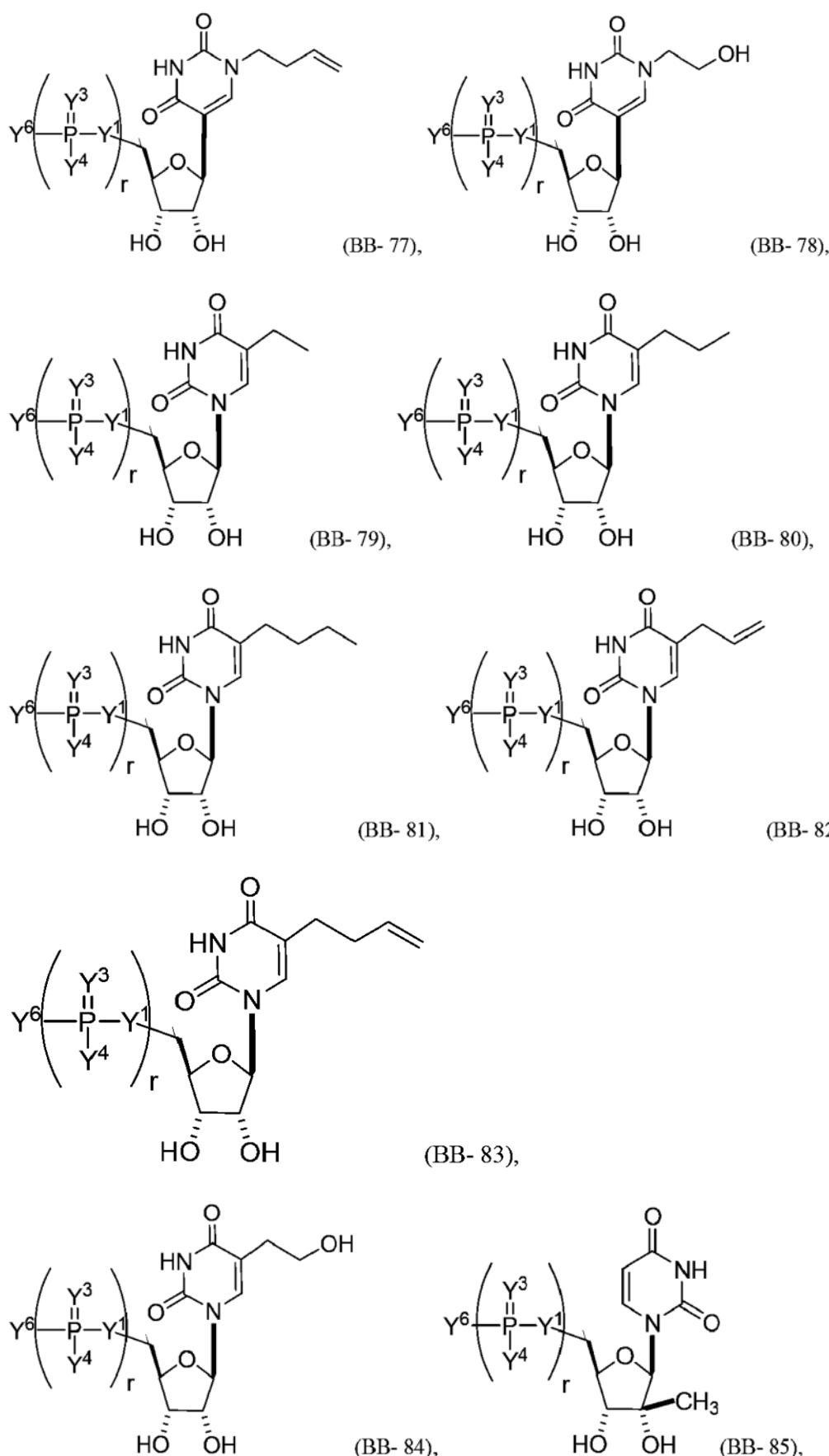
(BB- 74),

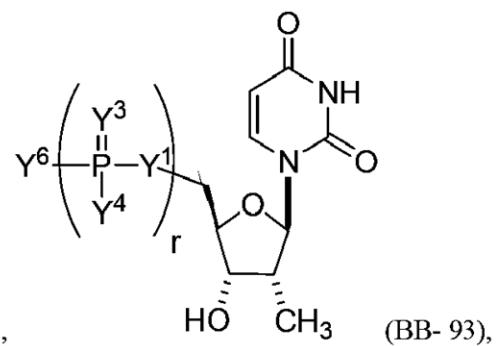
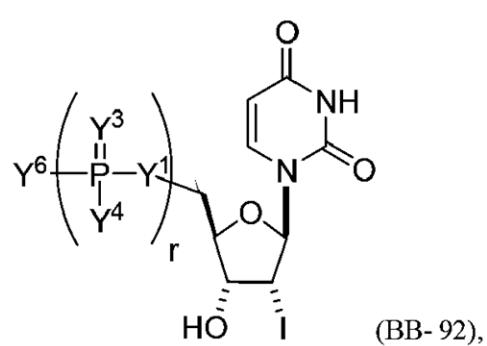
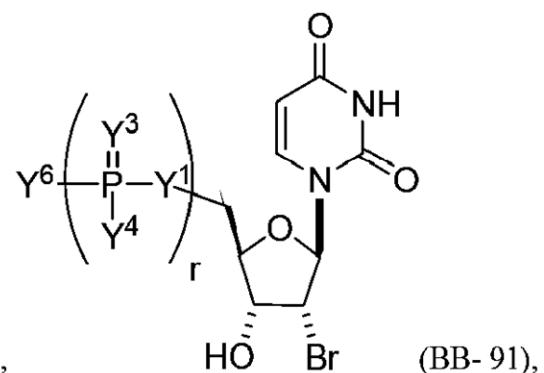
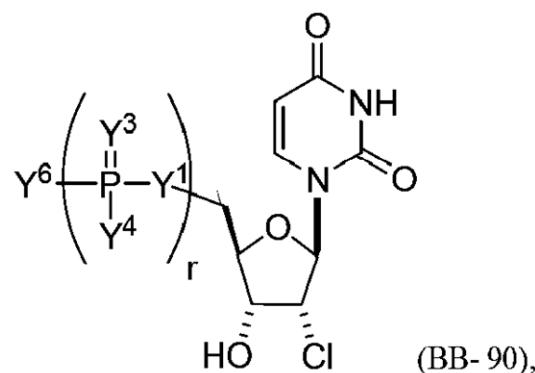
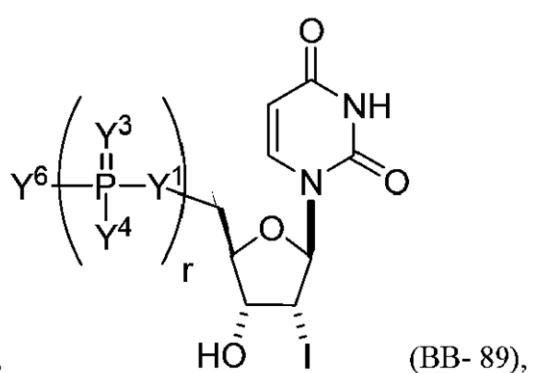
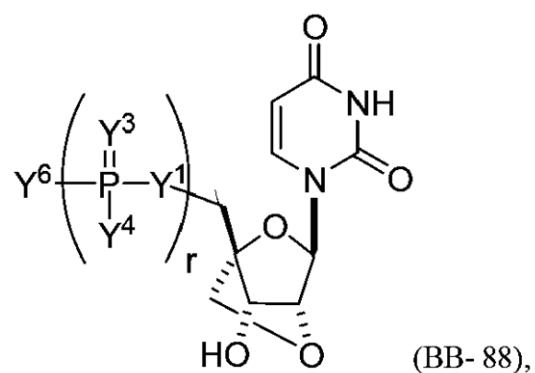
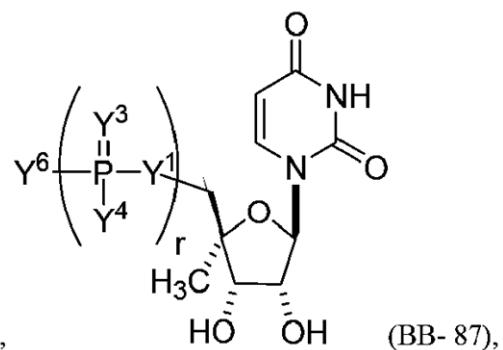
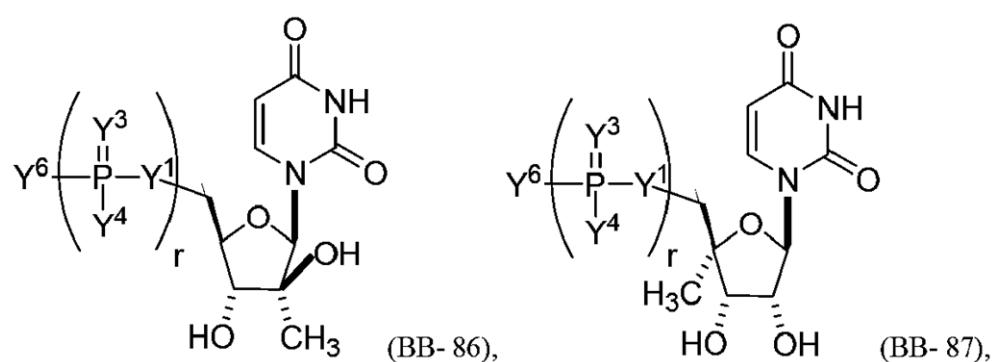


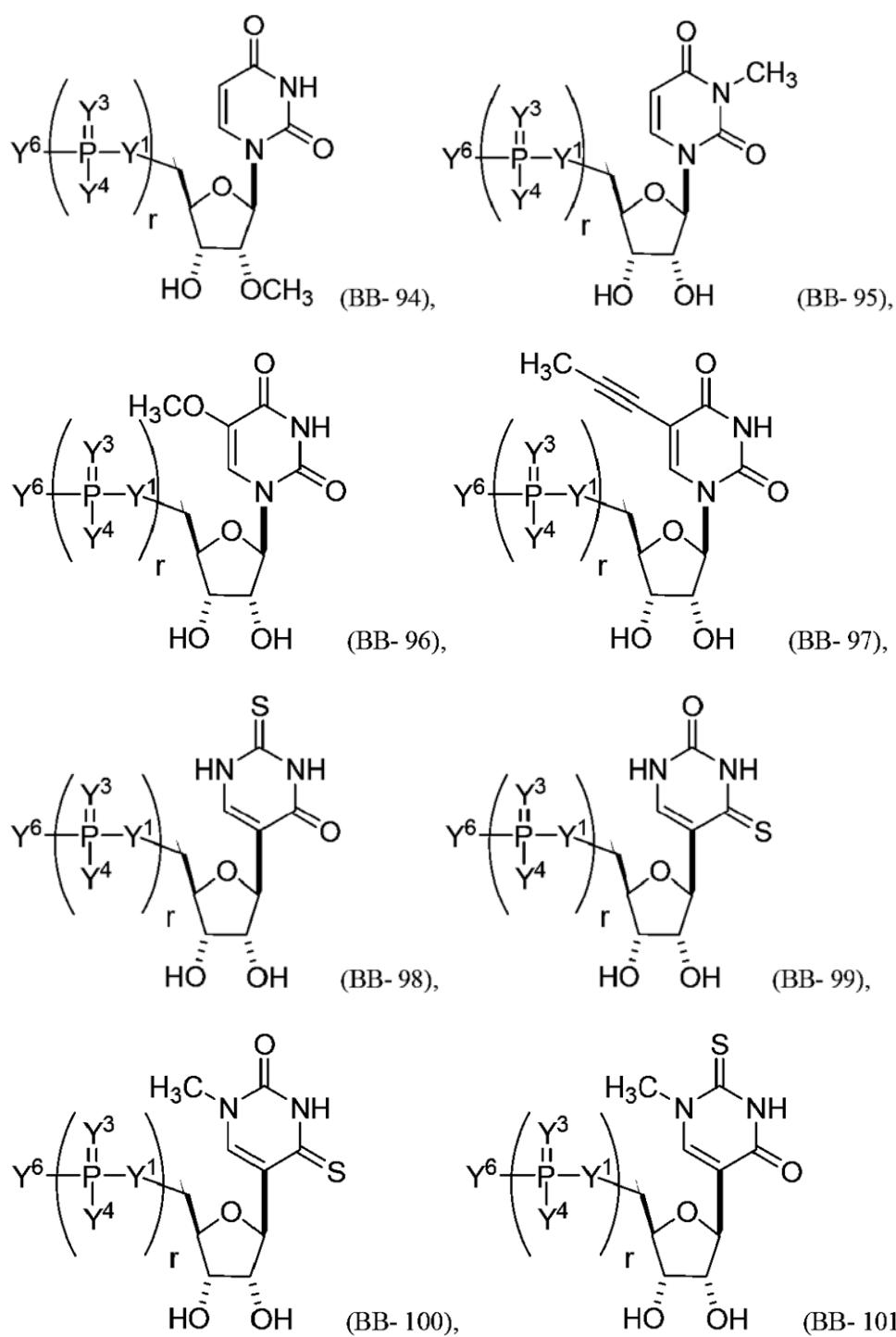
(BB- 75),

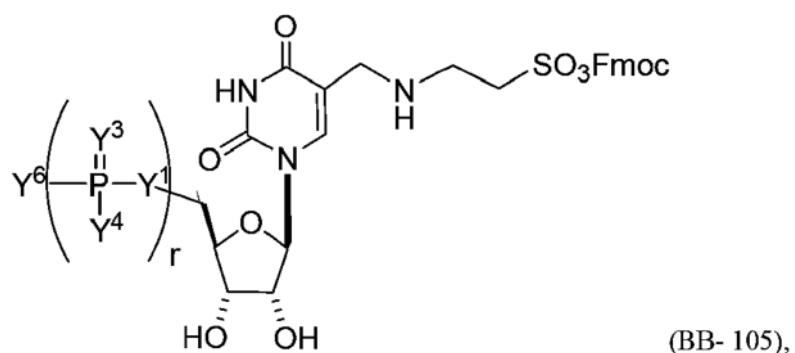
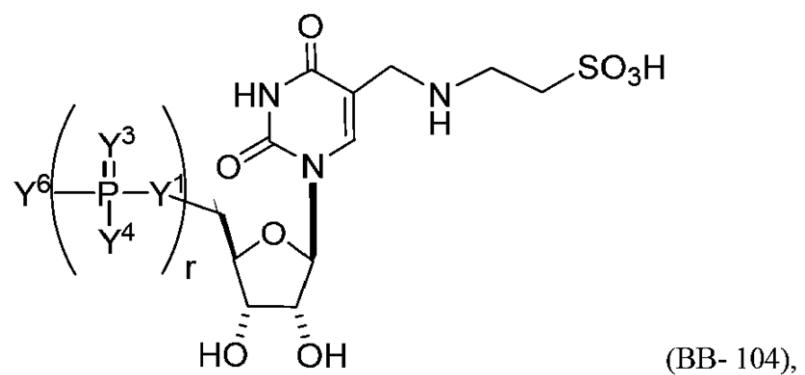
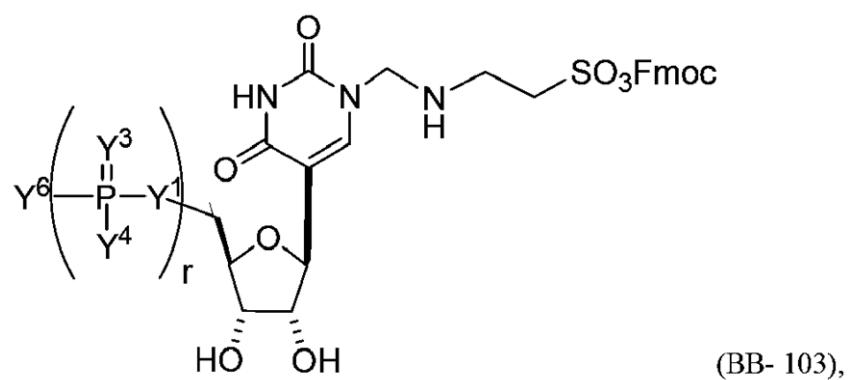
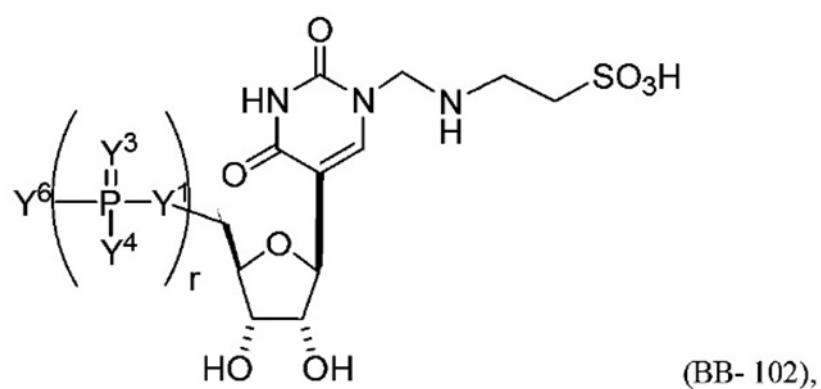


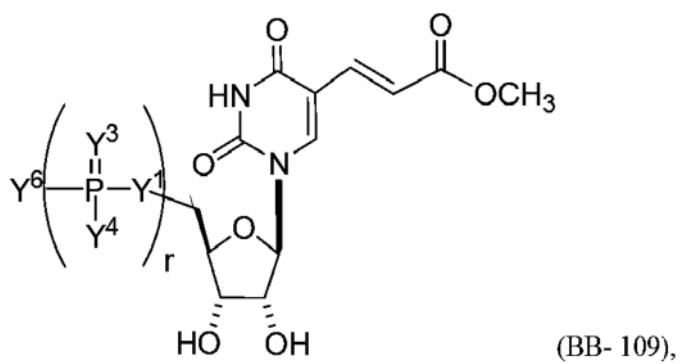
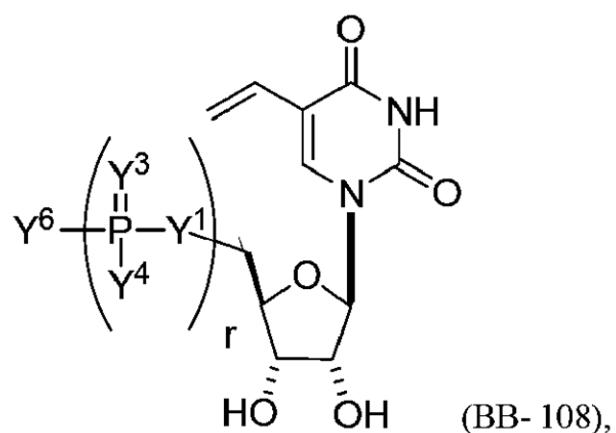
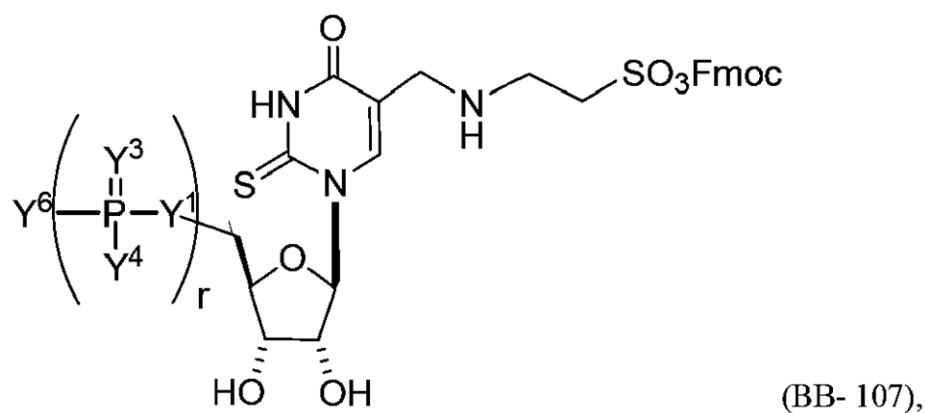
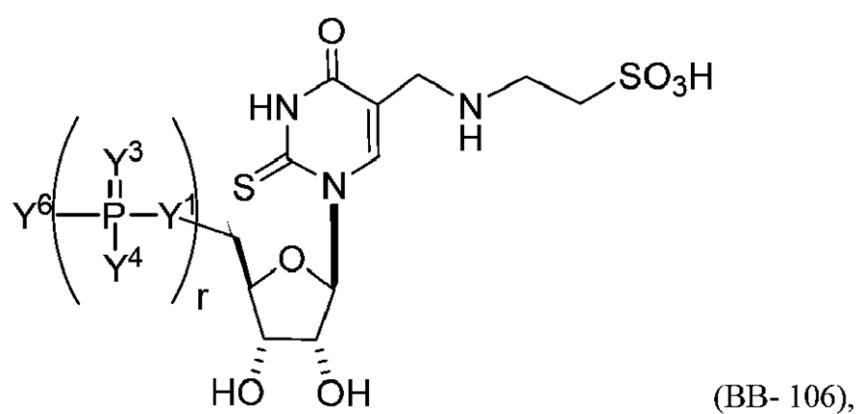
(BB- 76),

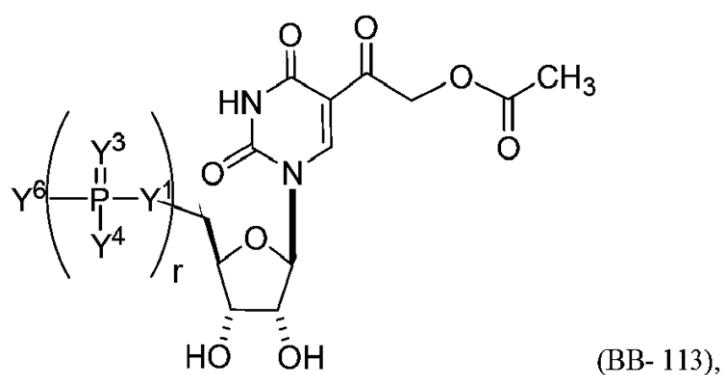
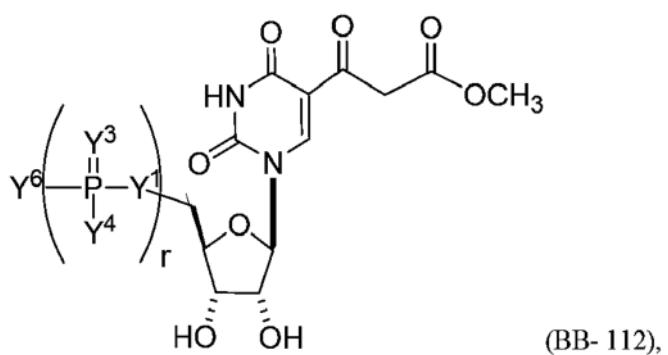
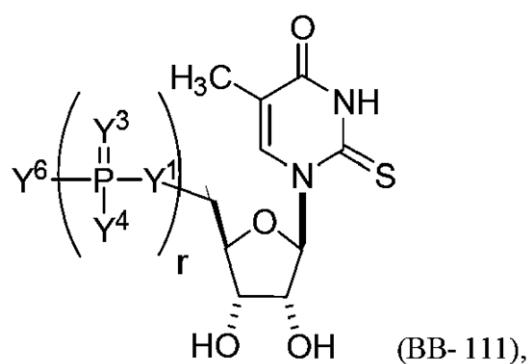
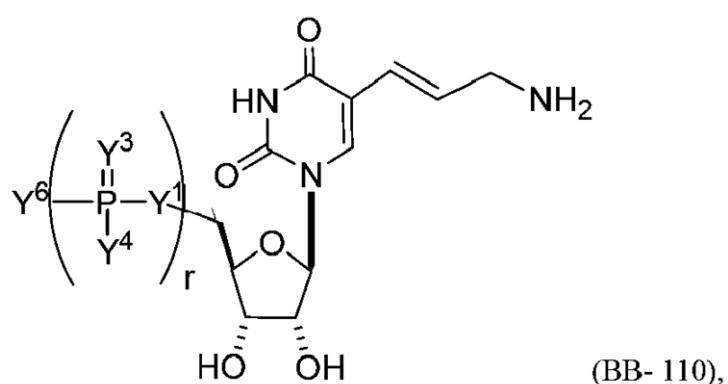


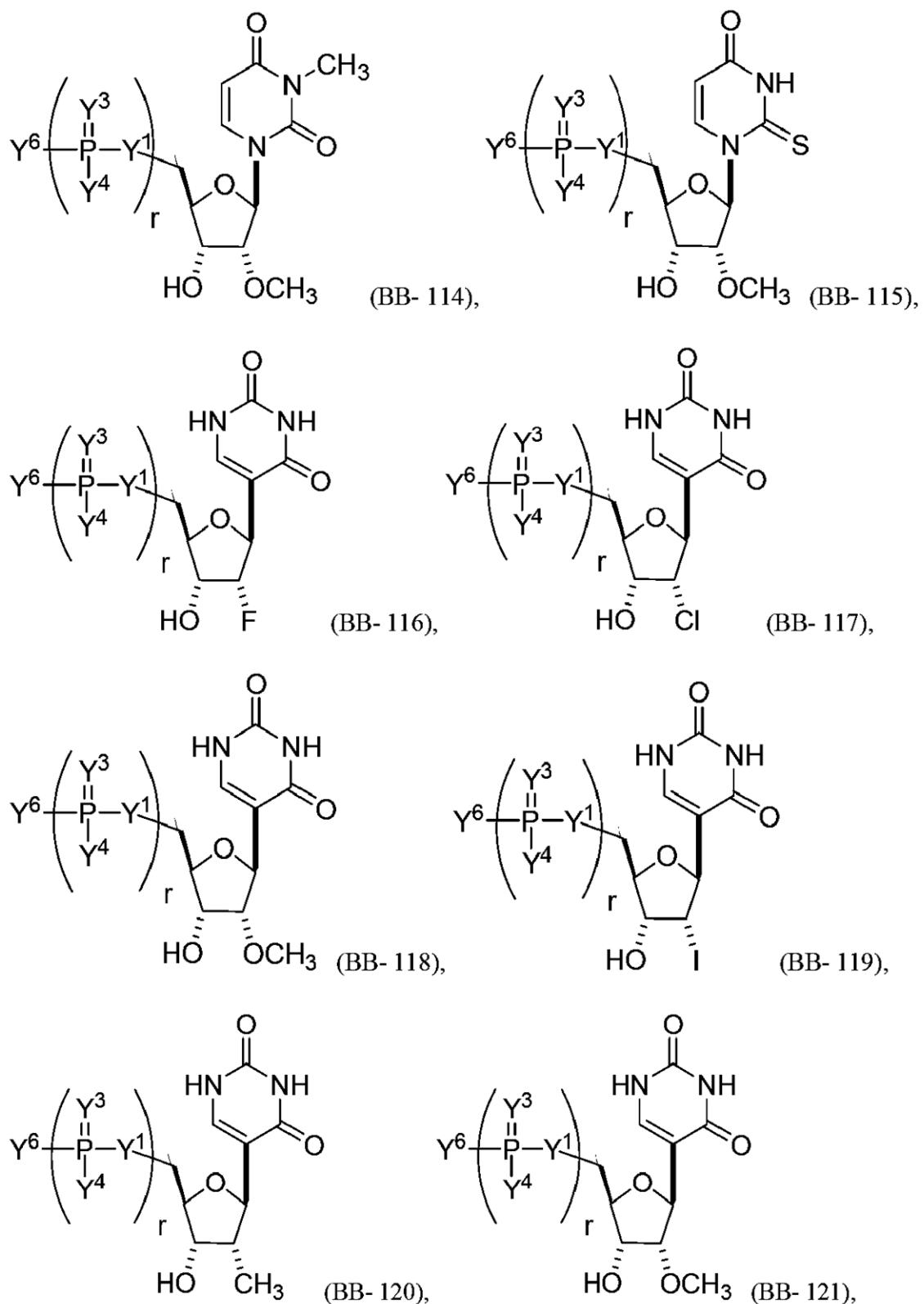


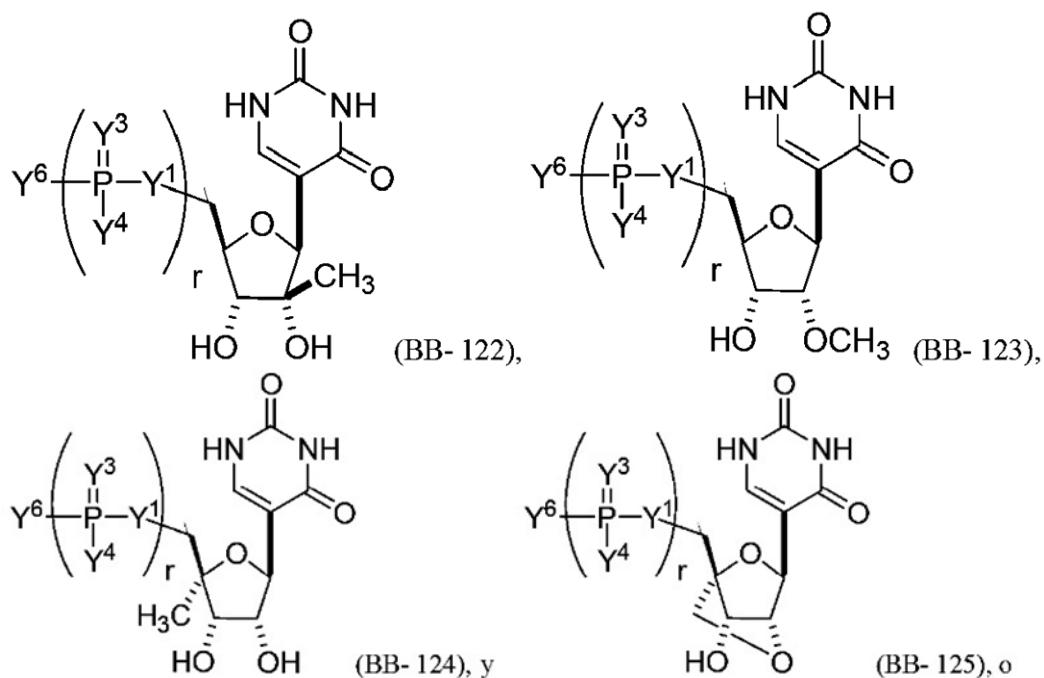






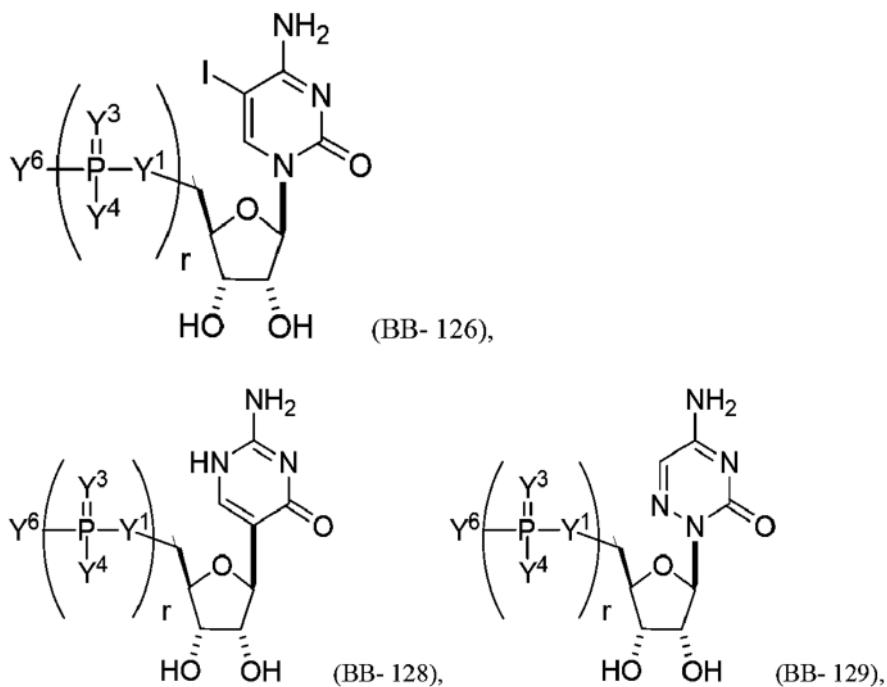


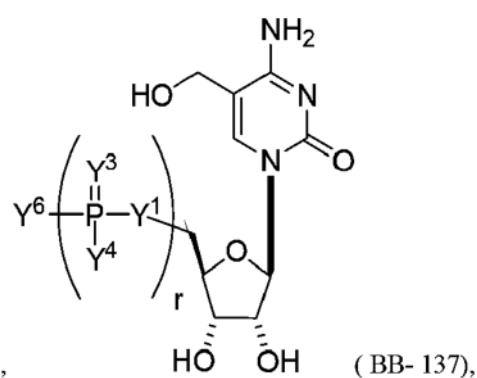
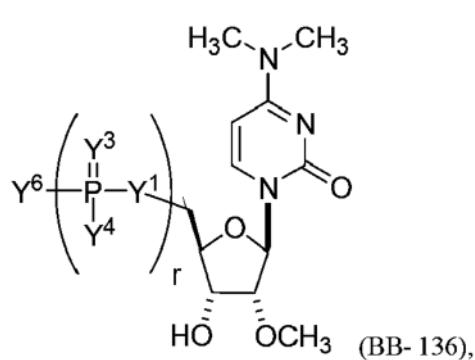
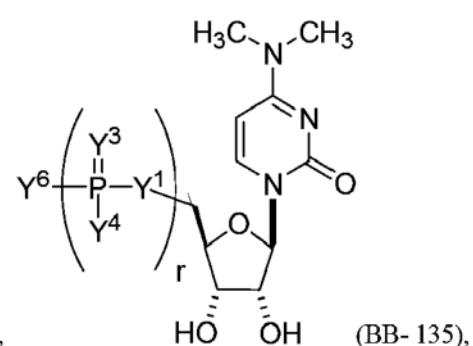
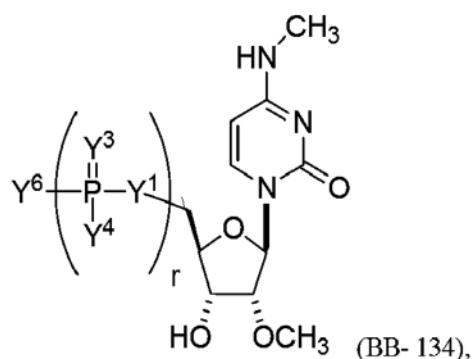
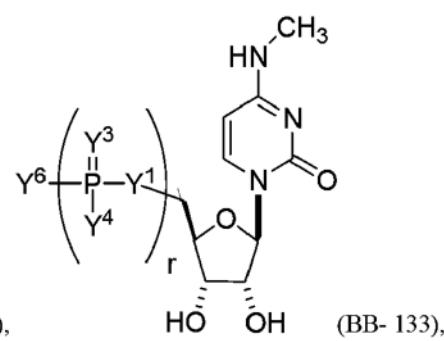
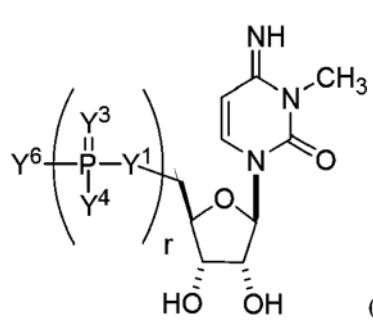
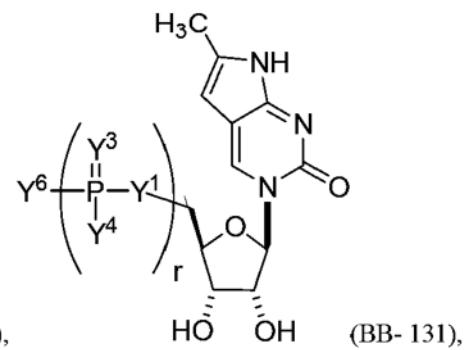
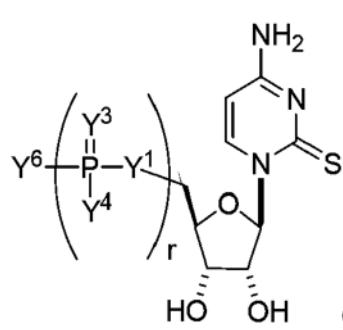


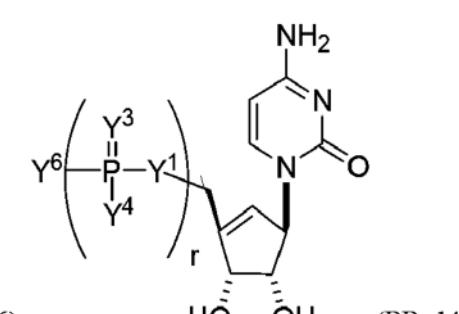
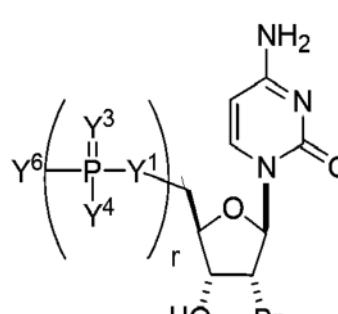
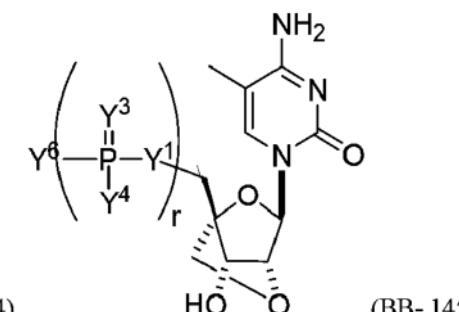
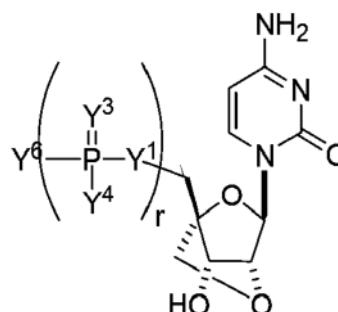
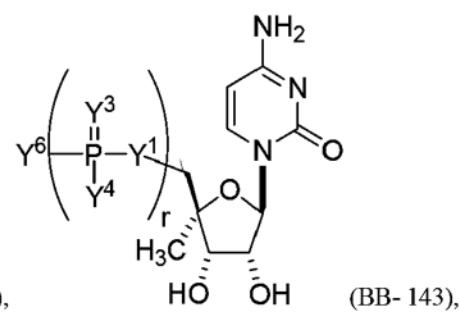
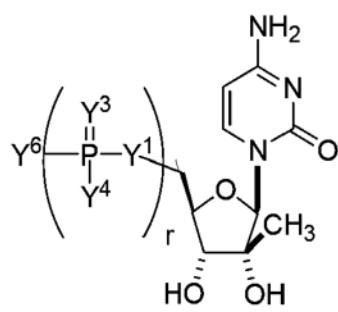
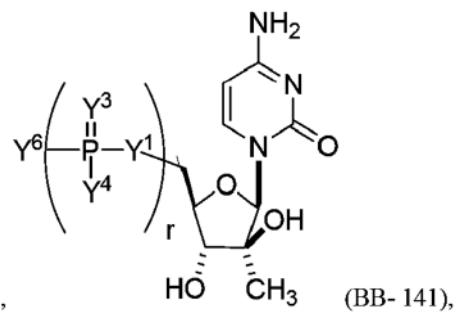
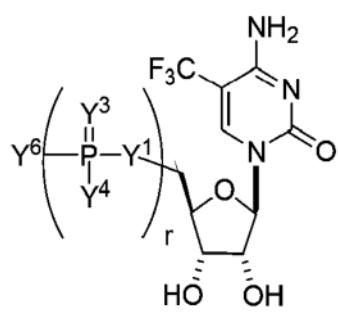
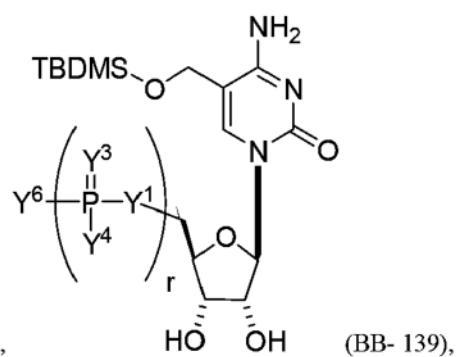
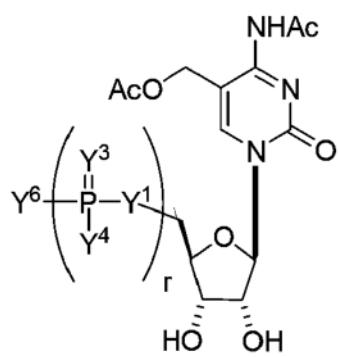


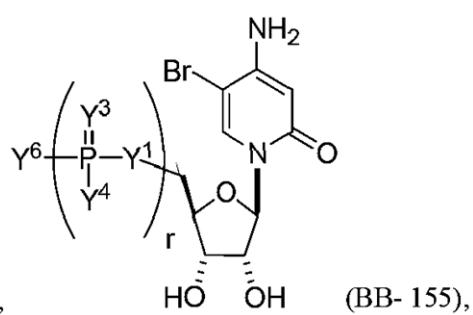
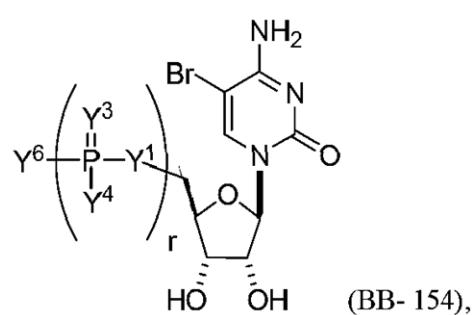
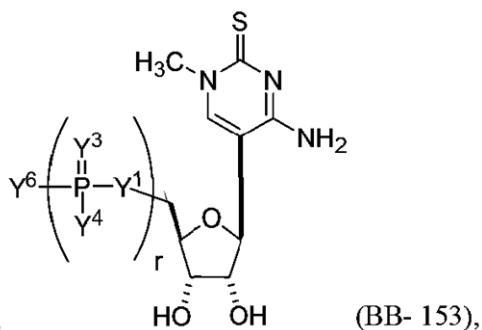
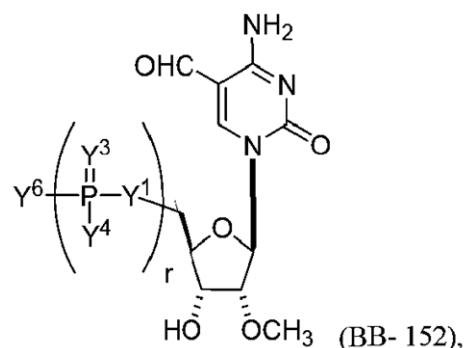
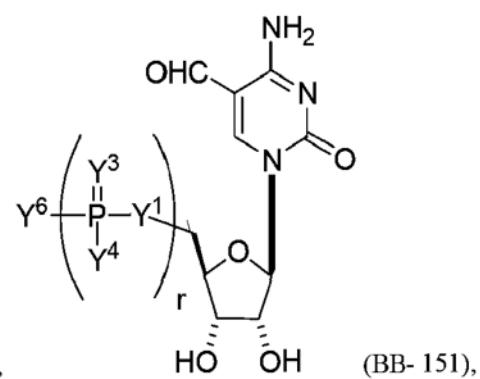
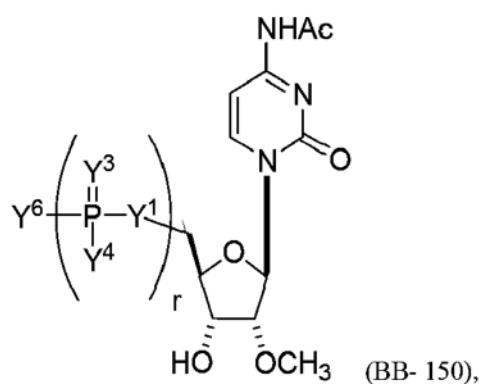
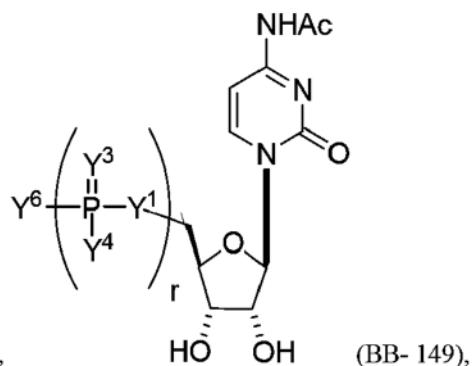
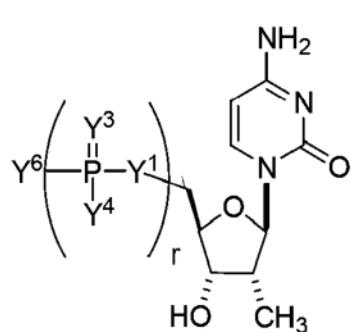
sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde Y^1 , Y^3 , Y^4 , Y^6 y r son como se describe en esta invención (por ejemplo, cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5, tal como de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5)).

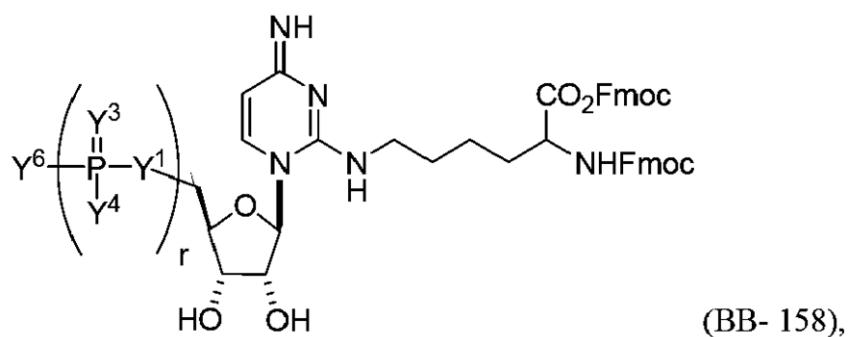
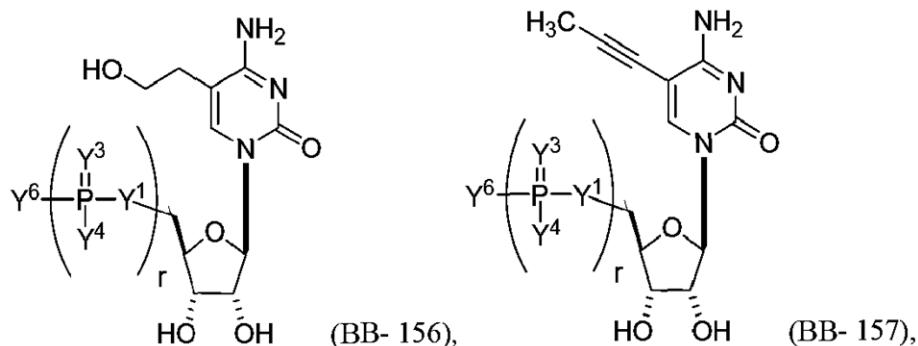
En algunos aspectos, la molécula de bloque de construcción, que puede incorporarse en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm, es una citidina modificada (por ejemplo, seleccionada de entre el grupo que consiste en:



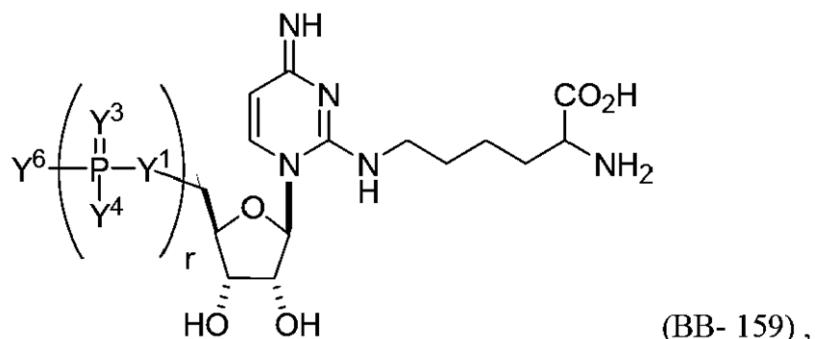




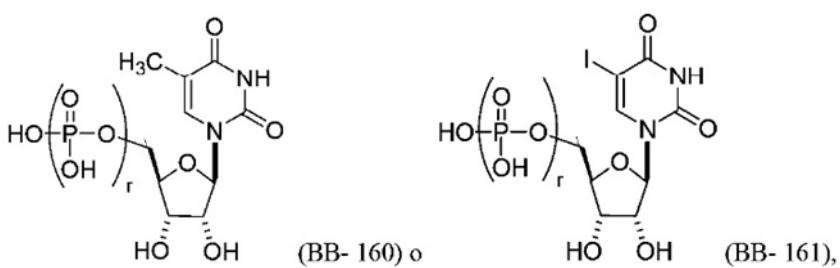




5 y

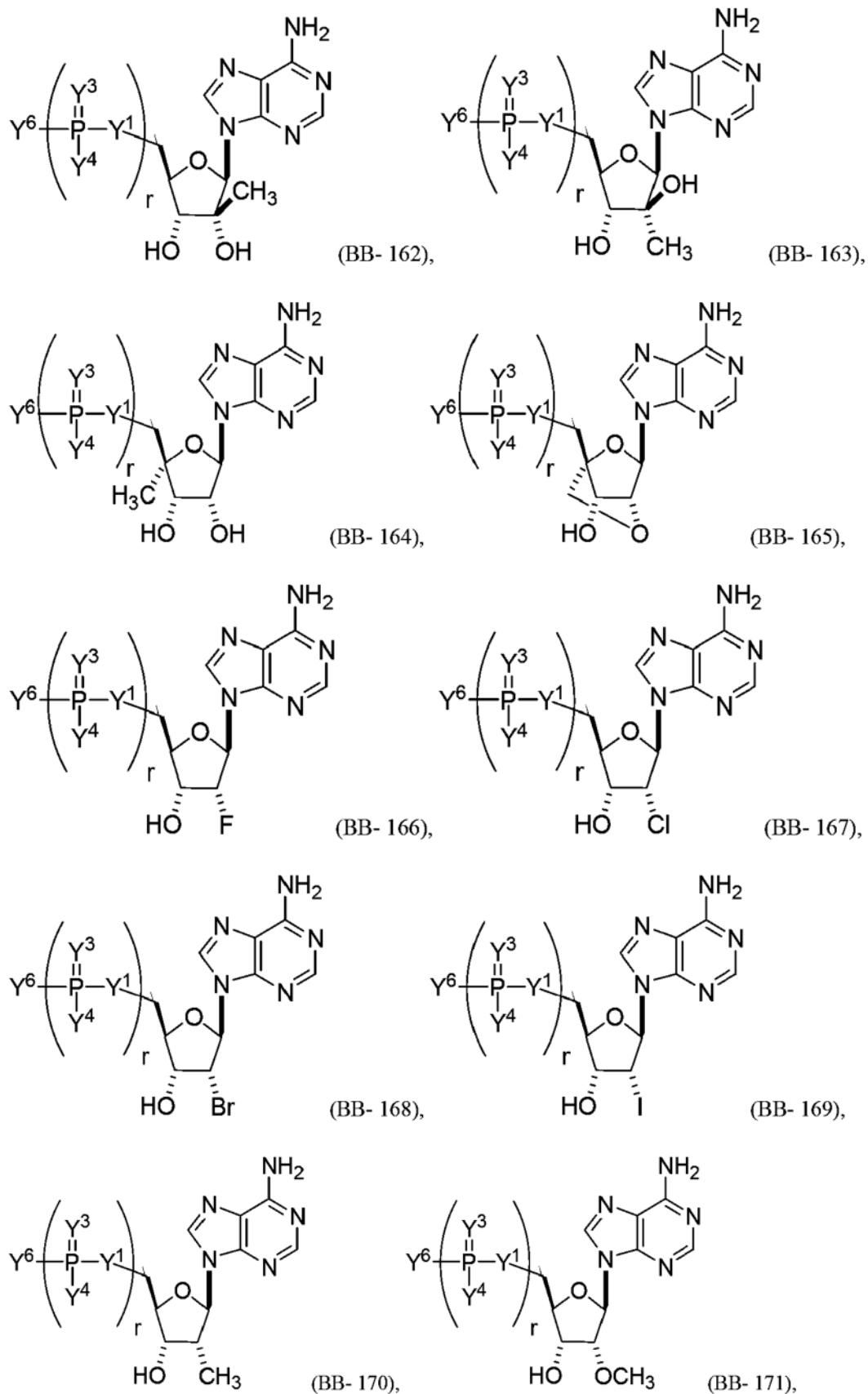


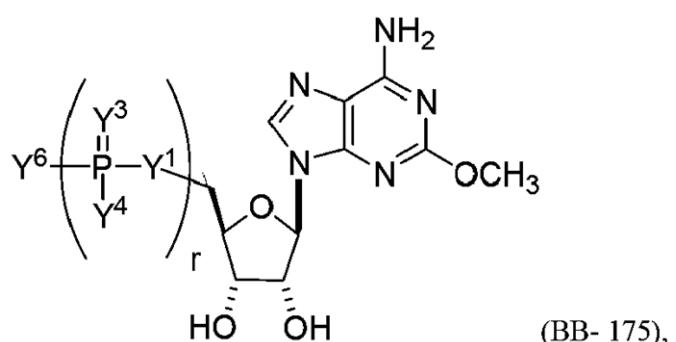
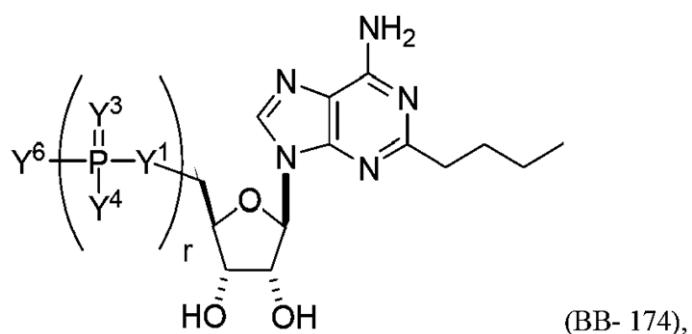
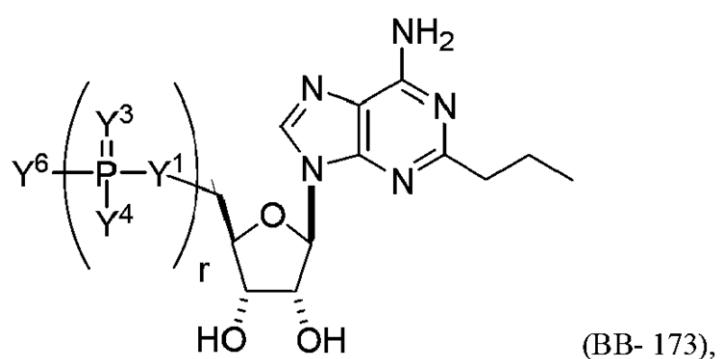
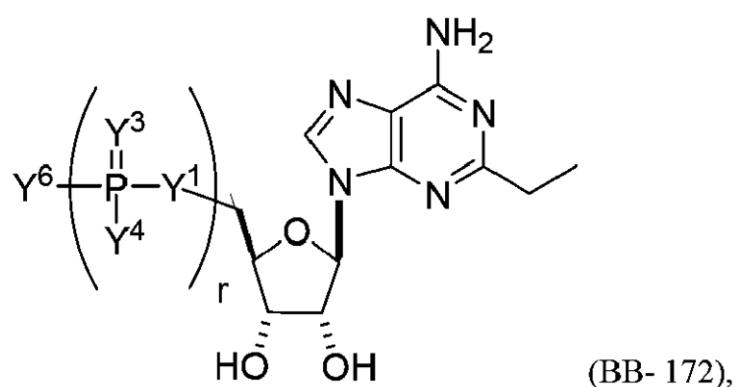
10 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde Y^1 , Y^3 , Y^4 , Y^6 y r son como se describe en esta invención (por ejemplo, cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5, tal como de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5)). Por ejemplo, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm puede ser:

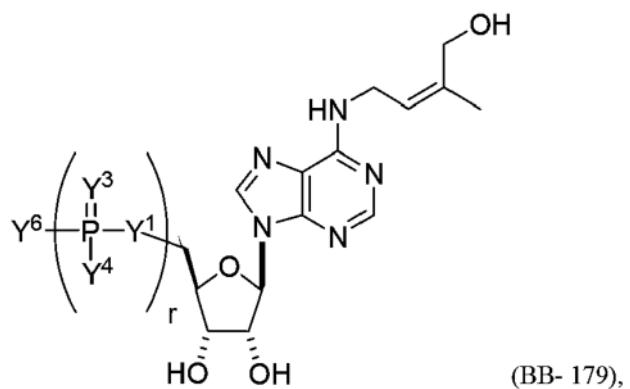
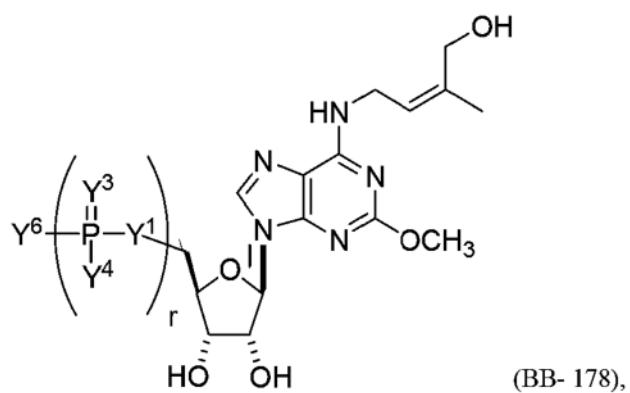
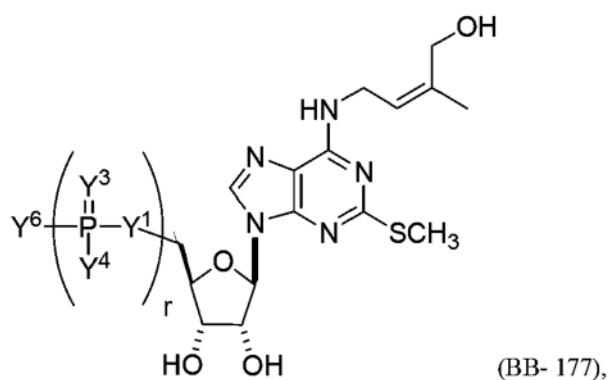
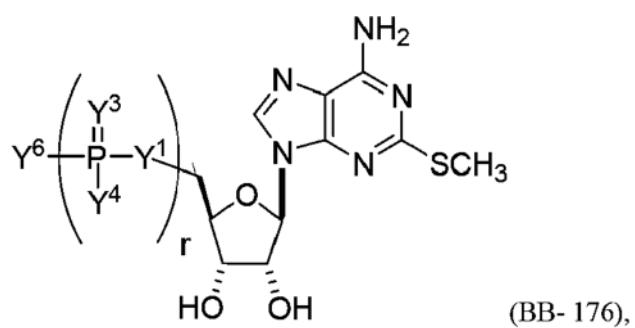


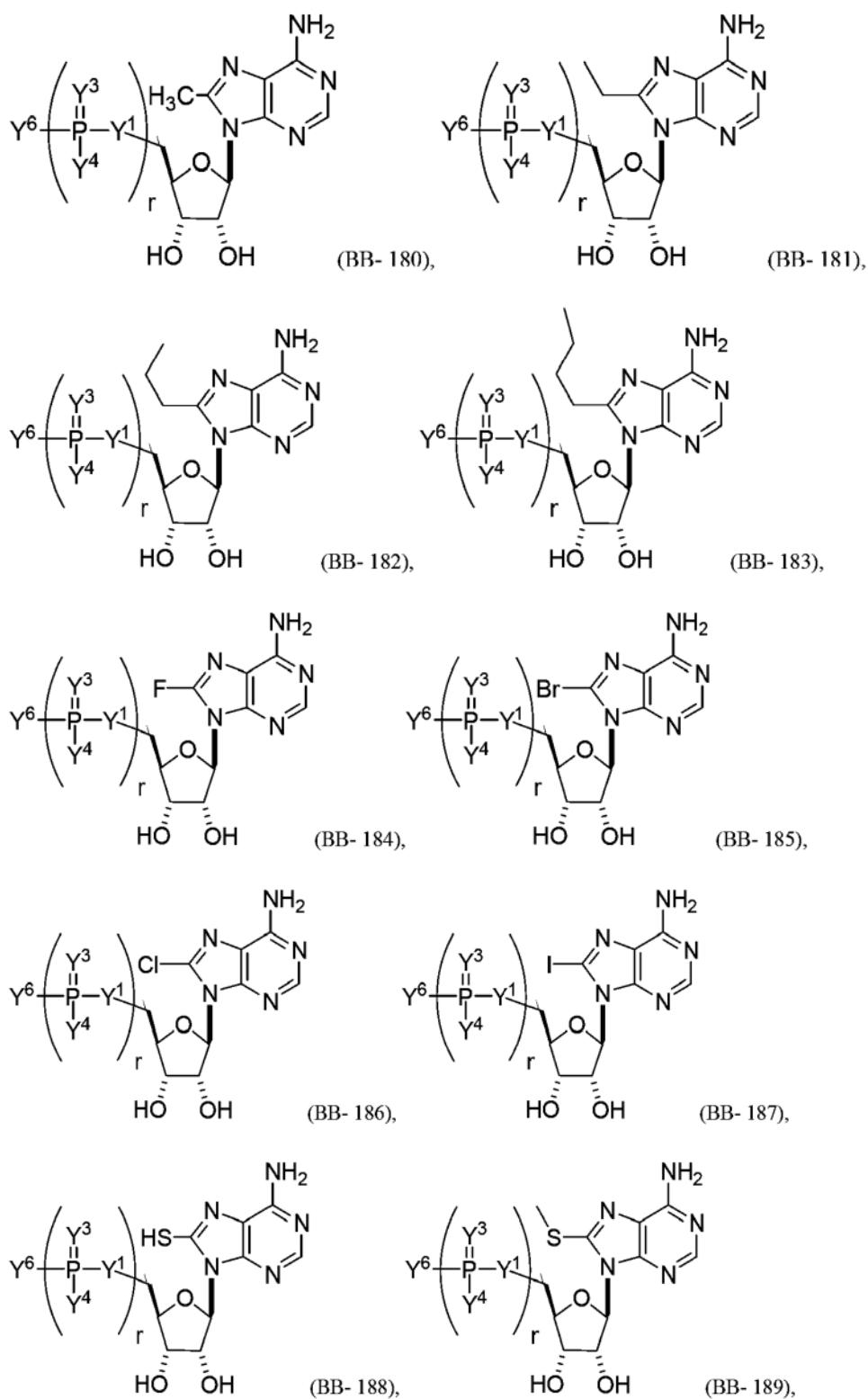
15 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

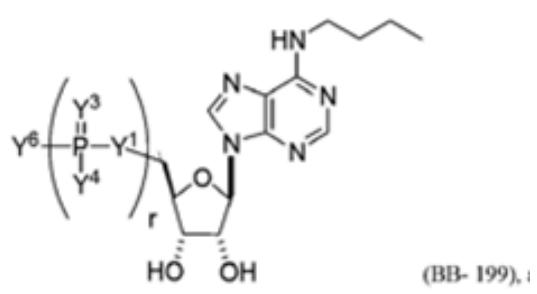
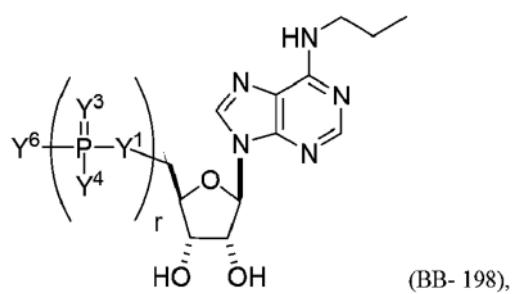
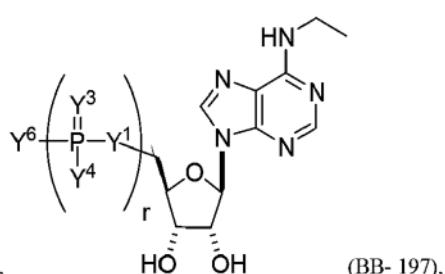
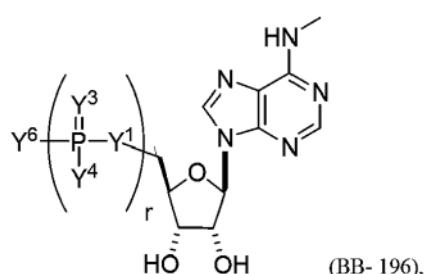
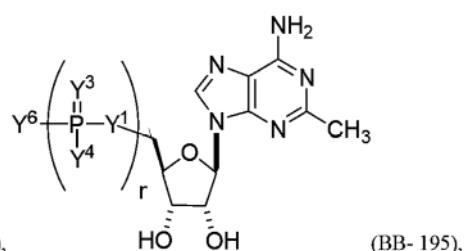
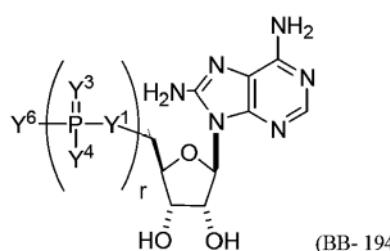
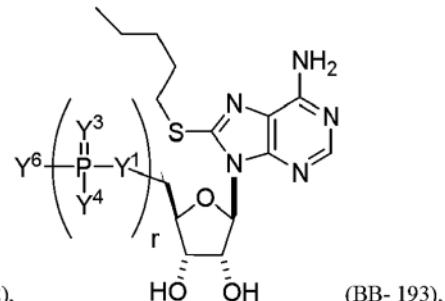
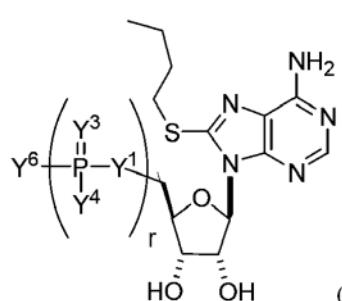
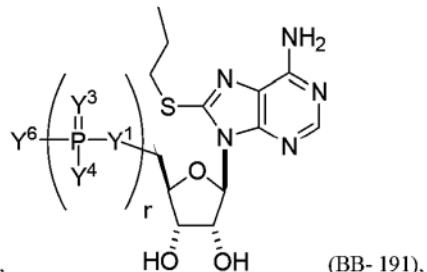
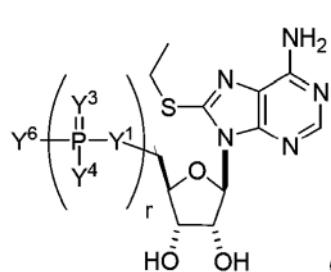
20 En algunos aspectos, la molécula de bloque de construcción, que puede incorporarse en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm, es una adenosina modificada (por ejemplo, que se selecciona del grupo que consiste en:

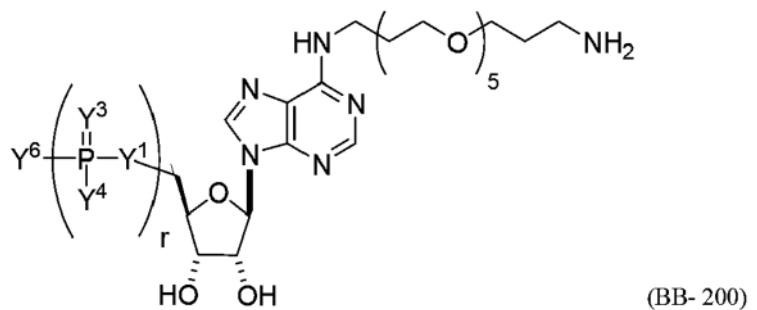






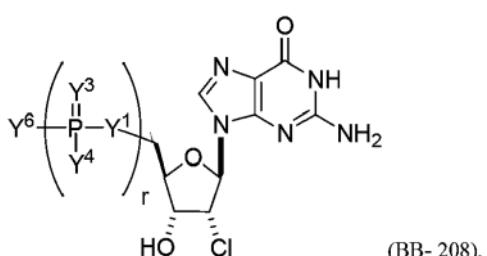
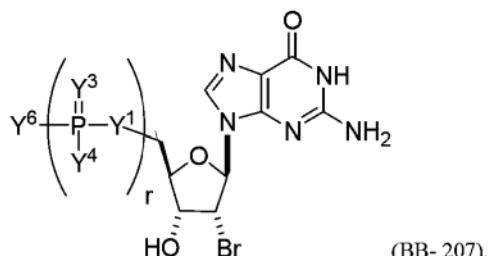
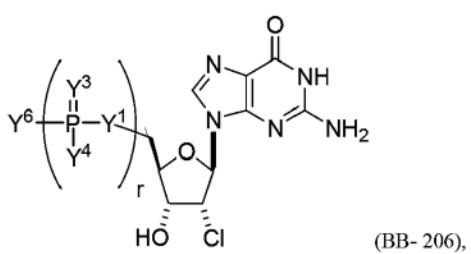
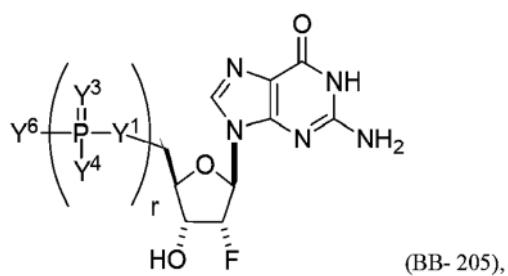
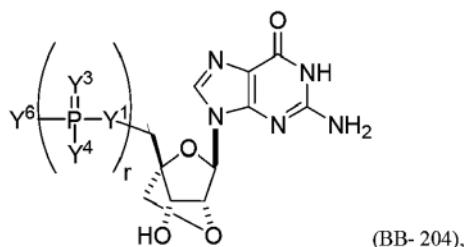
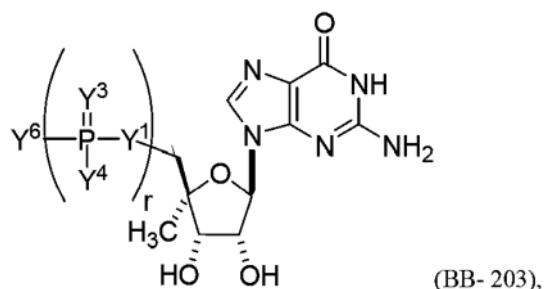
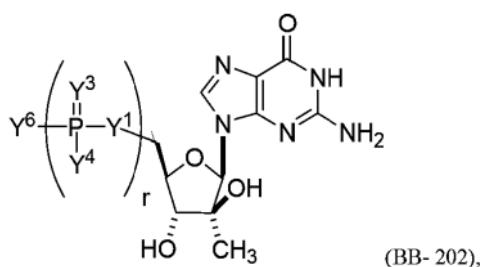
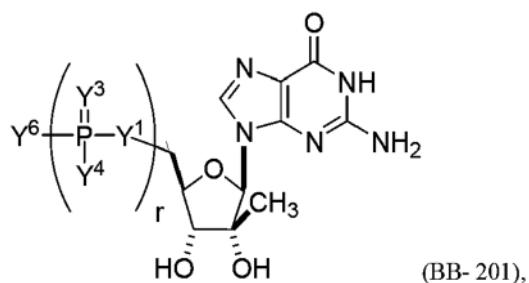


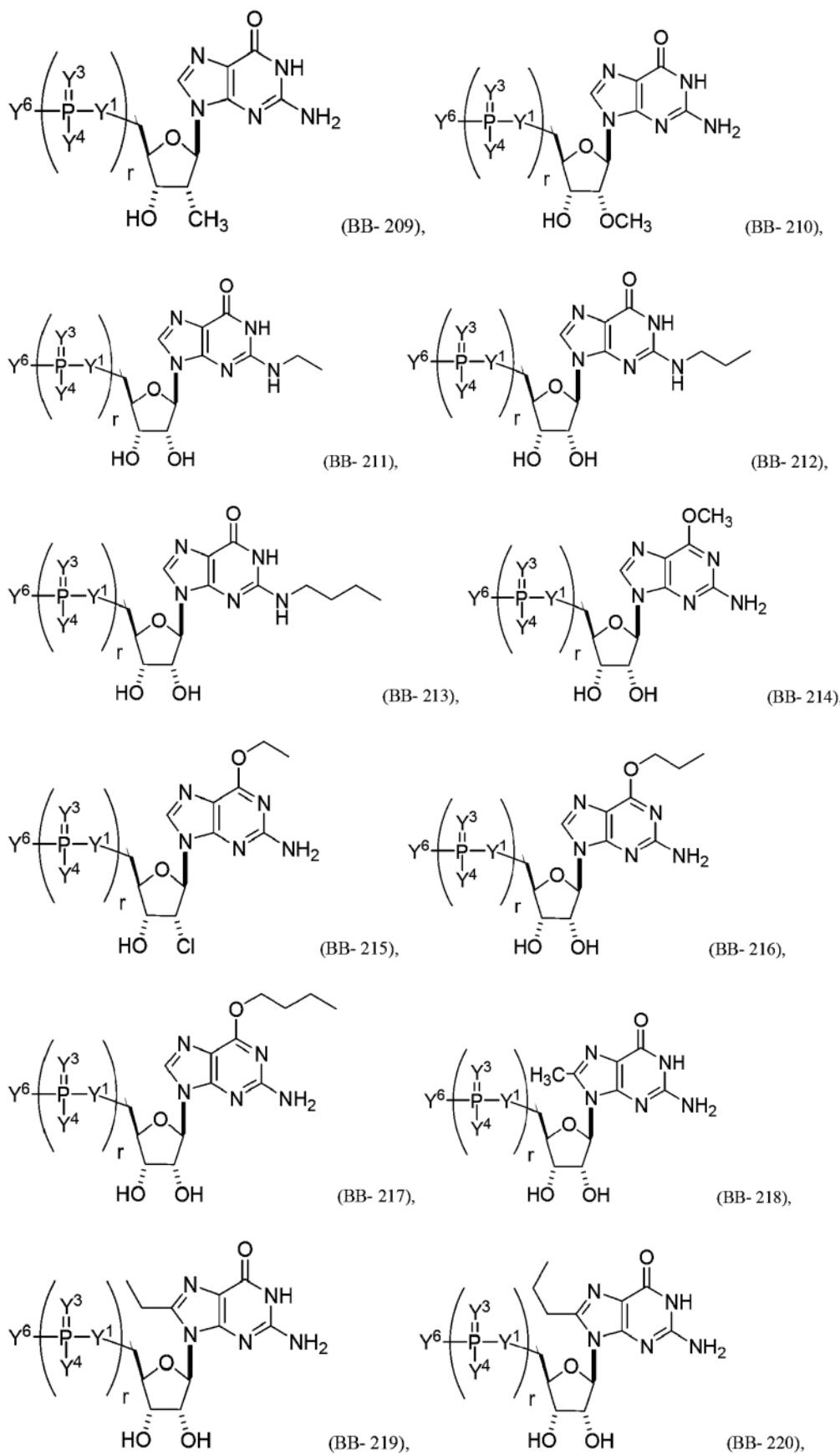


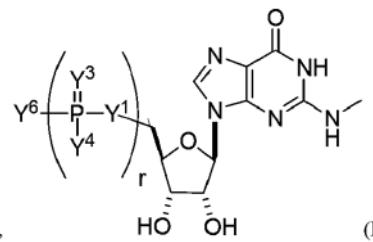
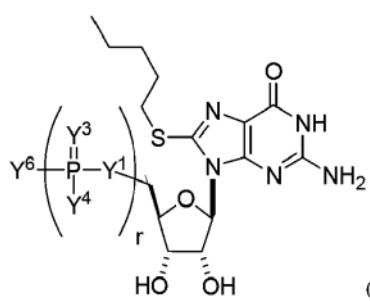
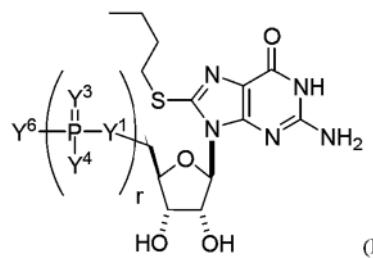
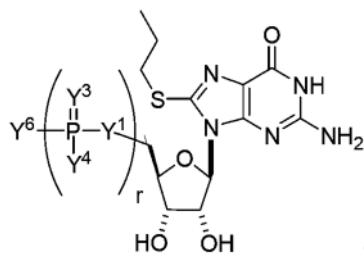
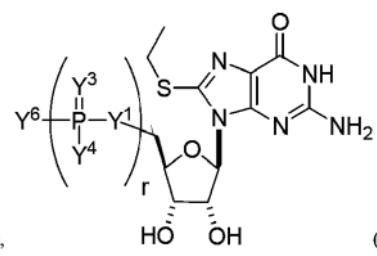
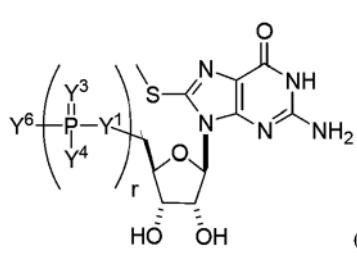
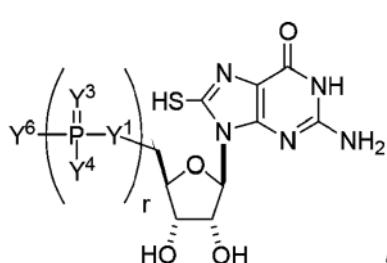
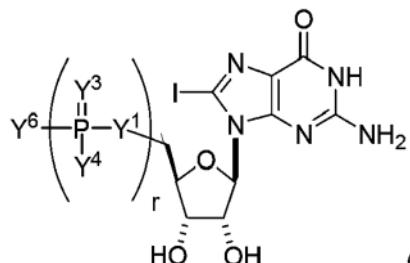
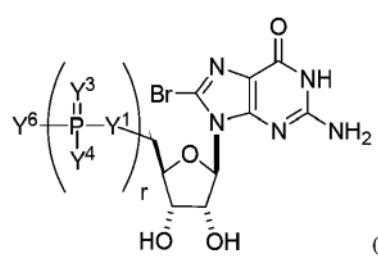
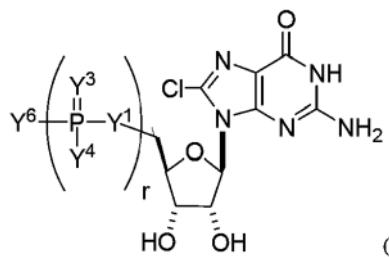
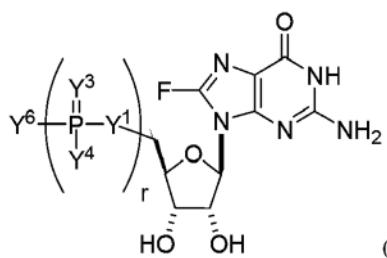
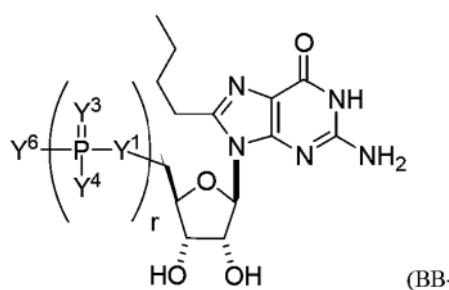


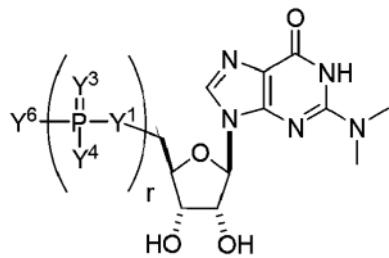
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde Y^1 , Y^3 , Y^4 , Y^6 y r son como se describe en esta invención (por ejemplo, cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5, tal como de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5)).

En algunos aspectos, la molécula de bloque de construcción, que puede incorporarse en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNm, es una guanosina modificada (por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste en:

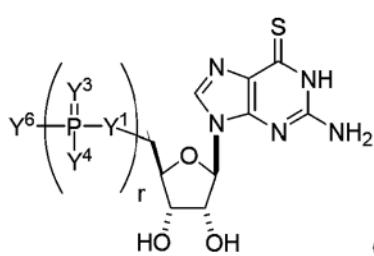




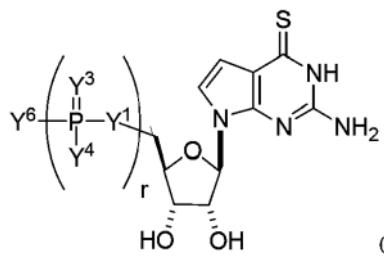




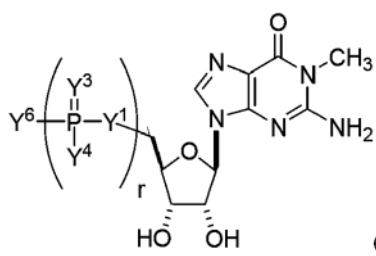
(BB- 233),



(BB- 234),

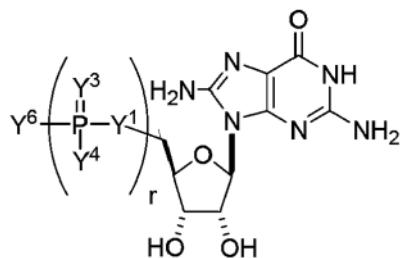


5 (BB- 235),



(BB- 236),

y

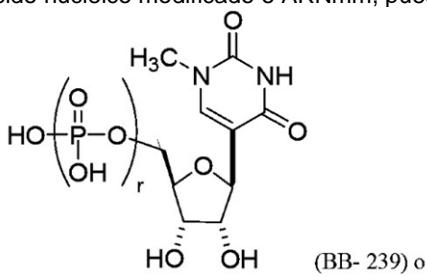
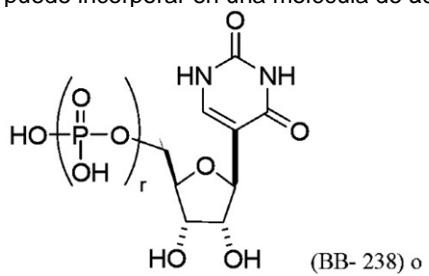


(BB- 237),

10

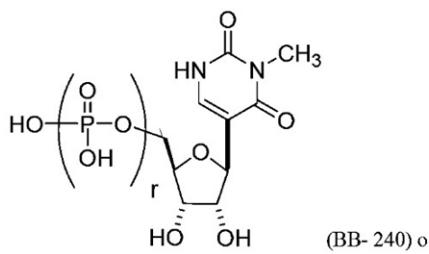
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶ y r son como se describe en esta invención (por ejemplo, cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5, tal como de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5)).

- 15 En algunos aspectos, la modificación química puede incluir el reemplazo del grupo C en C-5 del anillo (por ejemplo, para un nucleósido de pirimidina, tal como citosina o uracilo) con N (por ejemplo, el reemplazo del grupo >CH en C-5 con un grupo >NR^{N1}, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido). Por ejemplo, la molécula ARNmm, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNm, puede ser:

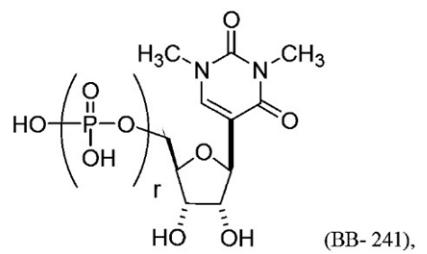


(BB- 238) o

(BB- 239) o



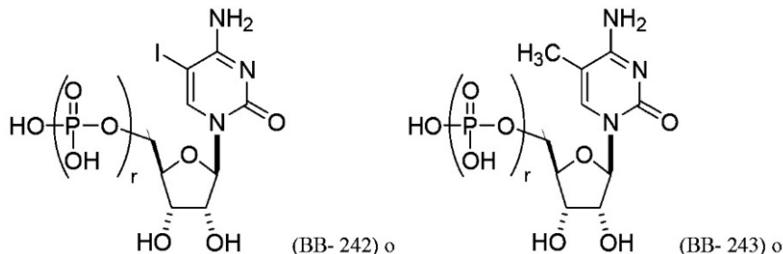
(BB- 240) o



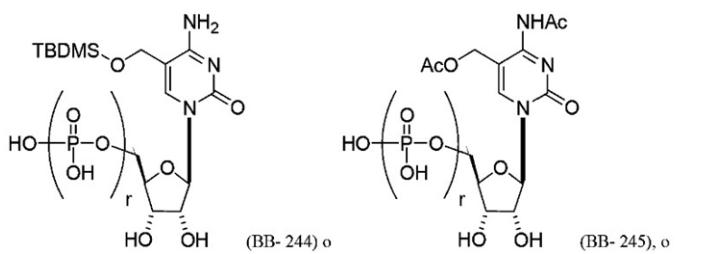
(BB- 241),

o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

- 5 En otro aspecto, la modificación química puede incluir el reemplazo del hidrógeno en C-5 de citosina con halo (p. ej., Br, Cl, F o I) o alquilo opcionalmente sustituido (p. ej., metilo). Por ejemplo, la molécula de ARNmm, que se puede incorporar en un ácido nucleico modificado o ARNmm, puede ser:



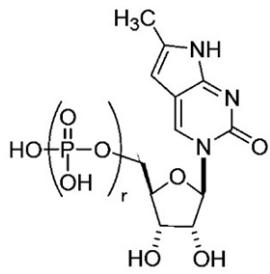
10



sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

15

En aun otro aspecto, la modificación química puede incluir un anillo fusionado que está formado por el NH₂ en la posición C-4 y el átomo de carbono en la posición C-5. Por ejemplo, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm puede ser:



20

o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

25 **Modificaciones relativas al azúcar**

Los nucleósidos y nucleótidos modificados (por ejemplo, moléculas de bloque de construcción), que se pueden incorporar en un ácido nucleico modificado o ARNmm (por ejemplo, ARN o ARNm, tal como se describe en esta invención), se pueden modificar en el azúcar del ácido ribonucleico. Por ejemplo, el grupo hidroxilo 2' (OH) se puede modificar o reemplazar con una cantidad de sustituyentes diferentes. Los ejemplos de sustituciones en la posición 2' incluyen, de modo no taxativo, H, halo, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido; ariloxi C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido; cicloalquilo C₃₋₈ opcionalmente sustituido; cicloalcoxi C₃₋₈ opcionalmente sustituido; ariloxi C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido; arilalcoxi C_{6-10-C1-6} opcionalmente sustituido, (heterociclico)oxi C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido; un azúcar (por ejemplo, ribosa, pentosa o cualquiera descrito en esta invención); un polietilenglicol (PEG), -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR, donde R es H o alquilo opcionalmente sustituido, y n es un número entero de 0 a 20 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 8, de 0 a 10, de 0 a 16, de 1 a 4, de 1 a 8, de 1 a 10, de 1 a 16, de 1 a 20, de 2 a 4, de 2 a 8, de 2 a 10, de 2 a 16, de 2 a 20, de 4 a 8, de 4 a 10, de 4 a 16 y de 4 a 20); ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) en los que el 2'-hidroxilo está conectado por un puente alquíleno C₁₋₆ o heteroalquíleno C₁₋₆ al

carbono 4' del mismo azúcar de ribosa, donde los ejemplos de puentes incluyen metileno, propileno, éter o puentes amino; aminoalquilo, como se define en esta invención; aminoalcoxi, como se define en esta invención; amino como se define en esta invención; y aminoácido, como se define en esta invención

- 5 Generalmente, el ARN incluye la ribosa del grupo de azúcar, que es un anillo de 5 miembros que tiene un oxígeno. Los ejemplos de nucleótidos modificados no taxativos incluyen remplazo del oxígeno en ribosa (por ejemplo, con S, Se o alquieno, tal como metileno o etileno); adición de un enlace doble (por ejemplo, para remplazar ribosa con ciclopentenilo o ciclohexenilo); contracción anular de ribosa (por ejemplo, para formar un anillo de 4 miembros de ciclobutano u oxetano); expansión anular de ribosa (por ejemplo, para formar un anillo de 6 o 7 miembros que tiene 10 un carbono o heteroátomo adicional, tal como para anhidrohexitol, altritol, manitol, ciclohexanilo, ciclohexenilo y morfolino que también tiene una estructura principal de fosforamidato); formas multicíclicas (por ejemplo, triciclo; y formas "desbloqueadas", tal como ácido nucleico de glicol (GNA) (por ejemplo, R-GNA o S-GNA, donde la ribosa se remplaza por unidades de glicol unidas a enlaces fosfodiéster), ácido nucleico (TNA, donde la ribosa se remplaza con α-L-treofuranosil-(3'→2')), y ácido核élico peptídico, (PNA, donde los enlaces 2-amino-etil-glicina reemplazan la 15 ribosa y la estructura principal de fosfodiéster). El grupo azúcar puede contener también uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta a la del carbono correspondiente en ribosa. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico modificado o ARNm puede incluir nucleótidos que contienen, por ejemplo, arabinosa, como el azúcar.

20 **Modificaciones a la Nucleobase**

La presente descripción proporciona nucleósidos y nucleótidos modificados. Tal como se describe en esta invención, "nucleósido" se define como un compuesto que contiene una molécula de azúcar (por ejemplo, una pentosa o ribosa) o un derivado de esta en combinación con una base orgánica (por ejemplo, una purina o pirimidina) o un derivado de 25 esta. Tal como se describe en esta invención, "nucleótido" se define como un nucleósido que incluye un grupo fosfato. Los nucleótidos modificados (por ejemplo ARNm) se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento útil, como se describe en esta invención (por ejemplo, química, enzimática o recombinantemente para incluir uno o más nucleósidos modificados o no naturales).

- 30 El emparejamiento de bases de nucleótidos modificados comprende no solo los pares de bases de adenosina-timina, adenosina-uracilo o guanosina-citosina estándar, sino también pares de bases formados entre nucleótidos y/o nucleótidos modificados que comprenden bases no estándar o modificadas, donde la disposición de donantes de enlace de hidrógeno y aceptores de enlace de hidrógeno permite la unión de hidrógeno entre una base no estándar y una base estándar o entre dos estructuras de base no estándar complementarias. Un ejemplo de tal emparejamiento 35 de bases no estándar es el emparejamiento de bases entre la inosina de nucleótido modificado y adenina, citosina o uracilo.

Los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir una nucleobase modificada. Los ejemplos de nucleobases que se encuentran en el ARN incluyen, pero no se limitan a, adenina, guanina, citosina y uracilo. Los ejemplos de 40 nucleobases que se encuentran en el ADN incluyen, pero no se limitan a, adenina, guanina, citosina y timina.

Estas nucleobases se pueden modificar o reemplazar completamente para proporcionar moléculas de ácidos nucleicos modificados o ARNm que tienen propiedades mejoradas, por ejemplo, resistencia a las nucleasas, a través de la interrupción de la unión de un compañero de unión de surco principal.

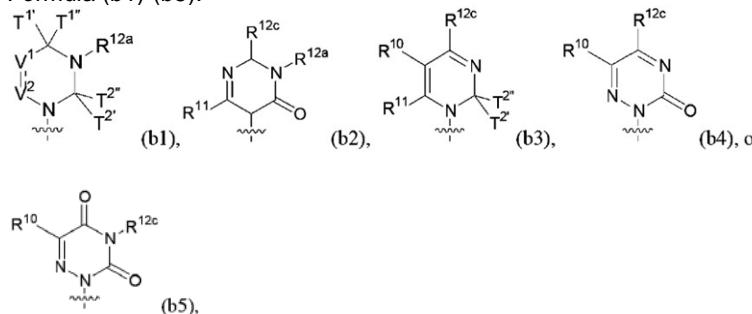
- 45 La Tabla 1 a continuación identifica las caras químicas de cada nucleótido canónico. Los círculos identifican los átomos que comprenden las regiones químicas respectivas.

Tabla 1

		Cara de surco principal	Cara de surco secundaria	Cara de emparejamiento de la base de Watson-Crick
Pirimidinas	Citidina:			
	Uridina:			

		Cara de surco principal	Cara de surco secundaria	Cara de emparejamiento de la base de Watson-Crick
Purinas	Adenosina:			
	Guanosina:			

En algunos aspectos, B es un uracilo modificado. Los uracilos modificados de ejemplo incluyen aquellos que tienen la Fórmula (b1)-(b5):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

10

es un enlace simple o doble;

15 cada uno de T¹, T¹, T² y T² es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido, o la combinación de T¹ y T¹ o la combinación de T² y T² se unen (por ejemplo, como en T²) para formar O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

20 cada uno de V¹ y V² es, independientemente, O, S, N(R^{vb})_{nv}, o C(R^{vb})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{vb} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenilloxi opcionalmente sustituido, alquinilloxi opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinolino opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo), aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinolino opcionalmente sustituido, acilaminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo N-protector, tal como se describe en esta invención, trifluoroacetilo), alcoxycarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquinilo opcionalmente sustituido o alcoxycarbonilalcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituidos con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como los seleccionados en (1)-(21) para alquilo);

25

30

35

R¹⁰ es H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido,

R¹⁰ es H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido,

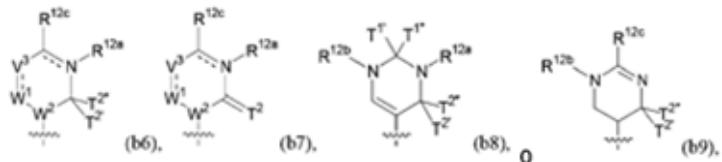
alcoxicarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquenilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido;

5 R¹¹ es H o alquilo opcionalmente sustituido;

R^{12a} es H, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con hidroxi), carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido; y

R^{12c} es H, halo, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido.

Otros uracilos modificados de ejemplo incluyen aquellos que tienen la Fórmula (b6)-(b9):



20 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

—

25 es un enlace simple o doble;

cada uno de T¹, T^{1'}, T² y T^{2'} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido, o la combinación de T¹ y T^{1'} se unen (por ejemplo, como en T¹) o la combinación de T² y T^{2'} se unen (por ejemplo, como en T²) para formar O (oxo), S (tio) o Se (seleno), o cada T¹ y T² es, independientemente, O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

cada uno de W¹ y W² es, independientemente, N(R^{Wa})_{nw} o C(R^{Wa})_{nw}, donde nw es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Wa} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido;

35 cada V³ es, independientemente, O, S, N(R^{Va})_{nv} o C(R^{Va})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Va} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, heterociclo opcionalmente sustituido, alqheterociclo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido o alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo, o sulfoalquilo), aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, acilaminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo), alcoxicarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquenilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con hidroxi y/o un grupo protector O), carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como aquellos seleccionados de (1)-(21) para alquilo), y donde R^{Va} y R^{12c} tomados junto con los átomos de carbono a los que están unidos pueden formar cicloalquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heterociclo opcionalmente sustituido (por ejemplo, un anillo de 5 o 6 miembros);

55 R^{12a} es H, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con hidroxi y/o un grupo protector O), carboxialcoxi opcionalmente sustituido,

carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido, carbamoilalquilo opcionalmente sustituido o ausente;

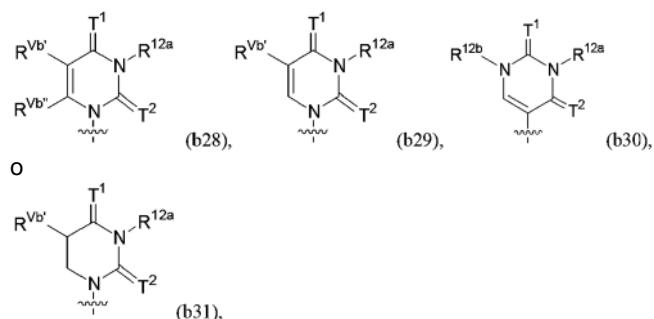
R^{12b} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente

5 sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo
opcionalmente sustituido, alcarilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, alqueterociclico
opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, alcoxcarbonilacilo opcionalmente sustituido,
alcoxcarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxcarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxcarbonilalquenilo
opcionalmente sustituido, alcoxcarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxcarbonilalquilalcoxi opcionalmente
10 sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con hidroxi y/o un grupo O-
protector), carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido, o carbamoilalquilo
opcionalmente sustituido.

15 donde la combinación de R^{12b} y T^1 o la combinación de R^{12b} y R^{12c} pueden unirse para formar heterociclo optionalmente sustituido; y

R^{12c} es H, halo, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido.

20 Los uracilos modificados de ejemplo adicionales incluyen aquellos que tienen la Fórmula (b28)-(b31):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

cada uno de T¹ y T² es, independientemente, O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

30 cada R^{Vb} y $R^{Vb''}$ es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi 35 opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo N-protector, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo), aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, acilaminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo N-protector, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo), 40 alcoxcarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxcarbonilalquenilo opcionalmente sustituido, alcoxcarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxcarbonilacilo opcionalmente sustituido, alcoxcarbonilalcoxil 45 opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con hidroxi y/o un grupo O-protector), carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, como los seleccionados de (1)-(21) para alquilo) (por ejemplo, R^{Vb} es alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, o aminoalquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera de los descritos en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo);

R^{12a} es H, alquilo opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo), aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido; y

R^{12b} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente

sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo), alcoxicarbonilacilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquenilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido.

5 En aspectos particulares, T¹ es O (oxo), y T² es S (tio) o Se (seleno). En otros aspectos, T¹ es S (tio), y T² es O (oxo) o Se (seleno). En algunos aspectos, R^{Vb} es H, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido.

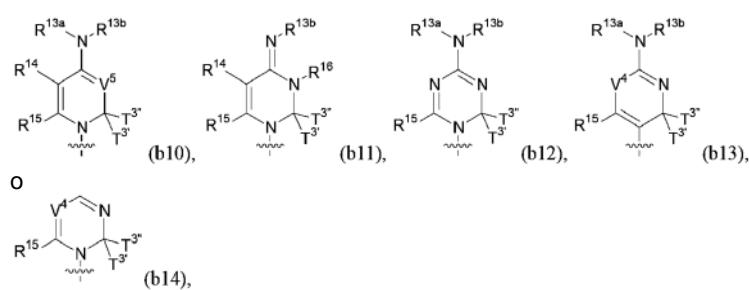
10 En otros aspectos, cada R^{12a} y R^{12b} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o hidroxialquilo opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, R^{12a} es H. En otros aspectos, tanto R^{12a} como R^{12b} son H.

15 En algunos aspectos, cada R^{Vb} de R^{12b} es, independientemente, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo), aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido o acilaminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo). En algunos aspectos, el amino y/o alquilo del aminoalquilo opcionalmente sustituido se sustituye con uno o más de alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, sulfoalquilo opcionalmente sustituido, carboxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de O), hidroxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de O), carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de O), alcoxicarbonilalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de O) o grupo protector de N. En algunos aspectos, el aminoalquilo opcionalmente sustituido se sustituye con un sulfoalquilo opcionalmente sustituido o un alquenilo opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, R^{12a} y R^{Vb} son ambos H. En aspectos particulares, T¹ es O (oxo), y T² es S (tio) o Se (seleno).

20 30 En algunos aspectos, R^{Vb} es alcoxicarbonilalquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido.

25 35 En aspectos particulares, el sustituyente opcional para R^{12a}, R^{12b}, R^{12c} o R^{Va} es un grupo polietilenglicol (por ejemplo, -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR¹, donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R¹ es H o alquilo C₁₋₂₀; o un grupo amino-polietilenglicol (por ejemplo, -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido).

40 45 En algunos aspectos, B es una citosina modificada. Los ejemplos de citosinas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b10)-(b14):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

50 55 cada uno de T^{3'} y T^{3''} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido, o la combinación de T^{3'} y T^{3''} se unen (por ejemplo, como en T³) para formar O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

cada V⁴ es, independientemente, O, S, N(R^{Vc})_{nv} o C(R^{Vc})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Vc} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo

opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, alqheterociclico opcionalmente sustituido o alquiniloxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como aquellos seleccionados de (1)-(21) para alquilo), donde la combinación de R^{13b} y R^{Vc} se puede tomar juntos para formar heterociclico opcionalmente sustituido;

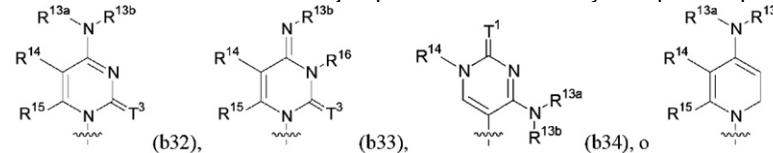
5 cada V⁵ es, independientemente, N(R^{Vd})_{nv} o C(R^{Vd})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Vd} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo 10 opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, alqheterociclico opcionalmente sustituido o alquiniloxi opcionalmente sustituida (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como aquellos seleccionados de (1)-(21) para alquilo) (por ejemplo, V⁵ es —CH o N);

15 cada uno de R^{13a} y R^{13b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, donde la combinación de R^{13b} y R¹⁴ se 20 puede tomar juntos para formar heterociclico opcionalmente sustituido;

20 cada R¹⁴ es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector O), hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, -NHR, donde R es H, alquilo, arilo o fosforilo), azido, arilo opcionalmente sustituido, 25 heterociclico opcionalmente sustituido, alqheterociclico opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquilo opcionalmente sustituido; y

30 cada uno de R¹⁵ y R¹⁶ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido o alquinilo opcionalmente sustituido.

Las citosinas modificadas de ejemplo adicionales incluyen aquellas que tienen la Fórmula (b32)-(b35):



(b35), o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

35 cada uno de T¹ y T³ es, independientemente, O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

cada uno de R^{13a} y R^{13b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente 40 sustituido, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, donde la combinación de R^{13b} y R¹⁴ se puede tomar juntos para formar heterociclico opcionalmente sustituido;

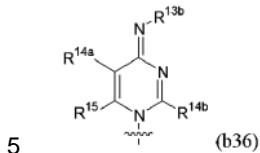
cada R¹⁴ es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente 45 sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector O), hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, amino 50 opcionalmente sustituido (por ejemplo, -NHR, donde R es H, alquilo, arilo o fosforilo), azido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, alqheterociclico opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, hidroxialquilo, alquilo, alquenilo o alquinilo), aminoalquenilo opcionalmente sustituido, o aminoalquinilo opcionalmente sustituido; y

cada uno de R¹⁵ y R¹⁶ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido o alquinilo opcionalmente sustituido (p. ej., R¹⁵ es H y R¹⁶ es H o alquilo opcionalmente sustituido).

55 En algunos aspectos, R¹⁵ es H y R¹⁶ es H o alquilo opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, R¹⁴ es H, acilo o hidroxialquilo. En algunos aspectos, R¹⁴ es halo. En algunos aspectos, tanto R¹⁴ como R¹⁵ son H. En algunos aspectos, tanto R¹⁵ como R¹⁶ son H. En algunos aspectos, cada uno de R¹⁴ y R¹⁵ y R¹⁶ es H. En casos adicionales,

cada uno de R^{13a} y R^{13b} es independientemente, H o alquilo opcionalmente sustituido.

Otros ejemplos no taxativos de citosinas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b36):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

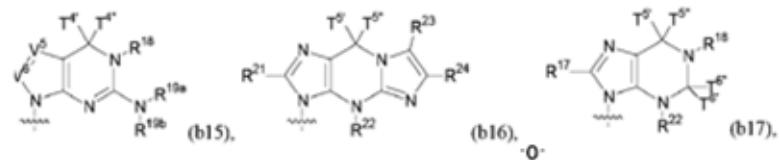
10 cada R^{13b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, donde la combinación de R^{13b} y R^{14b} puede tomarse en conjunto para formar heterociclico opcionalmente sustituido;

15 cada R^{14a} y R^{14b} es, independientemente, H, halo, hidroxi, tiol, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector O), hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, -NHR, donde R es H, alquilo, arilo, fosforilo, aminoalquilo opcionalmente sustituido o carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido), azido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, alqueterociclico opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido; y

25 cada uno de R¹⁵ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido o
alquinilo opcionalmente sustituido.

En aspectos particulares, R^{14b} es un aminoácido opcionalmente sustituido (p. ej., lisina opcionalmente sustituida). En algunos aspectos, R^{14a} es H.

30 En algunos aspectos, B es una guanina modificada. Los ejemplos de guaninas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b15)-(b17):



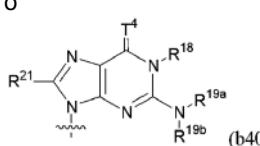
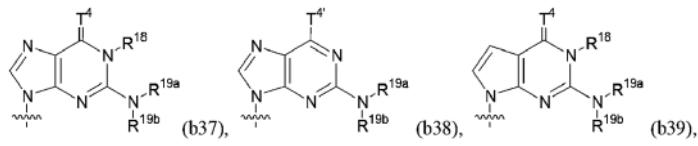
35 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

Cada uno de T^{4'}, T^{4"}, T^{5'}, T^{5"}, T^{6'}y T^{6"}es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, y donde la combinación de T^{4'} y T^{4"} (por ejemplo, como en T⁴) o la combinación de T^{5'} y T^{5"}(por ejemplo, como en T⁵) o la combinación de T^{6'} y T^{6"} se unen (por ejemplo, como en T⁶) forman O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

45 cada uno de V⁵ y V⁶ es, independientemente, O, S, N(R^{Vd})_{nv} o C(R^{Vd})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Vd} es, independientemente, H, halo, tiol, aminoácido opcionalmente sustituido, ciano, amidina, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como los seleccionados de (1)-(21) para alquilo), tioalcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido; y

50 cada uno de R¹⁷, R¹⁸, R^{19a}, R^{19b}, R²¹, R²², R²³ y R²⁴ es, independientemente, H, halo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido o aminoácido opcionalmente sustituido.

Los ejemplos de guanosinas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b37)-(b40):



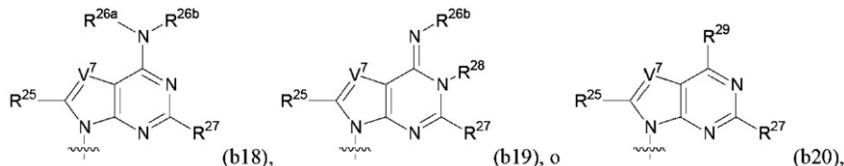
o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

10 cada uno de T^{4'} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, y cada T⁴ es, independientemente, O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

15 cada uno de R¹⁸, R^{19a}, R^{19b} y R²¹ es, independientemente, H, halo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido o aminoácido opcionalmente sustituido.

En algunos aspectos, R¹⁸ es H o alquilo opcionalmente sustituido. En aspectos adicionales, T⁴ es oxo. En algunos aspectos, cada uno de R^{19a} y R^{19b} es, independientemente, H o alquilo opcionalmente sustituido.

20 En algunos aspectos, B es una adenina modificada. Los ejemplos de adeninas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b18)-(b20):



25 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

30 cada V⁷ es, independientemente, O, S, N(R^{Ve})_{nv} o C(R^{Ve})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Ve} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido o alquiniloxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como aquellos seleccionados de (1)-(21) para alquilo);

35 cada R²⁵ es, independientemente, H, halo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

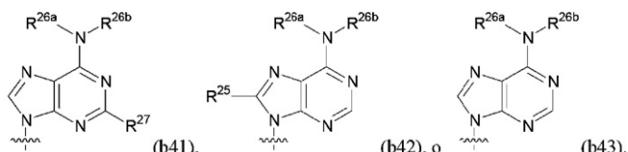
40 cada uno de R^{26a} y R^{26b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, carbamoilalquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o grupo polietilenglicol (por ejemplo, -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR'), donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀; o un grupo amino-polietilenglicol (por ejemplo, -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido);

45 cada R²⁷ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

cada R²⁸ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido o alquinilo opcionalmente sustituido; y

- 5 cada R²⁹ es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, carbamoilalquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido.

- 10 Los ejemplos de adeninas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b41)-(b43):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

- 15 cada R²⁵ es, independientemente, H, halo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

20 cada uno de R^{26a} y R^{26b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, carbamoilalquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o grupo polietilenglicol (por ejemplo, -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR'), donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀; o un grupo amino-polietilenglicol (por ejemplo, -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido); y

25

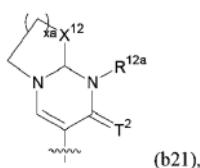
30 cada R²⁷ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido.

35 180 En algunos aspectos, R^{26a} es H y R^{26b} es alquilo opcionalmente sustituido. En algunos aspectos, cada uno de R^{26a} y R^{26b} es, independientemente, alquilo opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, R²⁷ es alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido. En otros aspectos, R²⁵ es alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido.

40 En aspectos particulares, el sustituyente opcional para R^{26a}, R^{26b} o R²⁹ es un grupo polietilenglicol (por ejemplo, -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR'), donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀; o un grupo amino-polietilenglicol (por ejemplo, -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido).

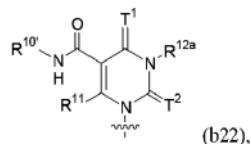
45

En algunos aspectos, B puede tener la Fórmula (b21):

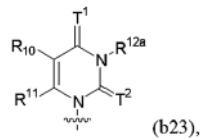


- 50 donde X^{12} es, independientemente, O, S, alquíleno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalquíleno opcionalmente sustituido, x_1 es un número entero de 0 a 3 y R^{12a} y T^2 son como se describe en esta invención.

En algunos aspectos, B puede tener la Fórmula (b22):

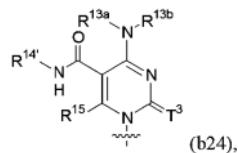


- 5 donde $R^{10'}$ es, independientemente, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquenilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido, y R^{11} , R^{12a} , T^1 y T^2 se describen en esta invención.
- 10
- 15



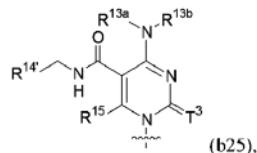
- 20 donde R^{10} es heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, furilo opcionalmente sustituido, tienilo opcionalmente sustituido o pirrolilo opcionalmente sustituido), arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido o naftilo opcionalmente sustituido) o cualquier sustituyente descrito en esta invención (por ejemplo, para R^{10}); y donde R^{11} (por ejemplo, H o cualquier sustituyente descrito en esta invención), R^{12a} (por ejemplo, H o cualquier sustituyente descrito en esta invención), T^1 (por ejemplo, oxo o cualquier sustituyente descrito en esta invención) y T^2 (por ejemplo, oxo o cualquier sustituyente descrito en esta invención) son como se describe en esta invención.

- 25 En algunos aspectos, B puede tener la Fórmula (b24):



- 30 donde $R^{14'}$ es, independientemente, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclico opcionalmente sustituido, alcarilo opcionalmente sustituido, alqheterociclico opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquenilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalcoxi opcionalmente, carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente, y R^{13a} , R^{13b} , R^{15} y T^3 como se describe en esta invención.
- 35

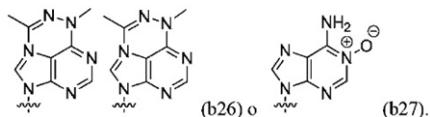
En algunos aspectos, B puede tener la Fórmula (b25):



- 40 donde $R^{14'}$ es heterociclico opcionalmente sustituido (por ejemplo, furilo opcionalmente sustituido, tienilo opcionalmente sustituido o pirrolilo opcionalmente sustituido), arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido o naftilo opcionalmente sustituido) o cualquier sustituyente descrito en esta invención (por ejemplo, para R^{14} o $R^{14'}$); y donde R^{13a} (por ejemplo, H o cualquier sustituyente descrito en esta invención), R^{13b} (por ejemplo, H o

cualquier sustituyente descrito en esta invención), R¹⁵ (por ejemplo, H o cualquier sustituyente descrito en esta invención) y T³ (por ejemplo, oxo o cualquier sustituyente descrito en esta invención) son como se describe en esta invención.

- 5 En algunos aspectos, B es una nucleobase que se selecciona del grupo que consiste en citosina, guanina, adenina y uracilo. En algunos aspectos, B puede ser:



- 10 En algunos aspectos, la nucleobase modificada es un uracilo modificado. Los ejemplos de nucleobases y nucleósidos que tienen un uracilo modificado incluyen pseudouridina (ψ), ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 6-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-uridina (s²U), 4-tio-uridina (s⁴U), 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxuridina (ho⁵U), 5-aminoalil-uridina, 5-halo-uridina (por ejemplo, éster 5-yodo-uridina o 5-bromo-uridina), 3-metil-uridina (m³U), 5-metoxi-uridina (mo⁵U), ácido uridina 5-oxiacético (cmo⁵U), ácido uridina 5-oxiacético éster de metilo (mcmo⁵U), 5-carboximetiluridina (cm⁵U), 1-carboximetil-pseudouridina, 5-carboximetiluridina (chm⁵U), 5-carboxihidroximetil-éster de metil uridina (mchm⁵U), 5-metoxicarbonilmethyl-uridina (mcm⁵U), 5-metoxicarbonilmethyl-2-tio-uridina (mcm⁵s²U), 5-aminometil-2-tio-uridina (nm⁵s²U), 5-metilaminometil-uridina (mn⁵U), 5-metilaminometil-2-tio-uridina (mn⁵s²U), 5-metilaminometil-2-seleno-uridina (mn⁵se²U), 5-carbamoilmetil-uridina (ncm⁵U), 5-carboximetilaminometil-uridina (cmm⁵U), 5-carboximetilaminometil-2-tio-uridina (cmm⁵s²U), 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometil-uridina (tm⁵U), 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina (tm⁵s²U), 1-taurinometil-4-tio-pseudouridina, 5-metil-uridina (m⁵U, i.e., que tiene la desoxitimina de nucleobase), 1-metil-pseudouridina (m¹ ψ), 5-metil-2-tio-uridina (m⁵s²U), 1-metil-4-tio-pseudouridina (m¹s⁴ ψ), 4-tio-1-metil-pseudouridina, 3-metil-pseudouridina (m³ ψ), 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidrouridina (D), dihidropseudouridina, 5,6-dihidrouridina, 5-metil-dihidrouridina (m⁵D), 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxi-uridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 3-(3-amino-3-carboxipropyl)uridina (acp³U), 1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropyl)pseudouridina (acp³ ψ), 5-(isopentenilaminometil)uridina (inm⁵U), 5-(isopentenilaminometil)-2-tio-uridina (inm⁵s²U), α -tio-uridina, 2'-O-metil-uridina (Um), 5,2'-O-dimetil-uridina (m⁵Um), 2'-O-metil-pseudouridina (ψ m), 2-tio-2'-O-metil-uridina (s²Um), 5-metoxicarbonilmethyl-2'-O-metil-uridina (mcm⁵Um), 5-carbamoilmetil-2'-O-metil-uridina (ncm⁵Um), 5-carboximetilaminometil-2'-O-metil-uridina (cmm⁵Um), 3,2'-O-dimetil-uridina (m³Um), 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metil-uridina (inm⁵Um), 1-tio-uridina, desoxitimidina, 2'-F-ara-uridina, 2'-F-uridina, 2'-OH-ara-uridina, 5-(2-carbometoxivinil) uridina, y 5-[3-(1-E-propenilamino)uridina].

- 35 En algunos aspectos, la nucleobase modificada es una citosina modificada. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una citosina modificada incluyen 5-aza-citidina, 6-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina (m³C), N4-acetil-citidina (ac⁴C), 5-formil-citidina (f⁵C), N4-metil-citidina (m⁴C), 5-metil-citidina (m⁵C), 5-halo-citidina (por ejemplo, 5-yodo-citidina), 5-hidroximetil-citidina (hm⁵C), 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina (s²C), 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina, 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina, lisidina (k₂C), α -tio-citidina, 2'-O-metil-citidina (Cm), 5,2'-O-dimetil-citidina (m⁵Cm), N4-acetyl-2'-O-metil-citidina (ac⁴Cm), N4,2'-O-dimetil-citidina (m⁴Cm), 5-formil-2'-O-metil-citidina (f⁵Cm), N4,N4,2'-O-trimetil-citidina (m⁴₂Cm), 1-tio-citidina, 2'-F-ara-citidina, 2'-F-citidina, y 2'-OH-ara-citidina.

- 45 En algunos aspectos, la nucleobase modificada es una adenina modificada. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una adenina modificada incluyen 2-amino-purina, 2, 6-diaminopurina, 2-amino-6-halo-purina (por ejemplo, 2-amino-6-cloro-purina), 6-halo-purina (por ejemplo, 6-cloro-purina), 2-amino-6-metil-purina, 8-azido-adenosina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-amino-purina, 7-deaza-8-aza-2-amino-purina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metil-adenosina (m¹A), 2-metil-adenina (m²A), N6-metil-adenosina (m⁶A), 2-metiltio-N6-metil-adenosina (ms²m⁶A), N6-isopentenil-adenosina (i⁶A), 2-metiltio-N6-isopentenil-adenosina (ms²i⁶A), N6-(cis-hidroxíisopentenil)adenosina (io⁶A), 2-metiltio-N6-(cis-hidroxíisopentenil)adenosina (ms²io⁶A), N6-glicinilcarbamoil-adenosina (g⁶A), N6-treonilcarbamoil-adenosina (t⁶A), N6-metil-N6-treonilcarbamoil-adenosina (m⁶t⁶A), 2-metiltio-N6-treonilcarbamoil-adenosina (ms²g⁶A), N6,N6-dimetil-adenosina (m⁶₂A), N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenosina (hn⁶A), 2-metiltio-N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenosina (ms²hn⁶A), N6-acetyl-adenosina (ac⁶A), 7-metil-adenina, 2-metiltio-adenina, 2-metoxi-adenina, α -tio-adenosina, 2'-O-metil-adenosina (Am), N6,2'-O-dimetil-adenosina (m⁶Am), N6,N6,2'-O-trimetil-adenosina (m⁶₂Am), 1,2'-O-dimetil-adenosina (m¹Am), 2'-O-ribosiladenosina (fosfato) (Ar(p)), 2-amino-N6-metil-purina, 1-tio-adenosina, 8-azido-adenosina, 2'-F-ara-adenosina, 2'-F-adenosina, 2'-OH-ara-adenosina, y N6-(19-amino-pentaoxanonadecil)-adenosina.

- 60 En algunos casos, la nucleobase modificada es una guanina modificada. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una guanina modificada incluyen inosina (I), 1-metil-inosina (m¹I), wiosina (imG), metilwiosina (mimG), 4-

demetil-wiosina (imG-14), isowiosina (imG2), wibutosina (yW), peroxywibutosina (o_2yW), hidroxiwibutosina (OH yW), hidroxiwibutosina submodificada (OH yW^*), 7-deaza-guanosina, queuosina (Q), epoxiqueuosina (oQ), galactosiqueuosina (galQ), manosil-queuosina (manQ), 7-ciano-7-deaza-guanosina (preQ₀), 7-aminometil-7-deaza-guanosina (preQ₁), arqueosina (G⁺), 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina ($m^7\text{G}$), 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metil-inosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metil-guanosina ($m^1\text{G}$), N2-metil-guanosina ($m^2\text{G}$), N2,N2-dimetil-guanosina ($m^2_2\text{G}$), N2,7-dimetil-guanosina ($m^{2,7}\text{G}$), N2, N2,7-dimetil-guanosina ($m^{2,2,7}\text{G}$), 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina, α -tio-guanosina, 2'-O-metil-guanosina (Gm), N2-metil-2'-O-metil-guanosina ($m^2\text{Gm}$), N2,N2-dimetil-2'-O-metil-guanosina ($m^2_2\text{Gm}$), 1-metil-2'-O-metil-guanosina ($m^1\text{Gm}$), N2,7-dimetil-2'-O-metil-guanosina ($m^{2,7}\text{Gm}$), 2'-O-metil-inosina (Im), 1,2'-O-dimetil-inosina ($m^1\text{Im}$), 2'-O-ribosilguanosina (fosfato) (Gr(p)), 1-tio-guanosina, O6-metil-guanosina, 2'-F-ara-guanosina, y 2'-F-guanosina.

La nucleobase del nucleótido se puede seleccionar independientemente de una purina, una pirimidina, un analógico de purina o pirimidina. Por ejemplo, la nucleobase se puede seleccionar independientemente de adenina, citosina, guanina, uracilo o hipoxantina. En otro aspecto, la nucleobase también puede incluir, por ejemplo, derivados sintéticos y de origen natural de una base, que incluyen pirazolo[3,4-d]pirimidinas, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracil (pseudouracil), 4-tiouracilo, 8-halo (por ejemplo, 8-bromo), 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8 adeninas y guaninas sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otras 5 uracilo y citosinas sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, deazaguanina, 7-deazaguanina, 3-deazaguanina, deazaadenina, 7-deazaadenina, 3-deazaadenina, pirazolo[3,4-d]pirimidina, imidazo[1,5-a]1,3,5 triazinonas, 9-dezapurinas, imidazo[4,5-d]pirazinas, tiazolo[4,5-d]pirimidinas, pirazin-2-onas, 1,2,4-triazina, piridazina; y 1,3,5 triazina. Cuando los nucleótidos se representan usando la abreviatura A, G, C, T o U, cada letra se refiere a la base representativa y/o derivados de esta, *por ejemplo*, A incluye adenina o análogos de adenina, *por ejemplo*, 7-deaza adenina).

Modificaciones en el enlace internucleósido

Los nucleósidos y nucleótidos modificados, que pueden incorporarse en una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm, pueden modificarse en el enlace internucleósido (por ejemplo, estructura principal de fosfato). Los grupos fosfato de la estructura principal se pueden modificar reemplazando uno o más de los átomos de oxígeno con un sustituyente diferente. Además, los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir el reemplazo al por mayor de un resto fosfato no modificado con un fosfato modificado como se describe en esta invención. Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, fosforotioato, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosforodiamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no ligantes reemplazados por azufre. El enlazador de fosfato también se puede modificar mediante el reemplazo de un oxígeno de enlace con nitrógeno (fosforamidatos unidos), azufre (fosforotioatos unidos) y carbono (metileno-fosfonatos unidos).

El resto de fosfato sustituido con α -tio se proporciona para conferir estabilidad a los polímeros de ARN y ADN a través de los enlaces de estructura principal de fosforotioato no naturales. El ADN y el ARN de fosforotioato han aumentado la resistencia a las nucleasas y, posteriormente, una vida media más larga en un entorno celular. Se espera que las moléculas de ácidos nucleicos modificados unidos de fosforotioato o ARNmm también reduzcan la respuesta inmunitaria innata a través de una unión/activación más débil de moléculas inmunitarias celulares.

En aspectos específicos, un nucleósido modificado incluye un alfa-tionucleósido (por ejemplo, 5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina (α -tio-citidina), 5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-uridina o 5'-O-(1-tiofosfato)-pseudouridina).

Combinaciones de azúcares modificados, nucleobases y enlaces entre nucleósidos

Los ácidos nucleicos modificados y ARNmm de la descripción pueden incluir una combinación de modificaciones al azúcar, la nucleobase y/o el enlace internucleósido. Estas combinaciones pueden incluir cualquiera de una o más modificaciones descritas en esta invención. Por ejemplo, cualquiera de los nucleótidos descritos en esta invención en las Fórmulas (Ia), (Ia-1)-(Ia-3), (Ib)-(If), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVI), y (IXa)-(IXr) puede combinarse con cualquiera de las nucleobases descritas en esta invención (por ejemplo, en las Fórmulas (b1)-(b43) o cualquier otra descripción en esta invención).

Síntesis de moléculas de ácidos nucleicos modificados y ARNmm

Las moléculas de ácido nucleico modificado y ARNmm para su uso de acuerdo con la descripción se pueden preparar de acuerdo con cualquier técnica útil, tal como se describe en esta invención. Los nucleósidos y nucleótidos

- modificados utilizados en la síntesis de moléculas de ácido nucleico modificado y ARNmm descritos en esta invención se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes métodos y procedimientos generales. Cuando se proporcionan condiciones de proceso típicas o preferidas (por ejemplo, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, solventes, presiones, etc.), un experto en la técnica sería capaz de optimizar y desarrollar condiciones de proceso adicionales. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o solvente particular usados, pero tales condiciones pueden determinarse por un experto en la materia mediante procedimientos de optimización rutinarios.
- Los procesos descritos en esta invención se pueden monitorear de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto se puede monitorear por medios espectroscópicos, tal como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ^1H o ^{13}C) espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, visible por UV), o espectrometría de masas, o por cromatografía tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de capa fina.
- La preparación de moléculas de ácido nucleico modificado y ARNmm puede implicar la protección y desprotección de varios grupos químicos. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores adecuados. La química de los grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en Greene, y col., Protective Groups in Organic Synthesis, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991,
- Las reacciones de los procesos descritos en esta invención se pueden llevar a cabo en solventes adecuados, que se pueden seleccionar fácilmente por un experto en la materia de la síntesis orgánica. Los solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermedios o los productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del solvente hasta la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción dada se puede llevar a cabo en un solvente o una mezcla de más de un solvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, se pueden seleccionar solventes adecuados para una etapa de reacción particular.
- La resolución de mezclas racémicas de nucleósidos y nucleótidos modificados se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica. Un ejemplo de procedimiento incluye la recristalización fraccionada usando un "ácido de resolución quiral" que es un ácido orgánico ópticamente activo que forma sal. Los agentes de resolución adecuados para los procedimientos de recristalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L de ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido láctico o los diversos ácidos alcanforsulfónicos ópticamente activos. La resolución de mezclas racémicas también se puede llevar a cabo mediante elución en una columna rellena con un agente de resolución ópticamente activo (*p. ej.*, dinitrobenzoilfenilglicina). Un experto en la materia puede determinar la composición de solvente de elución adecuada.
- Los nucleósidos y nucleótidos modificados (por ejemplo, moléculas de bloque de construcción) se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos sintéticos descritos en Ogata y col., J. Org. Chem. 74:2585-2588 (2009); Purmal y col., Res. ácidos nucl. 22(1): 72-78, (1994); Fukuhara y col., Biochemistry, 1(4): 563-568 (1962); y Xu y col., Tetrahedron, 48(9): 1729-1740 (1992),
- El ácido nucleico modificado y ARNmm pueden modificarse o no de manera uniforme a lo largo de toda la longitud de la molécula. Por ejemplo, uno o más o todos los tipos de nucleótidos (por ejemplo, purina o pirimidina, o cualquiera o más o la totalidad de A, G, U, C) pueden modificarse o no uniformemente en un polinucleótido o en una región de secuencia predeterminada dada de este. En algunos aspectos, todos los nucleótidos X en un polinucleótido (o en una región de secuencia dada de este) se modifican, donde X puede ser cualquiera de los nucleótidos A, G, U, C o cualquiera de las combinaciones A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C o A+G+C.
- Pueden existir diferentes modificaciones de azúcar, modificaciones de nucleótidos y/o enlaces internucleósidos (por ejemplo, estructuras de estructura principal) en diversas posiciones en el ácido nucleico modificado y ARNmm. Un experto en la materia apreciará que los análogos de nucleótidos u otras modificaciones se pueden ubicar en cualquier posición o posiciones de un ácido nucleico modificado y ARNmm de modo que la función del ácido nucleico modificado y ARNmm no disminuya sustancialmente. Una modificación también puede ser una modificación de terminal 5' o 3'. El ácido nucleico modificado y ARNmm puede contener de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 100 % de nucleótidos modificados o cualquier porcentaje intermedio (por ejemplo, del 1 % al 20 %, del 1 % al 25 %, del 1 % al 50 %, del 1 % al 60 %, del 1 % al 70 %, del 1 % al 80 %, del 1 % al 90 %, del 1 % al 95 %, del 10 % al 20 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 70 %, del 10 % al 80 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 10 % al 100 %, del 20 % al 25 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 70 %, del 20 % al 80 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 70 %, del 50 % al 80 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 95 %, del 50 % al 100 %, del 70 % al 80 %, del 70 % al 90 %, del 70 % al 95 %, del 70 % al 100 %, del 80 % al 90 %, del 80 % al 95 %, del 80 % al 100 %, del 90 % al 95 %, del 90 % al 100 % y del 95 % al 100 %).

En algunos aspectos, el ácido nucleico modificado o ARNm incluye una pirimidina modificada (por ejemplo, un uracilo/uridina/U modificado o citosina/citidina/C modificada). En algunos aspectos, el uracilo o uridina en la molécula de ácido nucleico modificado o ARNm se puede reemplazar con aproximadamente del 1 % a aproximadamente el 100 % de un uracilo modificado o uridina modificada (por ejemplo, del 1 % al 20 %, del 1 % al 25 %, del 1 % al 50 %, del 1 % al 60 %, del 1 % al 70 %, del 1 % al 80 %, del 1 % al 90 %, del 1 % al 95 %, del 10 % al 20 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 70 %, del 10 % al 80 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 10 % al 100 %, del 20 % al 25 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 70 %, del 20 % al 80 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 70 %, del 50 % al 80 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 95 %, del 50 % al 100 %, del 70 % al 80 %, del 70 % al 90 %, del 70 % al 95 %, del 70 % al 100 %, del 80 % al 90 %, del 80 % al 95 %, del 80 % al 100 %, del 90 % al 95 %, del 90 % al 100 %, y del 95 % al 100 % de un uracilo modificado o uridina modificada). El uracilo o uridina modificado se puede reemplazar por un compuesto que tiene una única estructura o por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas, como se describe en esta invención). En algunos aspectos, la citosina o citidina en la molécula de ácido nucleico modificado o ARNm se puede reemplazar con aproximadamente del 1 % a 5

aproximadamente el 100 % de una citosina modificada o citidina modificada (por ejemplo, del 1 % al 20 %, del 1 % al 25 %, del 1 % al 50 %, del 1 % al 60 %, del 1 % al 70 %, del 1 % al 80 %, del 1 % al 90 %, del 1 % al 95 %, del 10 % al 20 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 70 %, del 10 % al 80 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 10 % al 100 %, del 20 % al 25 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 70 %, del 20 % al 80 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 70 %, del 50 % al 80 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 95 %, del 50 % al 100 %, del 70 % al 80 %, del 70 % al 90 %, del 70 % al 95 %, del 70 % al 100 %, del 80 % al 90 %, del 80 % al 95 %, del 80 % al 100 %, del 90 % al 95 %, del 90 % al 100 %, y del 95 % al 100 % de una citosina modificada o citidina modificada). La citosina o citidina modificada se puede reemplazar por un compuesto que tiene una única estructura o por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas, como se describe en esta invención).

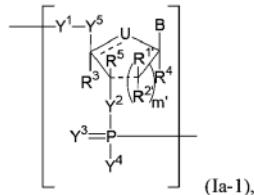
10

15

20

25

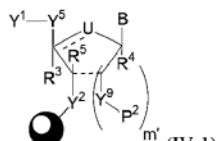
En algunos aspectos, la presente descripción proporciona procedimientos para sintetizar un ácido nucleico modificado o ARNm que incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (Ia-1):



30

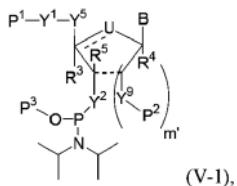
que comprende:

1. a) hacer reaccionar un nucleótido de la Fórmula (IV-1):



35

con un compuesto de fosforamidita de la Fórmula (V-1):



40

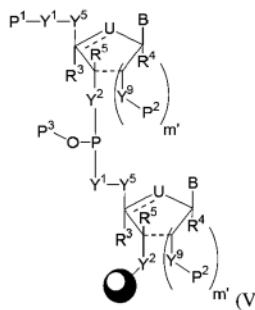
donde Y⁹ es H, hidroxi, fosforilo, pirofosfato, sulfato, amino, tiol, aminoácido opcionalmente sustituido o un péptido (por ejemplo, que incluye de 2 a 12 aminoácidos); y cada P¹, P² y P³ es, independientemente, un grupo protector adecuado; y

45



denota un soporte sólido;

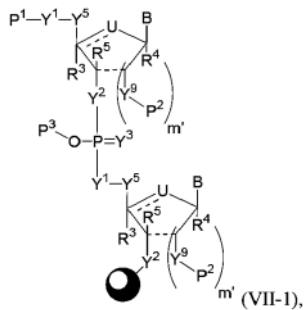
para proporcionar un ácido nucleico modificado o ARNm de la Fórmula (VI-1):



5

y

10 2. b) oxidar o sulfurar el ácido nucleico modificado o ARNm de la Fórmula (V) para proporcionar un ácido nucleico modificado o ARNm de la Fórmula (VII-1):



y

15

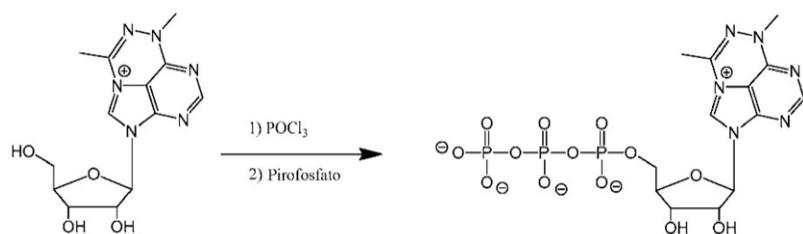
3. c) retirar los grupos protectores para proporcionar el ácido nucleico modificado o ARNm de la Fórmula (Ia).

20 En algunos aspectos, las etapas a) y b) se repiten de 1 a aproximadamente 10.000 veces. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden además un nucleótido (por ejemplo, molécula de bloque de construcción) seleccionado del grupo que consiste en adenosina, citosina, guanosina y uracilo. En algunos aspectos, la nucleobase puede ser una pirimidina o un derivado de esta. En algunos aspectos, el ácido nucleico modificado o ARNm se puede traducir.

25 Otros componentes de ácidos nucleicos modificados y ARNm son opcionales y son beneficiosos en algunos aspectos. Por ejemplo, se proporciona una región no traducida (UTR) 5' y/o una UTR 3', donde cualquiera o ambas pueden contener independientemente una o más modificaciones de nucleótidos diferentes. En tales aspectos, las modificaciones de nucleósido también pueden estar presentes en la región traducible. También se proporcionan ácidos nucleicos modificados o ARNm que contienen una secuencia de Kozak.

30 A continuación se proporcionan ejemplos de síntesis de nucleótidos modificados, que se incorporan en un ácido nucleico modificado o ARNm, por ejemplo, ARN o ARNm, en el Esquema 1 al Esquema 11. El Esquema 1 proporciona un procedimiento general para la fosforilación de nucleósidos, incluidos los nucleósidos modificados.

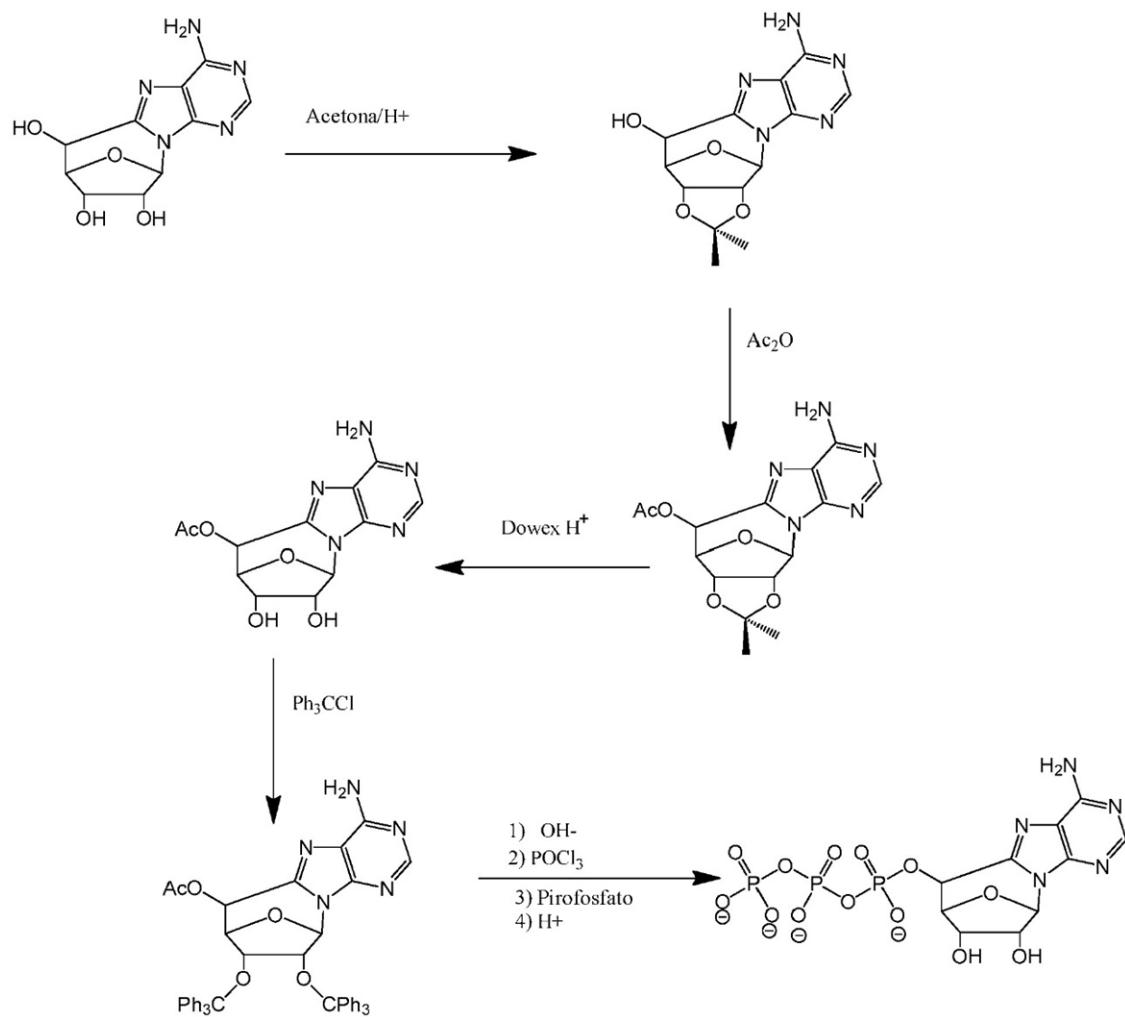
Esquema 1



- 5 Pueden usarse varios grupos protectores para controlar la reacción. Por ejemplo, el Esquema 2 proporciona el uso de múltiples etapas de protección y desprotección para promover la fosforilación en la posición 5' del azúcar, en lugar de los grupos hidroxilo 2' y 3'.

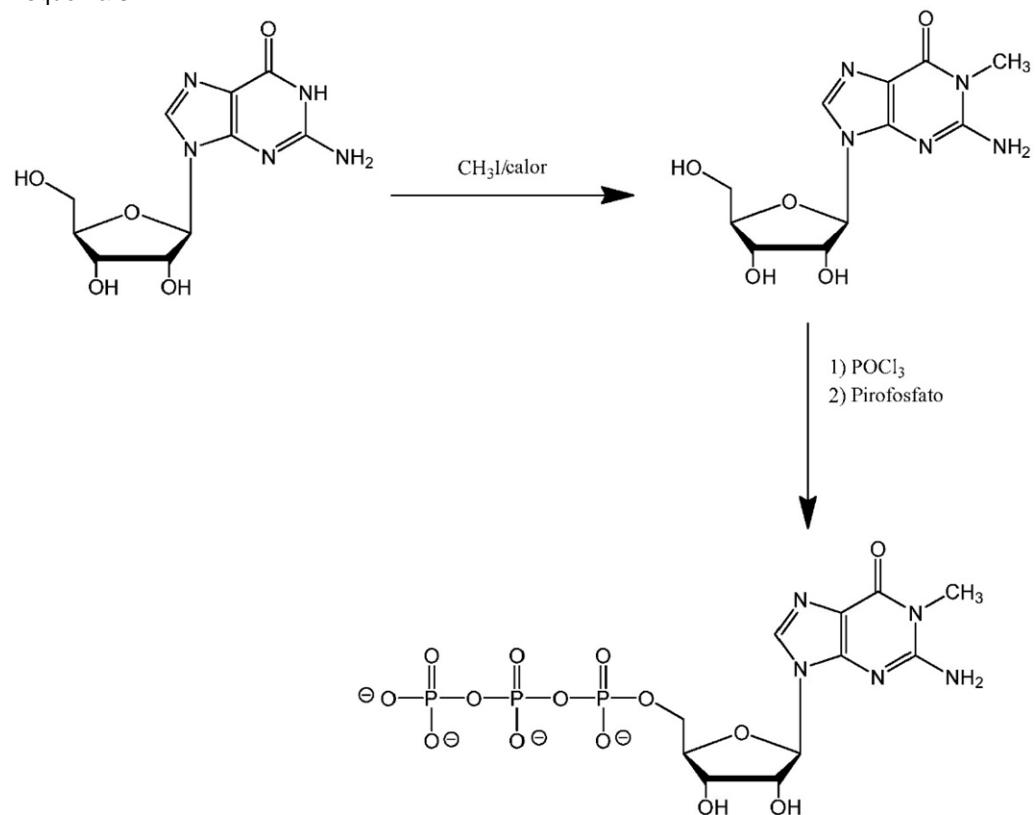
Esquema 2

10

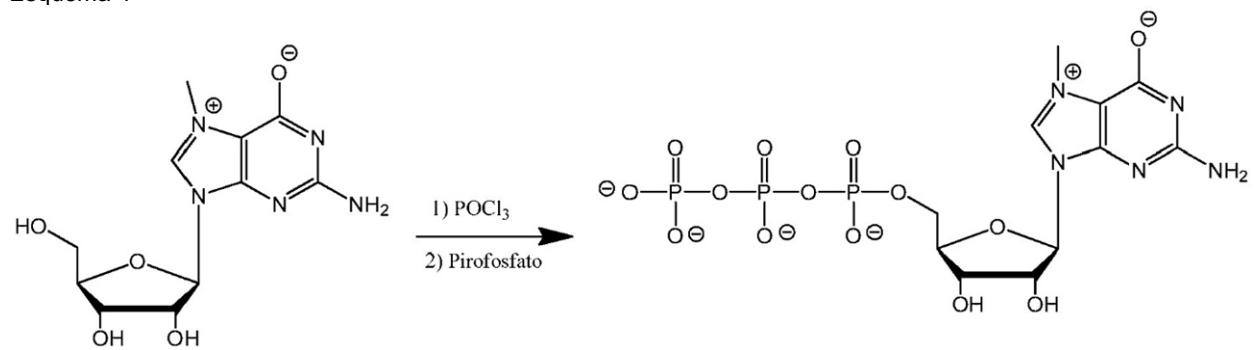


- 15 Los nucleótidos modificados se pueden sintetizar de cualquier manera útil. Los esquemas 3, 4 y 7 proporcionan ejemplos de procedimientos para sintetizar nucleótidos modificados que tienen una nucleobase de purina modificada; y los Esquemas 5 y 6 proporcionan ejemplos de procedimientos para sintetizar nucleótidos modificados que tienen una pseudouridina o pseudouracil modificada, respectivamente.

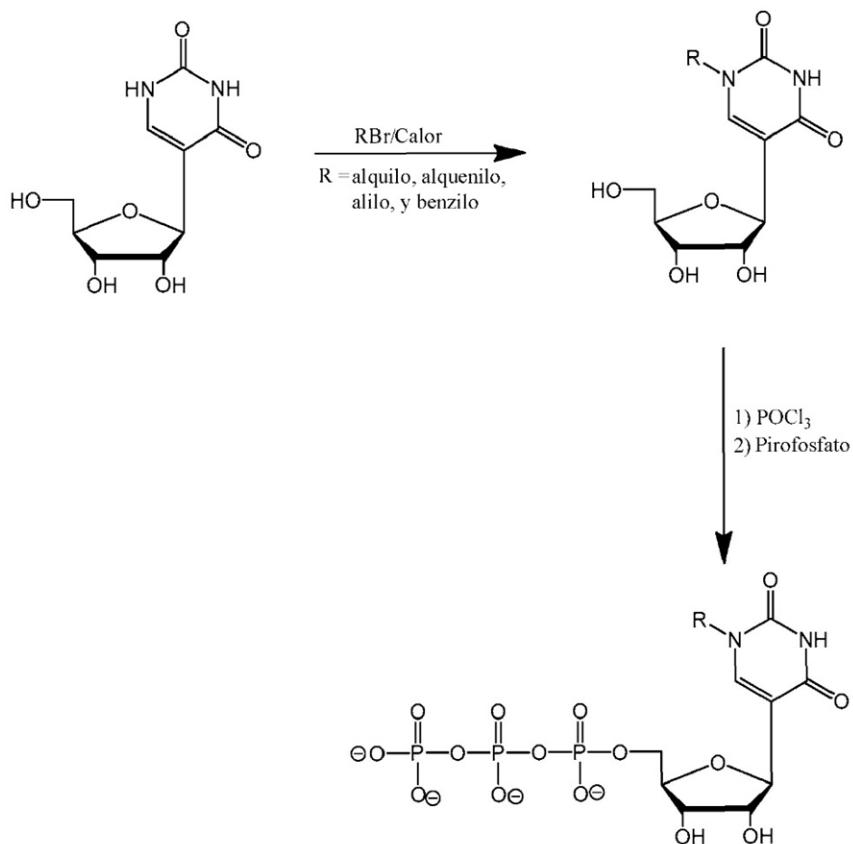
Esquema 3



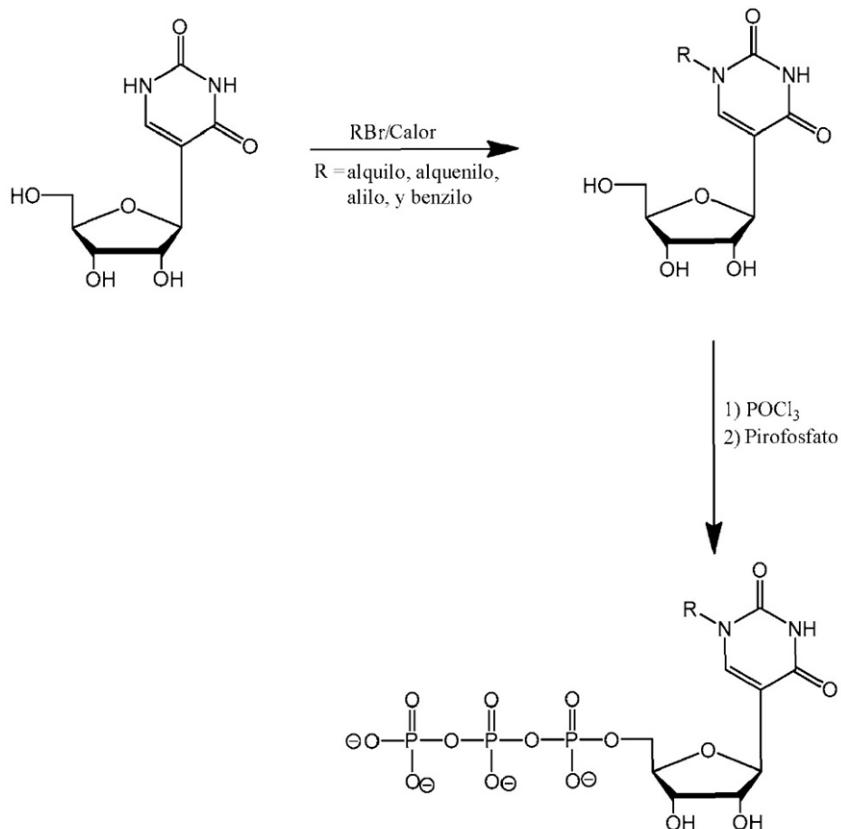
Esquema 4



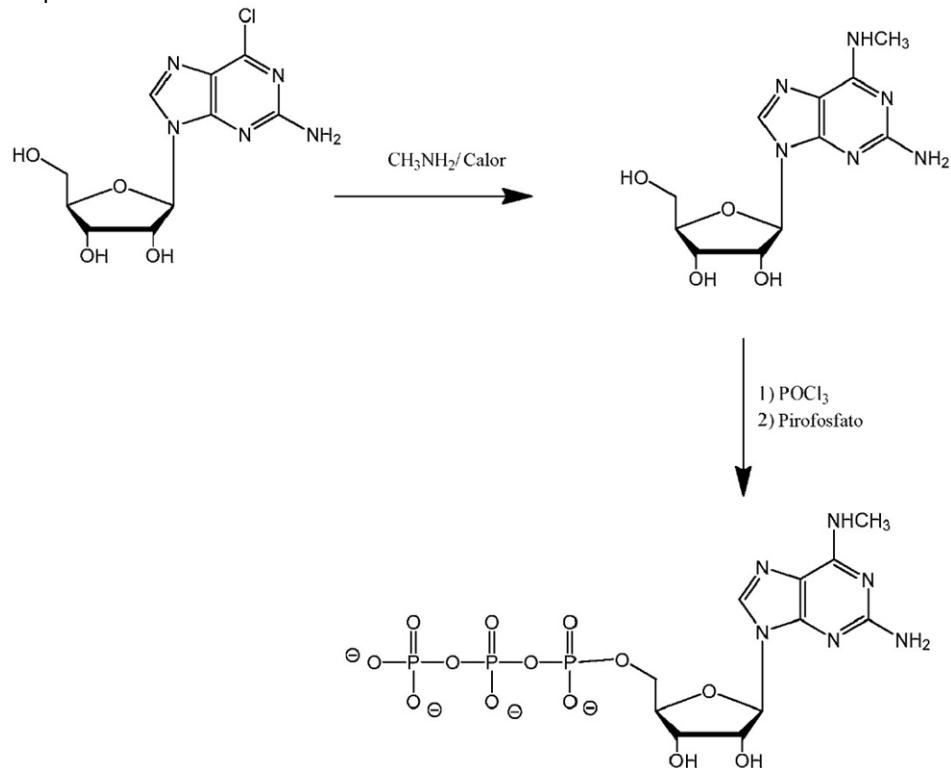
Esquema 5



Esquema 6

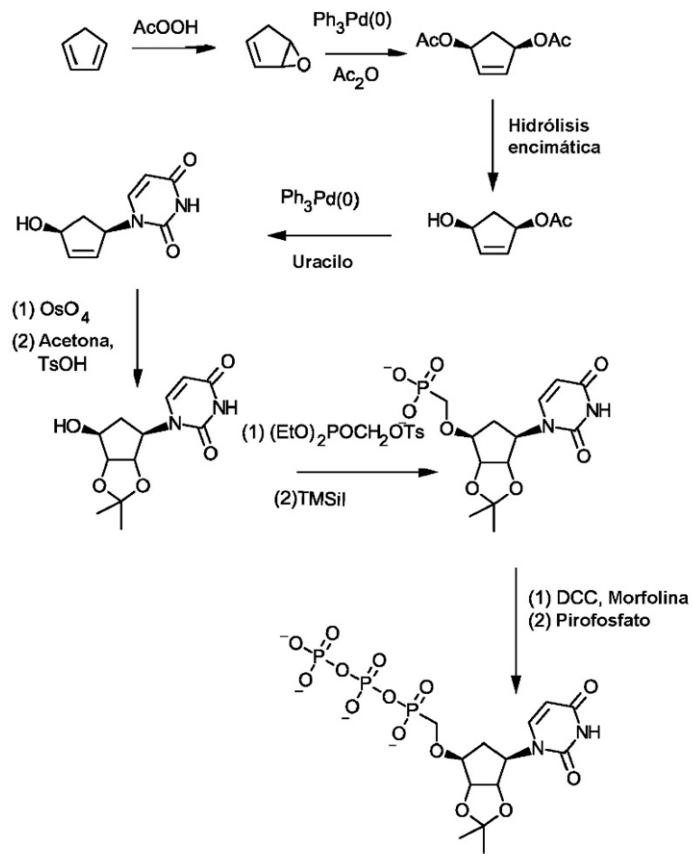


Esquema 7

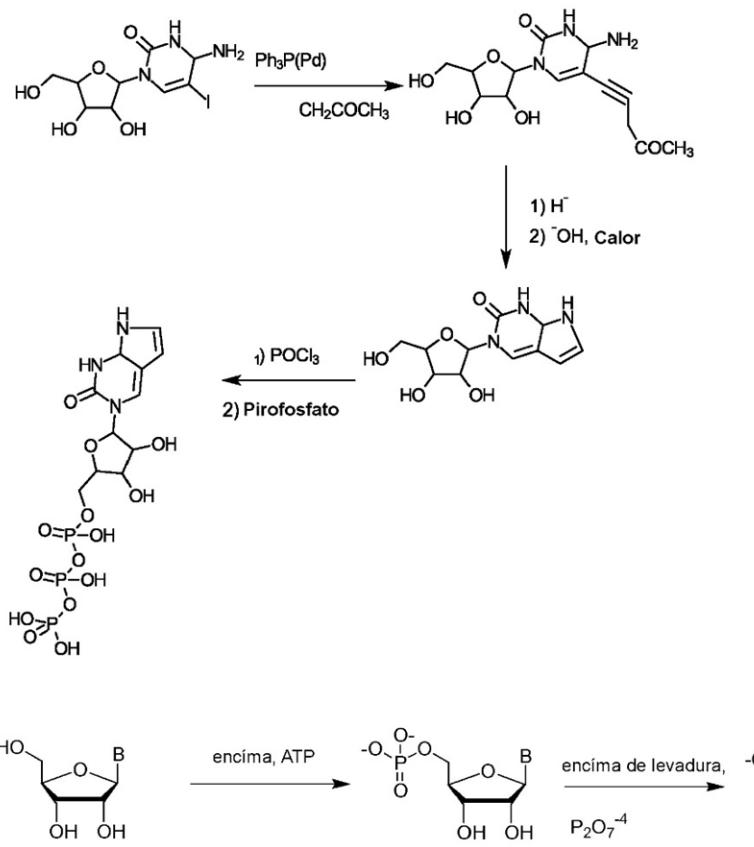


Los esquemas 8 y 9 proporcionan ejemplos de síntesis de nucleótidos modificados. El Esquema 10 proporciona un procedimiento biocatalítico no limitante para producir nucleótidos.

Esquema 8

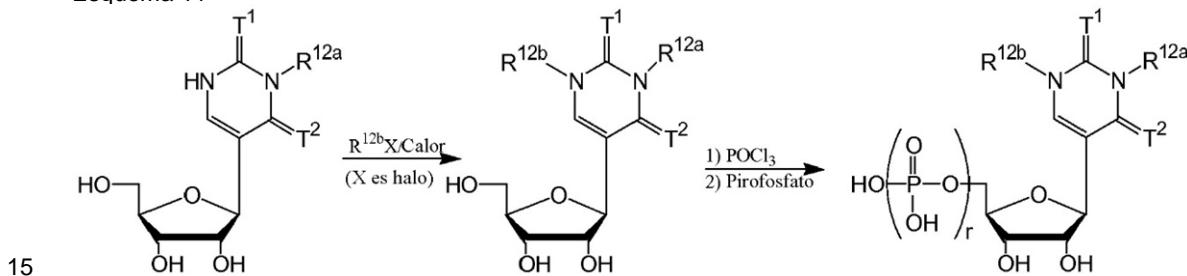


Esquema 9



- 5 El esquema 11 proporciona un ejemplo de síntesis de un uracilo modificado, donde la posición N1 se modifica con R^{12b}, como se proporciona en otra parte, y la posición 5' de la ribosa se fosforila. T¹, T², R^{12a}, R^{12b} y r son como se proporcionan en esta invención. Esta síntesis, así como sus versiones optimizadas, se puede utilizar para modificar otras nucleobases de pirimidina y nucleobases de purina (véanse, por ejemplo, las fórmulas (b1)-(b43)) y/o para instalar uno o más grupos fosfato (por ejemplo, en la posición 5' del azúcar). Esta reacción de alquilación también se
- 10 puede usar para incluir uno o más grupos alquilo opcionalmente sustituidos en cualquier grupo reactivo (p. ej., grupo amino) en cualquier nucleobase descrita en esta invención (p. ej., los grupos amino en la cara de emparejamiento de bases de Watson-Crick para citosina, uracilo, adenina y guanina).

Esquema 11

Combinaciones de nucleótidos en ARNmm

- 20 Otros ejemplos de nucleótidos modificados y combinaciones de nucleótidos modificados se proporcionan a continuación en la Tabla 2. Estas combinaciones de nucleótidos modificados se pueden utilizar para formar los ácidos nucleicos modificados y ARNmm de la descripción. A menos que se indique lo contrario, los nucleótidos modificados pueden estar completamente sustituidos por los nucleótidos naturales de los ácidos nucleicos modificados y ARNmm. A modo de ejemplo no taxativo, la uridina de nucleótido natural puede sustituirse con un nucleósido modificado descrito en esta invención. En otro ejemplo no taxativo, la uridina de nucleótido natural puede estar parcialmente sustituida (por ejemplo, aproximadamente un 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %,
- 25

60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99,9 %) con al menos uno del nucleósido modificado descrito en esta invención.

Tabla 2

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>
α -tio-citidina	α -tio-citidina/5-yodo-uridina
	α -tio-citidina/N1-metil-pseudo-uridina
	α -tio-citidina/ α -tio-uridina
	α -tio-citidina/5-metil-uridina
	α -tio-citidina/pseudo-uridina
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son α -tio-citidina
pseudoisocitidina	pirrolo-citidina/5-yodo-uridina
	pseudoisocitidina/N1-metil-pseudouridina
	pseudoisocitidina/ α -tio-uridina
	pseudoisocitidina/5-metil-uridina
	pseudoisocitidina/pseudouridina
	aproximadamente el 25 % de las citosinas son pseudoisocitidina
	pseudoisocitidina/aproximadamente el 50 % de uridinas son N1-metil-pseudouridina y aproximadamente el 50 % de uridinas son pseudouridina
	pseudoisocitidina/aproximadamente el 25 % de uridinas son N1-metil-pseudouridina y aproximadamente el 25 % de uridinas son pseudouridina
pirrolo-citidina	pirrolo-citidina + 5-yodo-uridina
	pirrolo-citidina/N1-metil-pseudouridina
	pirrolo-citidina/ α -tio-uridina
	pirrolo-citidina/5-metil-uridina
	pirrolo-citidina/pseudouridina
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son pirrolocitidina
5-metil-citidina	5-metil-citidina/5-yodo-uridina
	5-metil-citidina/N1-metil-pseudouridina
	5-metil-citidina/ α -tio-uridina
	5-metil-citidina/5-metil-uridina
	5-metil-citidina/pseudouridina
	Aproximadamente el 25 % de citosinas son 5-metil-citidina
	Aproximadamente el 50 % de citosinas son 5-metil-citidina
	5-metil-citidina/5-metoxi-uridina
	5-metil-citidina/5-bromo-uridina
	5-metil-citidina/5-tio-uridina
N4-acetyl-citidina	5-metil-citidina/aproximadamente el 50 % de uridinas son 2-tio-uridina
	Aproximadamente el 50 % de uridinas son 5-metil-citidina/aproximadamente el 50 % de uridinas son 2-tio-uridina
	N4-acetyl-citidina /5-yodo-uridina
	N4-acetyl-citidina /N1-metil-pseudouridina
	N4-acetyl-citidina / α -tio-uridina

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>
	N4-acetil-citidina /5-metil-uridina
	N4-acetil-citidina/pseudouridina
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son N4-acetil-citidina
	aproximadamente el 25% de las citosinas son N4-acetil-citidina
	N4-acetil-citidina /5-metoxi-uridina
	N4-acetil-citidina /5-bromo-uridina
	N4-acetil-citidina /2-tio-uridina
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son N4-acetil-citidina/ aproximadamente el 50 % de las uridinas son 2-tio-uridina

Otros ejemplos de combinaciones de nucleótidos modificados se proporcionan a continuación en la Tabla 3. Estas combinaciones de nucleótidos modificados se pueden utilizar para formar las moléculas de ácido nucleico modificado o ARNmm.

Tabla 3

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>
citidina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b10)	citidina modificada con (b10)/pseudouridina citidina modificada con (b10)/N1-metil-pseudouridina citidina modificada con (b10)/5-metoxiuridina citidina modificada con (b10)/5-metil-uridina citidina modificada con (b10)/5-bromo-uridina citidina modificada con (b10)/2-tio-uridina aproximadamente el 50 % de la citidina sustituida con citidina modificada (b10)/ aproximadamente el 50 % de las uridinas son 2-tio-uridina
citidina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b32)	citidina modificada con (b32)/pseudouridina citidina modificada con (b32)/N1-metil-pseudouridina citidina modificada con (b10)/5-metoxiuridina citidina modificada con (b32)/5-metil-uridina citidina modificada con (b32)/5-bromo-uridina citidina modificada con (b32)/2-tio-uridina aproximadamente el 50 % de la citidina sustituida con citidina modificada (b32)/ aproximadamente el 50 % de las uridinas son 2-tio-uridina
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b1)	uridina modificada con (b1)/ N4-acetil-citidina Uridina modificada con (b1)/5-metil-citidina
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b8)	uridina modificada con (b8)/ N4-acetil-citidina uridina modificada con (b8)/ 5-metil-citidina
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b28)	uridina modificada con (b28)/ N4-acetil-citidina uridina modificada con (b28)/ 5-metil-citidina
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b29)	uridina modificada con (b29)/ N4-acetil-citidina uridina modificada con (b29)/ 5-metil-citidina
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b30)	uridina modificada con (b30)/ N4-acetil-citidina

Nucleótido modificado	Combinación de nucleótidos modificados
	uridina modificada con (b30)/ 5-metil-citidina

En algunos aspectos, al menos 25 % de las citosinas se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b10)- (b14), (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 100 %).

5 En algunos aspectos, al menos el 25 % de los uracilos se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b1)- (b9) (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 100 %).

10 15 En algunos aspectos, al menos el 25 % de las citosinas se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b10)-(b14), y al menos el 25 % de los uracilos se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b1)- (b9), (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 100 %).

20 25 En algunos aspectos, al menos el 25 % de las citosinas se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b10)-(b14), y al menos el 25 % de los uracilos se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b1)- (b9), (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 100 %).

Síntesis de moléculas de ácido nucleico modificado

30 35 Las moléculas de ácido nucleico modificado para su uso de acuerdo con la presente descripción se pueden preparar de acuerdo con cualquier técnica disponible que incluye, pero no se limita a, transcripción *in vitro* tal como síntesis química y síntesis enzimática o escisión enzimática y química de un precursor más largo, etc. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar ARN (véase, por ejemplo, Gait, M.J. (ed.) Síntesis de oligonucleótidos: una estrategia práctica, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; y Herdewijn, P. (ed.) Síntesis de oligonucleótidos: procedimientos y aplicaciones, Procedimientos en la biología molecular, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005

40 45 Las moléculas de ácido nucleico modificadas descritas en esta invención se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes métodos y procedimientos generales. Se entiende que cuando se dan condiciones de proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, proporciones molares de reactivos, solventes, presiones, etc.) también se pueden usar otras condiciones de proceso a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos particulares o el solvente usado, pero tales condiciones pueden ser determinadas por un experto en la técnica mediante procedimientos de optimización de rutina.

50 55 Los procesos descritos en esta invención pueden controlarse de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos se puede controlar por medios espectroscópicos, tales como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (p. ej., ^1H o ^{13}C), la espectroscopía infrarroja, la espectrofotometría (p. ej., UV-visible), la espectrometría de masas o mediante cromatografía tal como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía en capa fina.

La preparación de moléculas de ácido nucleico modificadas puede implicar la protección y desprotección de varios grupos químicos. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados. La química de los grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en Greene, y col., Protective Groups in Organic Synthesis, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991.

55 Las reacciones de los procesos descritos en esta invención pueden llevarse a cabo en solventes adecuados, que pueden ser fácilmente seleccionados por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Los solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los productos intermedios o los productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del solvente hasta la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un solvente o en una mezcla de más de un solvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, se pueden seleccionar los solventes adecuados para una etapa de reacción particular.

- La resolución de mezclas racémicas de moléculas de ácido nucleico modificadas se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica. Un procedimiento de ejemplo incluye, pero no se limita a, recristalización fraccionada usando un "ácido de resolución quiral" que es un ácido orgánico formador de sal ópticamente activo. Agentes de resolución adecuados para procedimientos de recristalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L de ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diferentes ácidos canforsulfónicos ópticamente activos. La resolución de mezclas racémicas también se puede llevar a cabo mediante elución en una columna rellena con un agente de resolución ópticamente activo (p. ej., dinitrobenzoilfenilglicina). La composición de solvente de elución adecuada puede ser determinada por un experto en la técnica.
- Las moléculas de ácido nucleico modificado no necesitan modificarse uniformemente a lo largo de toda la longitud de la molécula. Pueden existir diferentes modificaciones de ácido nucleico y/o estructuras de estructura principal en diversas posiciones en el ácido nucleico. Un experto en la materia apreciará que los análogos de nucleótidos u otras modificaciones se pueden ubicar en cualquier posición o posiciones de un ácido nucleico de modo que la función del ácido nucleico no disminuya sustancialmente. Una modificación también puede ser una modificación de terminal 5' o 3'. Los ácidos nucleicos pueden contener como mínimo un nucleótido modificado y como máximo el 100 % de nucleótidos modificados, o cualquier porcentaje intermedio, tal como al menos el 5 % de nucleótidos modificados, al menos el 10 % de nucleótidos modificados, al menos el 25 % de nucleótidos modificados, al menos el 50 % de nucleótidos modificados, al menos el 80 % de nucleótidos modificados o al menos el 90 % de nucleótidos modificados.
- Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden contener una pirimidina modificada tal como uracilo o citosina. En algunos aspectos, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % del uracilo en el ácido nucleico se puede reemplazar con un uracilo modificado. El uracilo modificado puede reemplazarse por un compuesto que tiene una única estructura, o puede reemplazarse por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas). En algunos aspectos, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % de la citosina en el ácido nucleico se puede reemplazar con una citosina modificada. La citosina modificada puede reemplazarse por un compuesto que tiene una única estructura, o puede reemplazarse por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas).
- Generalmente, la longitud más corta de un ARNm modificado, en esta invención "ARNmm", de la presente descripción puede ser la longitud de una secuencia de ARNm que puede ser suficiente para codificar un dipéptido. En otro caso, la longitud de la secuencia de ARNm es suficiente para codificar un tripéptido. En otro aspecto, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un tetrapéptido. En otro aspecto, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un pentapéptido. En otro aspecto, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un hexapéptido. En otro aspecto, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un heptapéptido. En otro aspecto, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un octapéptido. En otro aspecto, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un nonapéptido. En otro aspecto, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un decapéptido.
- Los ejemplos de dipéptidos que las secuencias de molécula de ácido nucleico modificado pueden codificar incluyen, pero no se limitan a, carnosina y anserina.
- En otro aspecto, el ARNm puede tener más de 30 nucleótidos de longitud. En otro aspecto, la molécula de ARN puede tener más de 35 nucleótidos de longitud (por ejemplo, al menos o más de aproximadamente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000 y 5.000 nucleótidos).
- Propiedades ejemplares**
- Usos de moléculas de ácido nucleico modificado**
- Principales socios de interacción de surco**
- Las moléculas de ácido nucleico modificadas, p. ej., ARNm modificado (ARNmm), descritas en esta invención, pueden alterar las interacciones con los receptores de reconocimiento que detectan y responden a los ligandos de ARN a través de interacciones, p. ej., unión, con la cara del surco principal de un nucleótido o ácido nucleico. Como tales, los ligandos de ARN que comprenden nucleótidos modificados o moléculas de ácido nucleico modificadas, como se describe en esta invención, disminuyen las interacciones con los principales socios de unión al surco y, por lo tanto, disminuyen una respuesta inmunitaria innata, o la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias, o ambas.
- Ejemplo de interacción de surco principal, p. ej., los socios de unión incluyen, pero no se limitan a, las siguientes nucleasas y helicasas. Dentro de las membranas, los TLR (receptores tipo Toll) 3, 7 y 8 pueden responder al ARN de

cadena simple y doble. Dentro del citoplasma, los miembros de la clase superfamilia 2 de helicasas y ATPasas DEX(D/H) pueden detectar el ARN para iniciar respuestas antivirales. Estas helicasas incluyen RIG-I (gen I inducible por ácido retinoico) y MDA5 (gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma). Otros ejemplos incluyen el laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2), proteínas que contienen el dominio HIN-200 o proteínas que contienen el dominio Helicasa.

Prevención o reducción de la activación de la respuesta inmunitaria celular innata utilizando moléculas de ácido nucleico modificadas

Las moléculas de ácido nucleico modificadas, por ejemplo, ARNm, descritas en esta invención, disminuyen la respuesta inmunitaria innata en una célula. El término "respuesta inmunitaria innata" incluye una respuesta celular a ácidos nucleicos exógenos, incluidos, entre otros, ácidos nucleicos monocatenarios, generalmente de origen viral o bacteriano, que implican la inducción de la expresión y liberación de citocinas, en particular los interferones, y muerte celular. La síntesis de proteínas también puede reducirse durante la respuesta inmunitaria celular innata. Aunque es ventajoso eliminar la respuesta inmunitaria innata en una célula, la presente descripción proporciona ARNm modificado que reduce sustancialmente la respuesta inmunitaria, incluida la señalización de interferón, sin eliminar por completo tal respuesta. En algunos aspectos, la respuesta inmunitaria puede reducirse en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 % o más del 99,9% en comparación con la respuesta inmunitaria inducida por una molécula de ácido nucleico no modificada correspondiente. Tal reducción puede medirse por la expresión o el nivel de actividad de los interferones de tipo 1 o la expresión de genes regulados por interferones tales como los receptores tipo toll (p. ej., TLR7 y TLR8). La reducción de la respuesta inmunitaria innata también puede medirse por la disminución de la muerte celular después de una o más administraciones de ARN modificado a una población celular; por ejemplo, la muerte celular es un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más del 95 % menor que la frecuencia de muerte celular observada con una molécula de ácido nucleico no modificada correspondiente. Además, la muerte celular puede afectar a menos del 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 % o menos del 0,01 % de las células en contacto con las moléculas de ácido nucleico modificadas.

La presente descripción proporciona la introducción repetida (p. ej., transfección) de moléculas de ácido nucleico modificadas en una población de células diana, p. ej., *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La etapa de contactar con la población de células puede repetirse una o más veces (tal como dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco veces). En algunos aspectos, la etapa de poner en contacto la población celular con las moléculas de ácido nucleico modificadas puede repetirse un número de veces suficiente para lograr una eficiencia predeterminada de traducción de proteínas en la población celular. Dada la citotoxicidad reducida de la población de células diana por las modificaciones del ácido nucleico, tales transfecciones repetidas se pueden lograr en una variedad de tipos de células.

Los ácidos nucleicos modificados, incluida la combinación de modificaciones enseñadas en esta invención, pueden tener propiedades superiores que los hacen más adecuados como modalidades terapéuticas.

Se ha determinado que el modelo de "todo o nada" en la técnica es muy insuficiente para describir los fenómenos biológicos asociados con la utilidad terapéutica del ARNm modificado. Los presentes inventores han determinado que para mejorar la producción de proteínas, se puede considerar la naturaleza de la modificación, o combinación de modificaciones, el porcentaje de modificación y estudiar más de una citocina o métrica para determinar la eficacia y el perfil de riesgo de un ARNm modificado particular.

En un aspecto, los procedimientos para determinar la eficacia de un ARNm modificado en comparación con el no modificado implican la medida y el análisis de una o más citocinas cuya expresión se desencadena mediante la administración del ácido nucleico exógeno. Estos valores se comparan con la administración de un ácido nucleico no modificado o con una métrica estándar tal como la respuesta de citocinas, PolyIC, R-848 u otro estándar conocido en la técnica.

Un ejemplo de una métrica estándar desarrollada en esta invención es la medida de la relación del nivel o cantidad de polipéptido codificado (proteína) producido en la célula, tejido u organismo al nivel o cantidad de una o más (o un panel) de citocinas cuya expresión se desencadena en la célula, tejido u organismo como resultado de la administración o el contacto con el ácido nucleico modificado. Tales proporciones se denominan en esta invención Proporción Proteína:Citocina o Proporción "PC". Cuanto mayor sea la proporción de PC, más eficaz será el ácido nucleico modificado (polinucleótido que codifica la proteína medida). Las proporciones de PC preferidas, por citocina, pueden ser superiores a 1, superiores a 10, superiores a 100, superiores a 1.000, superiores a 10.000 o más. Se prefieren los ácidos nucleicos modificados que tienen proporciones de PC más altas que un ácido nucleico modificado de una construcción diferente o no modificada.

La proporción de PC se puede calificar adicionalmente por el porcentaje de modificación presente en el polinucleótido. Por ejemplo, normalizado a un ácido nucleico modificado al 100 %, se puede determinar la producción de proteínas en función de la citocina (o el riesgo) o el perfil de citocina.

En un aspecto, se proporciona en esta invención un procedimiento para determinar, a través de químicas, citocinas o modificación porcentual, la eficacia relativa de cualquier polinucleótido modificado particular comparando la relación de PC del ácido nucleico modificado (polinucleótido).

- 5 Activación de la respuesta inmune: vacunas
En un aspecto, las moléculas de ARNm pueden usarse para suscitar o provocar una respuesta inmunitaria en un organismo. Las moléculas de ARNm que se van a administrar pueden codificar un péptido o polipéptido inmunogénico y pueden codificar más de uno de tales péptidos o polipéptidos.
- 10 Además, ciertos nucleósidos modificados, o combinaciones de los mismos, cuando se introducen en las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm activarán la respuesta inmunitaria innata. Tales moléculas activadoras son útiles como adyuvantes cuando se combinan con polipéptidos y/u otras vacunas. En ciertos aspectos, las moléculas activadoras contienen una región traducible que codifica una secuencia polipeptídica útil como vacuna, proporcionando así la capacidad de ser un autoadyuvante.
- 15 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNmm pueden codificar un inmunógeno. La administración de moléculas de ácido nucleico modificadas y/o ARNmm que codifican un inmunógeno puede activar la respuesta inmunitaria. Como ejemplo no limitativo, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNmm que codifica un inmunógeno pueden administrarse a las células para desencadenar múltiples vías de respuesta innata (véase la publicación internacional n.º WO2012006377). Como otro ejemplo no limitativo, las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm que codifica un inmunógeno pueden administrarse a un vertebrado en una cantidad de dosis lo suficientemente grande como para ser inmunogénica para el vertebrado (véanse las publicaciones internacionales n.º WO2012006372 y WO2012006369).
- 20 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden codificar una secuencia polipeptídica para una vacuna y pueden comprender además un inhibidor. El inhibidor puede alterar la presentación del antígeno y/o inhibir diversas vías conocidas en la técnica. Como ejemplo no limitativo, las moléculas de ácido nucleico modificadas o el ARNmm pueden usarse para una vacuna en combinación con un inhibidor que puede alterar la presentación del antígeno (véanse las publicaciones internacionales n.º WO2012089225 y WO2012089338);
- 25 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden ser ARN autorreplicante. Las moléculas de ARN autorreplicantes pueden mejorar la eficiencia de la administración y expresión del ARN del producto génico adjunto. En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm pueden comprender al menos una modificación descrita en esta invención y/o conocida en la técnica. En un aspecto, el ARN autorreplicante puede diseñarse de modo que el ARN autorreplicante no induzca la producción de partículas víricas infecciosas. Como ejemplo no limitativo, el ARN autorreplicante puede diseñarse mediante los procedimientos descritos en la publicación de EE.UU. N.º US20110300205 y publicación internacional N.º WO2011005799,
- 30 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas autorreplicantes o ARNmm pueden codificar una proteína que puede aumentar la respuesta inmunitaria. Como ejemplo no limitante, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNmm pueden ser ARNm autorreplicante que puede codificar al menos un antígeno (véase la publicación de EE. UU. n.º US20110300205 y la publicación internacional n.º WO2011005799).
- 35 En un aspecto, los ácidos nucleicos modificados autorreplicantes o ARNmm pueden formularse utilizando procedimientos descritos en esta invención o conocidos en la técnica. Como ejemplo no limitante, el ARN autorreplicante se puede formular para la administración mediante los procedimientos descritos en Geall y col. (administración no viral de vacunas de ARN autoamplificadoras, PNAS 2012; PMID: 22908294).
- 40 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden codificar péptidos anfipáticos y/o inmunogénicos anfipáticos.
- 45 En un aspecto, una formulación de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm puede comprender además un péptido anfipático y/o inmunogénico anfipático. Como ejemplo no limitativo, la molécula de ácido nucleico modificada o ARNm que comprende un péptido anfipático y/o inmunogénico anfipático puede formularse como se describe en la publicación de EE. UU. N.º US20110250237 y la publicación internacional. N.º WO2010009277 y WO2010009065.
- 50 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm pueden ser inmunoestimuladores. Como un ejemplo no limitante, las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm pueden codificar todo o una parte de un genoma de virus de ARN de cadena de sentido positivo o sentido negativo (véase la publicación internacional n.º

WO2012092569 y la publicación de EE. UU. n.º US20120177701). En otro ejemplo no limitativo, las moléculas de ácido nucleico modificadas inmunoestimuladoras o ARNm se pueden formular con un excipiente para administración como se describe en esta invención y/o se conoce en la técnica (véase la publicación internacional n.º WO2012068295 y la publicación de EE. UU. n.º US20120213812).

- 5 En un aspecto, la respuesta de la vacuna formulada por los procedimientos descritos en esta invención puede mejorarse mediante la adición de varios compuestos para inducir el efecto terapéutico. Como ejemplo no limitativo, la formulación de la vacuna puede incluir un péptido de unión a MHC II o un péptido que tenga una secuencia similar a un péptido de unión a MHC II (véanse las publicaciones internacionales n.º WO2012027365, WO2011031298 y la publicación de EE. UU. n.º US20120070493, US20110110965). Como otro ejemplo, las formulaciones de vacunas pueden comprender compuestos nicotínicos modificados que pueden generar una respuesta de anticuerpos frente a residuos de nicotina en un sujeto (véanse la publicación internacional n.º WO2012061717 y la publicación de EE. UU. n.º US20120114677).
- 10

15 Variantes de polipéptidos

Las moléculas de ácido nucleico modificadas codifican polipéptidos, por ejemplo, polipéptidos variantes, que tienen una cierta identidad con una secuencia polipeptídica de referencia. El término "identidad", como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más péptidos, determinada comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también se refiere al grado de relación de secuencia entre péptidos, determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La identidad mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineaciones de hueco (si las hay) abordadas por un modelo matemático o programa informático en particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de los péptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Biología molecular computacional, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputación: Informática y Proyectos Genómicos, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Análisis informático de datos de secuencia, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Análisis de secuencias en biología molecular, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Introducción al análisis de secuencias, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y col., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

En algunos aspectos, la variante de polipéptido puede tener la misma o similar actividad que el polipéptido de referencia. Alternativamente, la variante puede tener una actividad alterada (p. ej., aumentada o disminuida) en relación con un polipéptido de referencia. En general, las variantes de un polinucleótido o polipéptido particular de la presente descripción tendrán al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con ese polinucleótido o polipéptido de referencia en particular según lo determinado por los programas de alineamiento de secuencias y los parámetros descritos en esta invención y conocidos para los expertos en la materia.

40 Como reconocen los expertos en la técnica, los fragmentos de proteínas, los dominios de proteínas funcionales y las proteínas homólogas también se consideran dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, en esta invención se proporciona cualquier fragmento de proteína de una proteína de referencia (es decir, una secuencia polipeptídica que es al menos un residuo de aminoácido más corta que una secuencia polipeptídica de referencia pero idéntica por lo demás) 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 aminoácidos de longitud. En otro ejemplo, 45 cualquier proteína que incluya un tramo de alrededor de 20, alrededor de 30, alrededor de 40, alrededor de 50 o alrededor de 100 aminoácidos que son alrededor del 40 %, alrededor del 50 %, alrededor del 60 %, alrededor del 70 %, alrededor del 80 %, alrededor del 90 %, alrededor del 95 % o alrededor del 100 % idénticos a cualquiera de las secuencias descritas en esta invención se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción. En ciertos aspectos, una secuencia de proteína que se va a utilizar de acuerdo con la presente descripción incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 50 o más mutaciones como se muestra en cualquiera de las secuencias proporcionadas o referenciadas en esta invención.

Complejos polipéptido-ácido nucleico

55 La traducción adecuada de proteínas implica la agregación física de varios polipéptidos y ácidos nucleicos asociados con el ARNm. La presente descripción proporciona complejos de proteína-ácido nucleico que contienen un ARNm traducible que tiene una o más modificaciones de nucleósidos (por ejemplo, al menos dos modificaciones de nucleósidos diferentes) y uno o más polipéptidos unidos al ARNm.

60 Generalmente, las proteínas se proporcionan en una cantidad eficaz para prevenir o reducir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el complejo.

Moléculas de ácido nucleico modificadas intraducibles

Como se describe en esta invención, se proporcionan ARNm que tienen secuencias que sustancialmente no son traducibles. Tal ARNm puede ser eficaz como vacuna cuando se administra a un sujeto. Se proporciona además que el sujeto al que se administra la vacuna puede ser un mamífero, más preferiblemente un ser humano y lo más preferiblemente un paciente.

También se proporcionan moléculas de ácido nucleico modificadas que contienen una o más regiones no codificantes. Tales moléculas de ácido nucleico modificadas generalmente no se traducen, pero son capaces de unirse y secuestrar uno o más componentes de la maquinaria de traducción, tal como una proteína ribosómica o un ARN de transferencia (ARNt), reduciendo así de manera efectiva la expresión de la proteína en la célula. La molécula de ácido nucleico modificada puede contener un pequeño ARN nucleolar (sno-ARN), micro ARN (miARN), pequeño ARN de interferencia (siARN) o ARN que interactúa con Piwi (piARN).

Composiciones farmacéuticas

En esta invención se proporcionan ácidos nucleicos modificados y composiciones y complejos de ARNmm en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente una o más sustancias activas adicionales, p. ej., sustancias terapéuticamente y/o profilácticamente activas. Se pueden encontrar consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a edición, A. R. Gennaro Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006

En algunos aspectos, se administran composiciones a humanos, pacientes humanos o sujetos. A los efectos de la presente descripción, la frase "ingrediente activo" generalmente se refiere a ácidos nucleicos modificados y ARNmm que se van a administrar como se describe en esta invención.

Aunque las descripciones de composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta invención se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración a humanos, el experto en la técnica entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para la administración a cualquier otro animal, por ejemplo, a animales no humanos, por ejemplo, mamíferos no humanos.

Se comprende bien la modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para su administración a diversos animales, y el farmacólogo veterinario normalmente experto puede diseñar y/o realizar tal modificación con experimentación meramente ordinaria, si la hubiera. Los sujetos para los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, humanos y/u otros primates; mamíferos, que incluyen mamíferos comercialmente relevantes tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos, perros, ratones y/o ratas; y/o aves, que incluyen aves comercialmente relevantes tales como aves, pollos, patos, gansos y/o pavos.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido o desarrollado en lo sucesivo en la técnica de la farmacología. En general, dichos procedimientos preparatorios incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con un excipiente y/o uno o más ingredientes accesorios y, a continuación, si es necesario y/o deseable, dividir, dar forma y/o empaquetar el producto en una unidad de dosis única o múltiple deseada.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la descripción puede prepararse, empaquetarse y/o venderse a granel, como una única dosis unitaria y/o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se usa en esta invención, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de tal dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de tal dosificación.

Las cantidades relativas del ingrediente activo, el excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la descripción variarán, dependiendo de la identidad, tamaño y/o condición del sujeto tratado y dependiendo además de la vía por la que se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre 0,1 % y 100 %, por ejemplo, entre ,5 y 50 %, entre 1-30 %, entre 5-80 %, al menos 80 % (p/p) de ingrediente activo.

Formulaciones

La descripción de ácido nucleico modificado y ARNm puede formularse utilizando uno o más excipientes para: (1) aumentar la estabilidad; (2) aumentar la transfección celular; (3) permitir la liberación sostenida o retardada (p. ej., a partir de una formulación de depósito del ácido nucleico modificado o ARNm); (4) alterar la biodistribución (p. ej.,

5 dirigir el ácido nucleico modificado o ARNm a tejidos o tipos de células específicos); (5) aumentar la traducción de la proteína codificada *in vivo*; y/o (6) alterar el perfil de liberación de la proteína codificada *in vivo*. Además de los excipientes tradicionales como cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, los excipientes pueden incluir, entre otros, lipidoídes, liposomas, nanopartículas lipídicas, polímeros, lipoplejos, nanopartículas de núcleo y cubierta, péptidos, proteínas, células transfectadas con ácido nucleico modificado o ARNm (p. ej., para trasplante en un sujeto), hialuronidasa, imitadores de nanopartículas y combinaciones de los mismos. En consecuencia, las formulaciones pueden incluir uno o más excipientes, cada uno en una cantidad que en conjunto aumenta la estabilidad del ácido nucleico modificado o ARNm, aumenta la transfección celular por el ácido nucleico modificado o ARNm, aumenta la expresión del ácido nucleico modificado o proteína codificada por ARNm y/o altera el perfil de liberación de ácido nucleico modificado o proteínas codificadas por ARNm. Además, los ácidos nucleicos modificados y el ARNm pueden formularse utilizando nanopartículas de ácido nucleico autoensambladas.

20 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido o desarrollado en el futuro en la técnica de la farmacología. En general, tales procedimientos preparatorios incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con un excipiente y/o uno o más ingredientes auxiliares.

25 Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción puede prepararse, envasarse y/o venderse a granel, como una dosis unitaria única y/o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Como se usa en esta invención, una "dosis unitaria" se refiere a una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo generalmente puede ser igual a la dosis del ingrediente activo que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de tal dosis que incluye, entre otros, la mitad o un tercio de tal dosis.

30 30 Las cantidades relativas del ingrediente activo, el excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción podrán variar, dependiendo de la identidad, tamaño y/o condición del sujeto tratado y además dependiendo de la vía por la cual se administrará la composición. Por ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1 % y el 99 % (p/p) del ingrediente activo.

35 35 En algunos aspectos, las formulaciones de ARNm modificadas descritas en esta invención pueden contener al menos un ARNm modificado. Las formulaciones pueden contener 1, 2, 3, 4 o 5 ARNm modificados. En un aspecto, la formulación contiene al menos tres proteínas codificantes de ARNm modificado. En un aspecto, la formulación contiene al menos cinco proteínas codificantes de ARNm modificado.

40 40 Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable que, tal como se usa en esta invención, incluye, entre otros, todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Se conocen en la técnica varios excipientes para formular composiciones farmacéuticas y técnicas para preparar la composición (véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a edición, A. R. Gennaro Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006). El uso de un medio excipiente convencional puede contemplarse dentro del alcance de la presente descripción, excepto en la medida en que cualquier medio excipiente convencional pueda ser incompatible con una sustancia o sus derivados, por ejemplo, al producir algún efecto biológico indeseable o al interactuar de otra manera de una manera perjudicial con cualquier otro(s) componente(s) de la composición farmacéutica.

55 55 En algunos aspectos, el tamaño de partícula de la nanopartícula lipídica puede aumentar y/o disminuir. El cambio en el tamaño de las partículas puede ayudar a contrarrestar una reacción biológica tal como, entre otras, la inflamación o puede aumentar el efecto biológico del ARNm modificado administrado a los mamíferos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, entre otros, diluyentes inertes, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, conservantes, agentes tamponadores, agentes lubricantes y/o aceites. Tales excipientes pueden incluirse opcionalmente en las formulaciones farmacéuticas.

Lipidoides

La síntesis de lipidoides se ha descrito ampliamente y las formulaciones que contienen estos compuestos son particularmente adecuadas para la administración de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm (véase Mahon y col., Bioconjug Chem. 2010 21:1448-1454; Schroeder y col., J Intern Med . 2010 267:9-21; Akinc y col., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Love y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 107:1864-1869; Siegwart y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2011 108:12996-3001).

Aunque estos lipidoides se han utilizado para administrar eficazmente moléculas pequeñas de ARN de interferencia de doble hebra en roedores y primates no humanos (véase Akinc y col., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569; Frank-Kamenetsky y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2008 105:11915-11920, Akinc y col., Mol Ther. 2009 17:872-879, Love y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2010 107:1864-1869, Leuschner y col., Nat Biotechnol., 2011, 29:1005-1010;), la presente descripción describe su formulación y uso para administrar moléculas de ácido nucleico modificadas monocatenarias o ARNmm. Se pueden preparar complejos, micelas, liposomas o partículas que contengan estos lipidoides y, por lo tanto, pueden dar como resultado una administración eficaz de las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm, como se juzga por la producción de una proteína codificada, tras la inyección de una formulación de lipidoide por medio de vías de administración localizadas y/o sistémicas. Los complejos lipidoides de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden administrarse por diversos medios que incluyen, entre otros, las vías intravenosa, intramuscular o subcutánea.

La administración *in vivo* de ácidos nucleicos puede verse afectada por muchos parámetros, incluidos, entre otros, la composición de la formulación, la naturaleza de la PEGilación de partículas, el grado de carga, la proporción de oligonucleótidos a lípidos y parámetros biofísicos tales como, entre otros, el tamaño de partícula (Akinc y col., Mol Ther. 2009 17:872-879). Por ejemplo, pequeños cambios en la longitud de la cadena de anclaje de los lípidos de poli(etilenglicol) (PEG) pueden resultar en efectos significativos en la eficacia *in vivo*. Formulaciones con los diferentes lipidoides, incluidos, entre otros, clorhidrato de penta[3-(1-lauroamilinopropionil)]-trietylentetramina (TETA-5LAP; 25 también conocido como 98N12-5, véase Murugaiah y col., Bioquímica analítica, 401:61 (2010)), C12-200 (incluidos derivados y variantes) y MD1, se pueden analizar para actividad *in vivo*.

El lipidoide al que se hace referencia en esta invención como "98N12-5" se describe por Akinc y col., Mol Ther. 2009 17:872-879 (véase la Figura 1).

El lipidoide al que se hace referencia en esta invención como "C12-200" se describe en Love y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2010 107:1864-1869 y Liu y Huang, Terapia molecular. 2010 669-670 (véase la Figura 1). Las formulaciones de lipidoides pueden incluir partículas que comprenden 3 o 4 o más componentes además de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm. Como ejemplo, las formulaciones con ciertos lipidoides incluyen, pero no se limitan a, 98N12-5 y pueden contener 42 % de lipidoide, 48 % de colesterol y 10 % de PEG (longitud de cadena de alquilo C14). Como otro ejemplo, las formulaciones con ciertos lipidoides incluyen, pero no se limitan a, C12-200 y pueden contener 50 % de lipidoide, 10 % de disteroifosfatidilcolina, 38,5 % de colesterol y 1,5 % de PEG-DMG.

En un aspecto, una molécula de ácido nucleico modificada o ARNmm formulada con un lipidoide para administración intravenosa sistémica puede dirigirse al hígado. Por ejemplo, una formulación intravenosa optimizada final que utiliza una molécula de ácido nucleico modificada o ARNmm y que comprende una composición molar de lípidos de 42 % de 98N12-5, 48 % de colesterol y 10 % de lípidos PEG con una relación de peso final de aproximadamente 7,5 a 1 lípido total a ácido nucleico modificado, o ARNmm, y una longitud de cadena de alquilo C14 en el lípido PEG, con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 50-60 nm, puede dar como resultado que la distribución de la formulación sea superior al 90 % en el hígado (véase, Akinc y col., Mol Ther. 2009 17:872-879). En otro ejemplo, una formulación intravenosa que usa un lipidoide C12-200 (véase la solicitud provisional de EE. UU. 61/175.770 y la solicitud internacional publicada WO2010129709) el lipidoide puede tener una relación molar de 50/10/38,5/1,5 de C12-200/disteroifosfatidilcolina/colesterol/PEG-DMG, con una proporción en peso de 7 a 1 de lípido total a molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm, y un tamaño medio de partícula de 80 nm, puede ser eficaz para administrar moléculas de ácido nucleico modificado o ARNmm a los hepatocitos (véase, Love y col. , Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2010 107:1864-1869). En otro aspecto, se puede usar una formulación que contiene lipidoide MD1 para administrar eficazmente una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm a los hepatocitos *in vivo*. Las características de las formulaciones de lipidoides optimizadas para las rutas intramuscular o subcutánea pueden variar significativamente según el tipo de célula diana y la capacidad de las formulaciones para difundirse a través de la matriz extracelular hacia el torrente sanguíneo. Aunque se puede desear un tamaño de partícula de menos de 150 nm para la administración efectiva de hepatocitos debido al tamaño de las ventanas endoteliales (véase, Akinc y col., Mol Ther. 2009 17: 872-879), el uso de moléculas de ácido nucleico modificadas formuladas con un lipidoide modificado o ARNmm para administrar la formulación a otros tipos de células, incluidas, entre otras, células endoteliales, células mieloides y células musculares, pueden no tener un tamaño limitado similar. Se ha informado sobre el uso de formulaciones de lipidoides para administrar siARN *in vivo* a otras células que no son hepatocitos, tales como células mieloides y endotelio (véase Akinc y col., Nat Biotechnol. 2008 26: 561-569; Leuschner y col., Nat Biotechnol. 2011 29:1005-1010; Cho y col. Adv. Funct. Mater. 2009 19:3112-3118; 8^a conferencia internacional Judah Folkman, Cambridge, MA, 8 y 9 de octubre de 2010). La administración eficaz a las células mieloides, tales como los monocitos, las formulaciones de lipidoides pueden tener una proporción molar de componentes similar. Se pueden usar diferentes

- proporciones de lipidoídes y otros componentes que incluyen, entre otros, disteroilfosfatidilcolina, colesterol y PEG-DMG, para optimizar la formulación del ácido nucleico modificado o ARNmm para la administración a diferentes tipos de células, incluidos, entre otros, hepatocitos, células mieloides, células musculares, etc. Por ejemplo, la relación molar del componente puede incluir, entre otros, 50 % C12-200, 10 % disteroilfosfatidilcolina, 38,5 % colesterol y %1,5 PEG-DMG (véase Leuschner y col., Nat Biotechnol 2011 29:1005-1010). El uso de formulaciones de lipidoídes para el suministro localizado de ácidos nucleicos a las células (tales como, entre otras, células adiposas y células musculares) mediante suministro subcutáneo o intramuscular, puede no requerir todos los componentes de la formulación deseados para el suministro sistémico, y como tal, puede comprender sólo el lipidoide y la molécula de ácido nucleico modificada o ARNmm.
- 10 Pueden usarse combinaciones de diferentes lipidoídes para mejorar la eficacia de la producción de proteínas dirigida por moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm ya que los lipidoídes pueden aumentar la transfección celular por la molécula de ácido nucleico modificada o ARNmm; y/o aumentar la traducción de la proteína codificada (véase Whitehead y col., Mol. Ther. 2011, 19:1688-1694).
- 15 15 Liposomas, lipoplejos y nanopartículas lipídicas
- Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm se pueden formular utilizando uno o más liposomas, lipoplejos o nanopartículas lipídicas. En un aspecto, las composiciones farmacéuticas de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm incluyen liposomas. Los liposomas son vesículas preparadas artificialmente que pueden estar compuestas principalmente por una bicapa lipídica y pueden usarse como vehículo de suministro para la administración de nutrientes y formulaciones farmacéuticas. Los liposomas pueden ser de diferentes tamaños tales como, entre otros, una vesícula multilaminar (MLV) que puede tener cientos de nanómetros de diámetro y puede contener una serie de bicapas concéntricas separadas por compartimentos acuosos estrechos, una pequeña vesícula unicelular (SUV) que puede tener menos de 50 nm de diámetro y una gran vesícula unilamelar (LUV) que puede tener entre 50 y 500 nm de diámetro. El diseño de liposomas puede incluir, entre otros, opsoninas o ligandos para mejorar la unión de los liposomas al tejido enfermo o para activar eventos tales como, entre otros, endocitosis. Los liposomas pueden contener un pH bajo o alto para mejorar la administración de las formulaciones farmacéuticas.
- 20 30 La formación de liposomas puede depender de características fisicoquímicas tales como, entre otras, la formulación farmacéutica atrapada y los ingredientes liposomales, la naturaleza del medio en el que se dispersan las vesículas lipídicas, la concentración efectiva de la sustancia atrapada y su potencial toxicidad, cualquier proceso adicional involucrado durante la aplicación y/o entrega de las vesículas, el tamaño optimizado, la polidispersidad y la vida útil de las vesículas para la aplicación prevista, y la reproducibilidad de lote a lote y la posibilidad de producción a gran escala de productos liposomales seguros y eficientes.
- 25 35 En un aspecto, las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención pueden incluir, sin limitación, liposomas tales como los formados a partir de liposomas de 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), liposomas DiLa2 de Marina Biotech (Bothell, WA), 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-DMA), 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA) y MC3 (US20100324120) y liposomas que pueden suministrar fármacos de molécula pequeña tales como, entre otros, DOXIL® de Janssen Biotech, Inc. (Horsham, PA). En un aspecto, las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención pueden incluir, sin limitación, liposomas tales como los formados a partir de la síntesis de partículas lipídicas de plásmido estabilizadas (SPLP) o partículas lipídicas de ácido nucleico estabilizadas (SNALP) que se han descrito previamente y han demostrado ser adecuadas para la administración de oligonucleótidos *in vitro* e *in vivo* (véase Wheeler y col. Terapia génica. 1999 6:271-281; Zhang y col. Terapia génica. 1999 6:1438-1447; Jeffs y col. Res. Farm. 2005 22:362- 372; Morrissey y col., Nat Biotechnol. 2005 2:1002-1007; Zimmermann y col., Nature. 2006 441:111-114; Heyes y col. J Contr Rel. 2005 107:276-287; Semple y col. Nature Biotech. 2010 28:172-176; Judge y col. J Clin Invest. 2009 119:661-673; deFougerolles Hum Ter. Gén. 2008 19:125-132). El procedimiento de fabricación original de Wheeler y col. fue un procedimiento de diálisis con detergente, que fue mejorado a continuación por Jeffs y col. y se conoce como el procedimiento de formación espontánea de vesículas. Las formulaciones de liposomas se componen de 3 a 4 componentes lipídicos además de la molécula de ácido nucleico modificado o ARNm. Como ejemplo, un liposoma puede contener, entre otros, 55 % de colesterol, 20 % de disteroilfosfatidilcolina (DSPC), 10 % de PEG-S-DSG y 15 % de 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), tal como lo describen Jeffs y . Como otro ejemplo, ciertas formulaciones de liposomas pueden contener, entre otros, 48 % de colesterol, 20 % de DSPC, 2 % de PEG-c-DMA y 30 % de lípidos catiónicos, donde el lípido catiónico puede ser 1,2-diestearloxi- N,N-dimetilaminopropano (DSDMA), DODMA, DLin-DMA o 1,2-dilinoleniloxi-3-dimetilaminopropano (DLenDMA), como describen Heyes y col.
- 30 45 En un aspecto, las composiciones farmacéuticas pueden incluir liposomas que pueden formarse para administrar ARNmm que puede codificar al menos un inmunógeno. El ARNmm puede ser encapsulado por el liposoma y/o puede estar contenido en un núcleo acuoso que puede ser encapsulado a continuación por el liposoma (véanse las Publicaciones Internacionales N.º WO2012031046, WO2012031043, WO2012030901 y WO2012006378). En otro aspecto, el ARNmm que puede codificar un inmunógeno puede formularse en una emulsión catiónica de aceite en agua donde la partícula de emulsión comprende un núcleo de aceite y un lípido catiónico que puede interactuar con
- 40 55 60

el ARNm que ancla la molécula a la partícula de emulsión (véase la Publicación internacional n.º WO2012006380). En otro aspecto más, la formulación lipídica puede incluir al menos un lípido catiónico, un lípido que puede potenciar la transfección y al menos un lípido que contiene un grupo de cabeza hidrofílico unido a un resto lipídico (Publicación internacional n.º WO2011076807 y publicación de EE. UU. n.º 20110200582). En otro aspecto, el ARNm modificado que codifica un inmunógeno puede formularse en una vesícula lipídica que puede tener entrecruzamientos entre bicapas lipídicas funcionalizadas (véase la publicación de EE. UU. n.º 20120177724).

En un aspecto, el ARNm modificado puede formularse en una vesícula lipídica que puede tener entrecruzamientos entre bicapas lipídicas funcionalizadas.

10 En un aspecto, el ARNm modificado puede formularse en un complejo de polication de lípidos. La formación del complejo lípido-policación se puede lograr mediante procedimientos conocidos en la técnica y/o como se describe en la publicación de EE.UU. N.º 20120178702. Como un ejemplo no limitante, el polication puede incluir un péptido catiónico o un polipéptido tal como, pero sin limitarse a, polilisina, poliornitina y/o poliarginina y los péptidos catiónicos descritos en la Publicación Internacional. N.º WO2012013326. En otro aspecto, el ARNm modificado puede formularse en un complejo de polication de lípidos que puede incluir además un lípido neutro tal como, entre otros, colesterol o dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE).

20 La formulación de liposomas puede estar influenciada por, pero sin limitarse a, la selección del componente lipídico catiónico, el grado de saturación de lípidos catiónicos, la naturaleza de la PEGilación, la proporción de todos los componentes y parámetros biofísicos tales como el tamaño. En un ejemplo de Semple y col. (Semple y col. *Nature Biotech.* 2010;28:172-176), la formulación de liposomas estaba compuesta por 57,1 % de lípido catiónico, 7,1 % de dipalmitoilfosfatidilcolina, 34,3 % de colesterol y 1,4 % de PEG-c-DMA. Como otro ejemplo, el cambio de la composición del lípido catiónico podría administrar de forma más eficaz siARN a diversas células presentadoras de antígenos (Basha y col. *Mol Ther.* 2011;19:2186-2200).

25 En algunos aspectos, la proporción de PEG en las formulaciones de nanopartículas lipídicas (LNP) se puede aumentar o disminuir y/o la longitud de la cadena de carbono del lípido PEG se puede modificar de C14 a C18 para alterar la farmacocinética y/o la biodistribución de las formulaciones de LNP. Como ejemplo no limitante, las formulaciones de LNP pueden contener 1-5 % de la proporción molar de lípidos de PEG-c-DOMG en comparación con el lípido catiónico, DSPC y colesterol. En otro aspecto, el PEG-c-DOMG puede reemplazarse con un lípido de PEG tal como, entre otros, PEG-DSG (1,2-Distearoil-sn-glicerol, metoxipolietenglicol) o PEG-DPG (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol, metoxipolietenglicol). El lípido catiónico se puede seleccionar de cualquier lípido conocido en la técnica tal como, entre otros, DLin-MC3-DMA, DLin-DMA, C12-200 y DLin-KC2-DMA.

30 35 En un aspecto, el lípido catiónico se puede seleccionar de, entre otros, un lípido catiónico descrito en la publicación internacional n.º WO2012040184, WO2011153120, WO2011149733, WO2011090965, WO2011043913, WO2011022460, WO2012061259, WO2012054365, WO2012044638, WO2010080724, WO20121865 y WO2008103276, las patentes de EE. UU. n.º 7.893.302, 7.404.969 y 8.283.333 y la publicación de patente de EE. UU. n.º US20100036115 y US20120202871. En otro aspecto, el lípido catiónico se puede seleccionar de, entre otros, la fórmula A descrita en las Publicaciones Internacionales n.º WO2012040184, WO2011153120, WO2011149733, WO2011090965, WO2011043913, WO2011022460, WO2012061259, WO2012054365 and WO201204463 8. En otro aspecto, el lípido catiónico se puede seleccionar de, entre otros, la fórmula CLI-CLXXIX de la publicación internacional n.º WO2008103276, la fórmula CLI-CLXXIX de la patente de EE. UU. n.º 7.893.302, la fórmula CLI-CLXXIX de la patente de EE. UU. n.º 7.404.969 y la fórmula I-VI de la publicación de patente de EE. UU. n.º US20100036115. Como ejemplo no limitante, el lípido catiónico se puede seleccionar de (20Z,23Z)-N,N-dimetilnonacosa-20,23-dien-10-amina, (17Z,20Z)-N,N-dimemilhexacosa-17, 20-dien-9-amina, (1Z,19Z)-N5N-dimetilpentacosa-16, 19-dien-8-amina, (13Z,16Z)-N,N-dimetildocosa-13,16-dien-5-amina, (12Z,15Z)-N,N-dimetilhenicos-12,15-dien-4-amina, (14Z,17Z)-N,N-dimetiltricos-14,17-dien-6-amina, (15Z,18Z)-N,N-dimetiltetracos-15,18-dien-7-amina, (18Z,21Z)-N,N-dimetilheptacosa-18,21-dien-10-amina, (15Z,18Z)-N,N-dimetiltetracos-15,18-dien-5-amina, (14Z,17Z)-N,N-dimetiltricos-14,17-dien-4-amina, (19Z,22Z)-N,N-dimeihyloctacosa-19,22-dien-9-amina, (18Z,21Z)-N,N-dimetilheptacosa-18,21-dien-8-amina, (17Z,20Z)-N,N-dimetilhexacosa-17,20-dien-7-amina, (16Z,19Z)-N,N-dimetilpentacosa-16,19-dien-6-amina, (22Z,25Z)-N,N-dimetilhentriaconta-22,25-dien-10-amina, (21Z, 24Z)-N,N-dimetiltriaconta-21,24-dien-9-amina, (18Z)-N,N-dimetilheptacos-18-en-10-amina, (17Z)-N,N-dimetilhexacos-17-en-9-amina, (19Z,22Z)-N,N-dimetiloctacosa-19,22-dien-7-amina, N,N-dimetilheptacosan-10-amina, (20Z,23Z)-N-etyl-N-metilnonacosa-20,23-dien-10-amina, 1-[(11Z,14Z)-1-nonilcosa-11,14-dien-1-il] pirrolidina, (20Z)-N,N-dimetilheptacos-20-en-1 0-amina, (15Z)-N,N-dimetil eptacos -15-en-1 0-amina, (14Z)-N,N-dimetilnonacos-14-en-10-amina, (17Z)-N,N-dimetilnonacos-17-en-10-amina, (24Z)-N,N-dimetiltritriaccont-24-en-10-amina, (20Z)-N,N-dimetilnonacos-20-en-1 0-amina, (22Z)-N,N-dimetilhentriaccont-22-en-10-amina, (16Z)-N,N-dimetilpentacos-16-en-8-amina, (12Z,15Z)-N,N-dimetil-2-nonilhenicos-12,15-dien-1-amina, (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina, N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil] eptadecan-8-amina, 1-[(1S,2R)-2-hexilciclopropil]-N,N-dimetilnonadecan-10-amina, N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]nonadecan-10-amina, N,N-dimetil-21-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]henicosan-10-amina, N,N-dimetil-1-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-pentilciclopropil]metil]ciclopropil]nonadecan-10-amina, N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]hexadecan-8-amina, N,N-dimetil-[(1R,2S)-2-undecilciclopropil]tetradecan-5-amina, N,N-

5 dimetil- 3-{7-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]heptil} dodecan-1-amina, 1-[(1R,2S)-2-heptilciclopropil]-N,N-dimetiloctadecan-9-amina, 1-[(1S,2R)-2-decilciclopropil]-N,N-dimetilpentadecan-6-amina, N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]pentadecan-8-amina, R-N, N-dimetil-1-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-3-(octiloxi)propan-2-amina, S-N,N-dimetil-1-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-3-(octiloxi)propan-2-amina, 1-2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-1-[(octiloxi)methyl]etylpirrolidina, (2S)-N,N-dimetil-1-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-3-[(5Z)-oct-5-en-1-iloxi]propan-2-amina, 1-2-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]-1-[(octiloxi)methyl]etylazetidina, (2S)-1-(hexiloxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina, (2S)-1-(heptiloxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina, N,N-dimetil-1-[(noniloxi)-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina, N,N-dimetil-1-[(9Z)-octadec-9-en-1-iloxi]-3-(octiloxi)propan-2-amina; (2S)-N,N-dimetil-1-[(6Z,9Z,12Z)-octadeca-6,9,12-trien-1-iloxi]-3-(octiloxi)propan-2-amina, (2S)-1-[(11Z,14Z)-icos-11,14-dien-1-iloxi]-N,N-dimetil-3-(pentiloxi)propan-2-amina, (2S)-1-(hexiloxi)-3-[(11Z,14Z)-icos-11,14-dien-1-iloxi]-N,N-dimetilpropan-2-amina, 1-[(11Z,14Z)-icos-11,14-dien-1-iloxi]-N,N-dimetil-1-3-(octiloxi)propan-2-amina, 1-[(13Z,16Z)-docosa-13,16-dien-1-iloxi]-N,N-dimetil-3-(octiloxi)propan-2-amina, (2S)-1-[(13Z,16Z)-docosa-13,16-dien-1-iloxi]-3-(hexiloxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina, (2S)-1-[(13Z)-docos-13-en-1-iloxi]-3-(hexiloxi)-N,N-dimetilpropan-2-amina, 1-[(13Z)-docos-13-en-1-iloxi]-N,N-dimetil-3-(octiloxi)propan-2-amina, 1-[(9Z)-hexadec-9-en-1-iloxi]-N,N-dimetil-3-(octiloxi)propan-2-amina, (2R)-N,N-dimetil-H(1-metiloctil)oxi]-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina, (2R)-1-[(3,7-dimetiloctil)oxi]-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-2-amina, N,N-dimetil-1-(octiloxi)-3-[(8-[(1S,2S)-2-[(1R,2R)-2-pentilciclopropil]methyl]cyclopropyl]octil)oxi]propan-2-amina, N,N-dimetil-1-[(8-[(2-ocilciclopropil)octil]oxi)-3-(octiloxi)propano-2-amina y (11E,20Z,23Z)-N,N-dimetilnonacosa-11,20,2-trien-10-amina o una de sus sales o estereoisómeros farmacéuticamente aceptable.

25 En un aspecto, el lípido catiónico puede sintetizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica y/o como se describe en las Publicaciones Internacionales N.º WO2012040184, WO2011153120, WO2011149733, WO2011090965, WO2011043913, WO2011022460, WO2012061259, WO2012054365, WO2012044638, WO2010080724 y WO201021865.

En un aspecto, la formulación de LNP puede contener PEG-c-DOMG en una proporción molar de lípidos del 3 %. En otro aspecto, la formulación de LNP puede contener PEG-c-DOMG en una proporción molar de lípidos del 1,5 %.

30 En un aspecto, la formulación de LNP puede contener PEG-DMG 2000 (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(poletilenglicol)-2000). En un aspecto, la formulación de LNP puede contener PEG-DMG 2000, un lípido catiónico conocido en la técnica y al menos otro componente. En otro aspecto, la formulación de LNP puede contener PEG-DMG 2000, un lípido catiónico conocido en la técnica, DSPC y colesterol. Como ejemplo no limitativo, la formulación de LNP puede contener PEG-DMG 2000, DLin-DMA, DSPC y colesterol. Como otro ejemplo no limitativo, la formulación de LNP puede contener PEG-DMG 2000, DLin-DMA, DSPC y colesterol en una proporción molar de 2:40:10:48 (véase, por ejemplo, Geall y col., Administración no viral de vacunas de ARN de auto-amplificación, PNAS 2012; PMID: 22908294).

40 En un aspecto, la formulación de LNP puede formularse mediante los procedimientos descritos en las Publicaciones Internacionales N.º WO2011127255 o WO2008103276. Como ejemplo no limitativo, el ARN modificado descrito en esta invención puede encapsularse en formulaciones de LNP como se describe en los documentos WO2011127255 y/o WO2008103276. Como otro ejemplo no limitante, el ARN modificado descrito en esta invención puede formularse en una nanopartícula para administrarse por vía parenteral, como se describe en la publicación de EE. UU. N.º 20120207845.

45 En un aspecto, las formulaciones de LNP descritas en esta invención pueden comprender una composición poliacidónica. Como ejemplo no limitativo, la composición poliacidónica se puede seleccionar de la fórmula 1-60 de la publicación de patente de EE. UU. n.º US20050222064. En otro aspecto, las formulaciones de LNP que comprenden una composición poliacidónica se pueden usar para la administración del ARN modificado descrito en esta invención *in vivo* y/o *in vitro*.

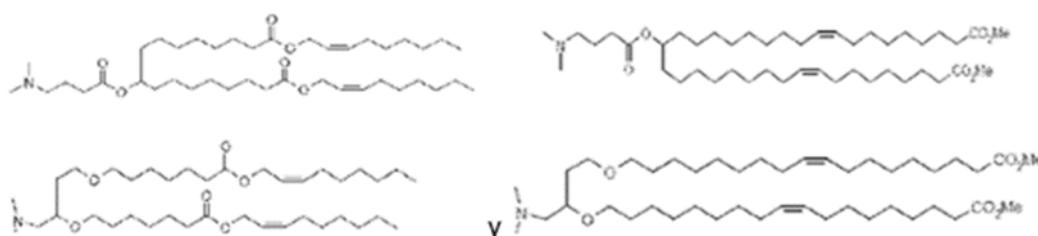
55 En un aspecto, las formulaciones de LNP descritas en esta invención pueden comprender adicionalmente una molécula potenciadora de la permeabilidad. Las moléculas potenciadoras de la permeabilidad no limitativas se describen en la publicación de patente de EE.UU. n.º US20050222064.

En un aspecto, las formulaciones de LNP descritas en esta invención pueden comprender adicionalmente una molécula potenciadora de la permeabilidad. Las moléculas potenciadoras de la permeabilidad no limitativas se describen en la publicación de patente de EE.UU. n.º US20050222064.

60 En un aspecto, las formulaciones de nanopartículas pueden ser una nanopartícula de carbohidrato que comprende un vehículo de carbohidrato y una molécula de ácido nucleico modificada (por ejemplo, ARNm). Como un ejemplo no limitativo, el portador de carbohidrato puede incluir, pero no se limita a, un fitoglucógeno modificado con anhídrido o material de

tipo glucógeno, octenilsuccinato de fotoglucógeno, beta-dextrina de fitoglucógeno, beta-dextrina de fitoglucógeno modificada con anhídrido. (Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO2012109121).

- 5 Las formulaciones de nanopartículas lipídicas se pueden mejorar reemplazando el lípido catiónico con un lípido catiónico biodegradable que se conoce como nanopartícula lipídica de eliminación rápida (reLNP). Se ha demostrado que los lípidos catiónicos ionizables, tales como, entre otros, DLinDMA, DLin-KC2-DMA y DLin-MC3-DMA, se acumulan en el plasma y los tejidos con el tiempo y pueden ser una fuente potencial de toxicidad. El rápido metabolismo de los lípidos rápidamente eliminados puede mejorar la tolerabilidad y el índice terapéutico de las nanopartículas lipídicas en un orden de magnitud desde una dosis de 1 mg/kg hasta una dosis de 10 mg/kg en ratas.
- 10 10 La inclusión de un enlace éster degradado enzimáticamente puede mejorar el perfil de degradación y metabolismo del componente catiónico, manteniendo al mismo tiempo la actividad de la formulación reLNP. El enlace éster puede ubicarse internamente dentro de la cadena lipídica o puede ubicarse terminalmente en el extremo terminal de la cadena lipídica. El enlace éster interno puede reemplazar cualquier carbono en la cadena lipídica.
- 15 15 En un aspecto, el enlace éster interno puede ubicarse en cualquier lado del carbono saturado. Los ejemplos no limitantes de reLNP incluyen,



- 20 20 En un aspecto, se puede provocar una respuesta inmunitaria administrando una nanopartícula lipídica que puede incluir una nanoespecie, un polímero y un inmunógeno. (Publicación de EE. UU. N.º 20120189700 y Publicación internacional N.º WO2012099805). El polímero puede encapsular las nanoespecies o encapsular parcialmente las nanoespecies. El inmunógeno puede ser una proteína recombinante, un ARN modificado descrito en esta invención. En un aspecto, la nanopartícula lipídica puede formularse para su uso en una vacuna tal como, pero sin limitarse a, contra un patógeno.

Las nanopartículas de lípidos pueden diseñarse para alterar las propiedades superficiales de las partículas de manera que las nanopartículas de lípidos puedan penetrar la barrera de la mucosa. El moco se encuentra en el tejido mucoso tal como, entre otros, el oral (p. ej., las membranas bucales y esofágicas y el tejido de las amígdalas), oftálmico, gastrointestinal (p. ej., estómago, intestino delgado, intestino grueso, colon, recto), nasal, respiratorio (p. ej., membranas nasales, faríngeas, traqueales y bronquiales), genital (p. ej., membranas vaginales, cervicales y uretrales). Se ha pensado que las nanopartículas de más de 10-200 nm que se prefieren para una mayor eficiencia de encapsulación de fármacos y la capacidad de proporcionar la administración sostenida de una amplia gama de fármacos son demasiado grandes para difundirse rápidamente a través de las barreras mucosas. La mucosidad se secreta, elimina, desecha o digiere y recicla continuamente, de modo que la mayoría de las partículas atrapadas pueden eliminarse del tejido mucoso en segundos o en unas pocas horas. Grandes nanopartículas poliméricas (200nm -500nm de diámetro) que han sido recubiertas densamente con un polietilenglicol (PEG) de bajo peso molecular que se difunde a través del moco solo de 4 a 6 veces menos que las mismas partículas que se difunden en el agua (Lai y col. PNAS 2007 104 (5):1482-487, Lai y col. Adv Rev. Admin. Farm. 2009 61(2): 158-171). El transporte de nanopartículas puede determinarse utilizando tasas de permeación y/o técnicas de microscopía fluorescente que incluyen, entre otras, recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP) y seguimiento de partículas múltiples (MPT) de alta resolución. Como ejemplo no limitante, las composiciones que pueden penetrar una barrera mucosa pueden fabricarse como se describe en la patente de EE.UU. N.º 8.241.670.

- 45 45 La nanopartícula lipídica diseñada para penetrar la mucosidad puede comprender un material polimérico (es decir, un núcleo polimérico) y/o un conjugado de polímero-vitamina y/o un copolímero tribloqueo. El material polimérico puede incluir, entre otros, poliaminas, poliéteres, poliamidas, poliésteres, policarbamatos, poliureas, policarbonatos, poli(estirenos), poliimidás, polisulfonas, poliuretanos, poliacetilenos, polietilenos, polietileniminas, poliisocianatos, poliacrilatos, polimetacrilatos, poliacrilonitrilos y poliarilatos. El material polimérico puede ser biodegradable y/o biocompatible. El material polimérico también puede irradiarse. Como ejemplo no limitativo, el material polimérico puede irradiarse con rayos gamma (véase, por ejemplo, la solicitud internacional n.º WO201282165). Los ejemplos no limitantes de polímeros específicos incluyen polí(caprolactona) (PCL), polímero de acetato de vinilo de etileno (EVA), polí(ácido láctico) (PLA), polí(ácido L-láctico) (PLLA), polí(ácido glicólico) (PGA), polí(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), polí(ácido L-láctico-co-ácido glicólico) (PLLGA), polí(D,L-lactida) (PDLA), polí(L-lactida) (PLLA), polí(D,L-lactida-co-caprolactona), polí(D,L-lactida-co-caprolactona-co-glicolida), polí(D,L-lactida-co-PEO-co-D,L-

lactida), poli(D,L-lactida-co-PPO-co-D,L-lactida), cianoacralato de polialquilo, poliuretano, poli-L-lisina (PLL), metacrilato de hidroxipropilo (HPMA), polietilenglicol, ácido poli-L-glutámico, poli(hidroxiácidos), polianhídridos, poliortoésteres, poli(esteramidas), poliamidas, poli(ésteréteres), policarbonatos, polialquilenos tales como el polietileno y el polipropileno, polialquilenglicos tales como el poli(etilenglicol) (PEG), óxidos de polialquileno (PEO), tereftalatos de polialquileno tales como poli(tereftalato de etileno), alcoholes polivinílicos (PVA), éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo tales como poli(acetato de vinilo), haluros de polivinilo tal como poli(cloruro de vinilo) (PVC), polivinilpirrolidona, polisiloxanos, poliestireno (PS), poliuretanos, celulosas derivatizadas tales como alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, hidroxipropilcelulosas, carboximetilcelulosas, polímeros de ácidos acrílicos, tales como poli(metil(met)acrilato) (PMMA), poli(etil(met)acrilato), poli(butil(met)acrilato), poli((met)acrilato de isobutilo), poli((met)acrilato de hexilo), poli((met)acrilato de isodecilo), poli((met)acrilato de laurilo), poli((met)acrilato de fenilo), poli(metilacrilato) , poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo) y copolímeros y mezclas de los mismos, polidioxanona y sus copolímeros, polihidroxialcanoatos, polipropileno fumarato, polioximileno, poloxámeros, poli(ortho)ésteres, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona) y carbonato de trimetileno, polivinilpirrolidona. La nanopartícula lipídica se puede recubrir o asociar con un co-polímero tal como, entre otros, un copolímero de bloque y copolímero tribloque de (poli(etilenglicol))-(poli(óxido de propileno))-(poli(etilenglicol)) (véase, por ejemplo, la Publicación de EE. UU. 20120121718 y la Publicación de EE. UU. 20100003337 y la Patente de EE. UU. N.º 8.263.665). El copolímero puede ser un polímero que generalmente se considera seguro (GRAS) y la formación de la nanopartícula lipídica puede ser tal que no se creen nuevas entidades químicas. Por ejemplo, la nanopartícula lipídica puede comprender poloxámeros que recubren nanopartículas de PLGA sin formar nuevas entidades químicas que todavía pueden penetrar rápidamente en la mucosidad humana (Yang y col. Angew. Chem. Int. Ed. 2011 50:2597-2600).

La vitamina del conjugado polímero-vitamina puede ser vitamina E. La porción de vitamina del conjugado puede sustituirse con otros componentes adecuados tales como, entre otros, vitamina A, vitamina E, otras vitaminas, colesterol, un resto hidrofóbico o un componente hidrófobo de otros tensioactivos (por ejemplo, cadenas de esterolos, ácidos grasos, cadenas de hidrocarburos y cadenas de óxido de alquieno).

La nanopartícula lipídica diseñada para penetrar la mucosidad puede incluir agentes que alteran la superficie tales como, entre otros, ARNm, proteínas aniónicas (p. ej., albúmina de suero bovino), tensioactivos (p. ej., tensioactivos catiónicos tales como, por ejemplo, bromuro de dimetildioctadecil-amonio), azúcares o derivados del azúcar (p. ej., ciclodextrina), ácidos nucleicos, polímeros (p. ej., heparina, polietilenglicol y poloxámero), agentes mucolíticos (p. ej., N-acetilcisteína, artemisa, bromelina, papaína, clerodendrum, acetilcisteína, bromhexina, carbocisteína, eprazinona, mesna, ambroxol, sobrerol, domiodol, letosteína, estepronina, tiopronina, gelsolina, timosina β 4 dornasa alfa, neltrexina, erdosteína) y varias DNAs, incluida la rhDNAsa. El agente de alteración de la superficie puede incorporarse o enredarse en la superficie de la partícula o disponerse (p. ej., mediante recubrimiento, adsorción, enlace covalente u otro proceso) sobre la superficie de la nanopartícula lipídica (véase, por ejemplo, la Publicación de EE. UU. 20100215580 y la Publicación de EE. UU. 20080166414).

Las nanopartículas lipídicas que penetran en la mucosidad pueden comprender al menos un ARNm descrito en esta invención. El ARNm puede encapsularse en la nanopartícula lipídica y/o disponerse sobre la superficie de la partícula. El ARNm puede acoplarse covalentemente a la nanopartícula lipídica. Las formulaciones de nanopartículas lipídicas que penetran en la mucosidad pueden comprender una pluralidad de nanopartículas. Además, las formulaciones pueden contener partículas que pueden interactuar con la mucosidad y alterar las propiedades estructurales y/o adhesivas de la mucosidad circundante para disminuir la mucoadhesión, lo que puede aumentar el suministro de nanopartículas lipídicas que penetran en la mucosidad al tejido mucoso.

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico modificado o ARNm se formula como un lipoplejo, tal como, sin limitación, el sistema ATUPLEX™, el sistema DACC, el sistema DBTC y otra tecnología de lipoplejo de siARN de Terapéutica de silencio (Londres, Reino Unido) , STEMFFECT™ de STEMGENT® (Cambridge, MA) y polietilenimina (PEI) o suministro de ácidos nucleicos dirigido y no dirigido basado en protamina (Aleku y col. Res. Cáncer 2008 68:9788-9798; Strumberg y col. Int J Clin Ter. Farmacol. 2012 50:76-78, Santel y col., Ter. génica 2006 13:1222-1234, Santel y col., Ter. génica 2006 13:1360-1370, Gutbier y col., Pulm Pharmacol. Ther. 2010 23:334-344; Kaufmann et al. Microvasc Res 2010 80:286-293Weide et al. J Immunother. 2009 32:498-507; Weide et al. J Immunother. 2008 31:180-188; Pascolo Expert Opin. Biol. Ther. 4:1285-1294; Fotin-Mleczek y col., 2011 J. Immunother.34:1-15;Song y col., Nature Biotechnol. 2005, 23:709-717; Peer y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2007 6:104:4095-4100; deFougerolles Hum Ter. Génica 2008 19:125-132).

En un aspecto, tales formulaciones también pueden construirse o modificarse las composiciones de manera que se dirijan pasiva o activamente a diferentes tipos de células *in vivo*, incluidos, entre otros, hepatocitos, células inmunitarias, células tumorales, células endoteliales, células presentadoras de antígenos y leucocitos (Akinc y col. Ter. Mol 2010 18:1357-1364; Song y col., Nat Biotechnol. 2005 23:709-717; Judge y col., J Clin Invest. 2009 119:661-673; Kaufmann y col., Res Microvasc 2010 80:286-293; Santel y col., Ter. génica 2006 13:1222-1234; Santel y col., Ter. génica 2006 13:1360-1370; Gutbier y col., Ter. Farmacol. Pulm 2010 23: 334-344, Basha y col., Ter. Mol. 2011 19:2186-2200, Fenske y Cullis, Expert Opin Admin. Farm. 2008 5:25-44, Peer y col., Science. 2008 319:627-630; Peer

- y Lieberman, Ter. génica 2011 18:1127-1133). Un ejemplo de orientación pasiva de formulaciones a células hepáticas incluye las formulaciones de nanopartículas lipídicas basadas en DLin-DMA, DLin-KC2-DMA y DLin-MC3-DMA que han demostrado unirse a la apolipoproteína E y promover la unión y la absorción de estas formulaciones en hepatocitos *in vivo* (Akinc y col., Ter. Mol. 2010 18:1357-1364). Las formulaciones también pueden dirigirse selectivamente a través 5 de la expresión de diferentes ligandos en su superficie, como lo exemplifican, entre otros, folato, transferrina, N-acetilgalactosamina (GalNAc) y enfoques dirigidos a anticuerpos (Kolhatkar y col., Tecnol. Descubr. Farmac. Act. 2011), 8:197-206; Musacchio y Torchilin, Front Biosci. 2011 16:1388-1412; Yu y col., Biol. Miembr. Mol. 2010 27:286-298; Patil y col., Sist. Portador Farm. Ter. Rev. Crit. 2008 25 :1-61; Benoit y col., Biomacromoléculas. 2011 12:2708-10 2714; Zhao y col., Admin. Farm. Opin Experto 2008 5:309-319; Akinc y col., Ter. Mol. 2010 18:1357-1364 Srinivasan y col., Procedimientos Biol. Mol. 2012 820:105-116; Ben-Arie y col., Procedimientos Biol. Mol. 2012 757:497-507; Peer 2010 J Liberación de control 20:63-68; Peer y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2007 104:4095-4100, Kim y col., Procedimientos Biol. Mol. 2011 721:339-353, Subramanya y col., Ter. Mol 2010 18:2028-2037, Song y col. , Nat Biotechnol. 2005 23:709-717; Peer y col., Science. 2008 319:627-630; Peer y Lieberman, Ter. génica 2011 18:1127-1133).
- 15 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm se formulan como una nanopartícula lipídica sólida. Una nanopartícula lipídica sólida (SLN) puede ser esférica con un diámetro promedio entre 10 y 1.000 nm. SLN posee una matriz de núcleo de lípido sólido que puede solubilizar moléculas lipofílicas y puede estabilizarse con tensioactivos y/o emulsionantes. En otro aspecto, la nanopartícula de lípidos puede ser una nanopartícula de polímero 20 de lípidos de autoensamblaje (véase Zhang y col., ACS Nano, 2008, 2 (8), págs. 1696-1702).
- 25 Se pueden usar liposomas, lipoplejos o nanopartículas de lípidos para mejorar la eficacia de las moléculas de ácido nucleico modificadas o la producción de proteínas dirigida por ARNm, ya que estas formulaciones pueden aumentar la transfección celular por la molécula de ácido nucleico modificada o el ARNm; y/o aumentar la traducción de la proteína codificada. Uno de tales ejemplos implica el uso de encapsulación de lípidos para permitir el suministro sistemático eficaz de ADN de plásmido poliplex (Heyes y col., Ter. Mol. 2007 15:713-720). Los liposomas, lipoplejos o nanopartículas lipídicas también se pueden usar para aumentar la estabilidad de las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm.
- 30 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNm pueden formularse para liberación controlada y/o administración dirigida. Como se usa en esta invención, "liberación controlada" se refiere a una composición farmacéutica o perfil de liberación de compuesto que se ajusta a un patrón particular de liberación para lograr un resultado terapéutico. En un aspecto, las moléculas de ácidos nucleicos modificados o el ARNm se pueden encapsular en un agente de administración descrito en esta invención y/o conocido en la técnica para liberación 35 controlada y/o administración dirigida. Como se usa en esta invención, el término "encapsular" significa contener, rodear o encerrar. En lo que se refiere a la formulación de los compuestos de la descripción, la encapsulación puede ser sustancial, completa o parcial. El término "sustancialmente encapsulado" significa que al menos más del 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,9 o más del 99,999 % de la composición o compuesto farmacéutico puede estar contenido, rodeado o encerrado dentro del agente de administración. "Encapsulación parcial" significa que 40 menos de 10, 10, 20, 30, 40, 50 o menos de la composición o compuesto farmacéutico puede contenerse, rodearse o encerrarse dentro del agente de administración. Ventajosamente, la encapsulación puede determinarse midiendo el escape o la actividad de la composición o compuesto farmacéutico usando micrografía de fluorescencia y/o electrónica. Por ejemplo, al menos 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 o más del 99,99 % del compuesto o composición farmacéutica están encapsulados en el agente de administración.
- 45 En un aspecto, la formulación de liberación controlada puede incluir, entre otros, co-polímeros de tres bloques. Como ejemplo no limitativo, la formulación puede incluir dos tipos diferentes de co-polímeros de tres bloques (Publicación internacional n.º WO2012131104 y WO2012131106).
- 50 En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o el ARNm se pueden encapsular en una nanopartícula lipídica o una nanopartícula lipídica eliminada rápidamente y las nanopartículas lipídicas o una nanopartícula lipídica eliminada rápidamente se pueden encapsular en un polímero, hidrogel y/o sellador quirúrgico descrito en esta invención y/o conocido en la técnica. Como ejemplo no limitativo, el polímero, hidrogel o sellador quirúrgico puede ser PLGA, etileno vinil acetato (EVAc), poloxámero, GELSITE® (Nanotherapeutics, Inc. Alachua, FL), HYLENEX® (Halozyme Therapeutics, San Diego CA), selladores quirúrgicos tales como polímeros de fibrinógeno (Ethicon Inc. Cornelius, GA), TISSELL® (Baxter International, Inc Deerfield, IL), selladores basados en PEG y COSEAL® (Baxter International, Inc Deerfield, IL).
- 55 En otro aspecto, la nanopartícula lipídica se puede encapsular en cualquier polímero conocido en la técnica que pueda formar un gel cuando se inyecta en un sujeto. Como ejemplo no limitativo, la nanopartícula lipídica puede encapsularse en una matriz polimérica que puede ser biodegradable.
- 60 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o la formulación de ARNm para liberación controlada

- 5 y/o administración dirigida también pueden incluir al menos un recubrimiento de liberación controlada. Los recubrimientos de liberación controlada incluyen, entre otros, OPADRY®, polivinilpirrolidona/copolímero de acetato de vinilo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmelcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, EUDRAGIT RL®, EUDRAGIT RS® y derivados de celulosa tales como las dispersiones acuosas de etilcelulosa (AQUACOAT® y SURELEASE®).
- 10 En un aspecto, la formulación de liberación controlada y/o liberación dirigida puede comprender al menos un poliéster degradable que puede contener cadenas laterales poliacetónicas. Los poliésteres degradables incluyen, entre otros, poli(éster de serina), poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) y combinaciones de los mismos. En otro aspecto, los poliésteres degradables pueden incluir una conjugación de PEG para formar un polímero PEGilado.
- 15 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNmm pueden encapsularse en una nanopartícula terapéutica. Las nanopartículas terapéuticas pueden formularse mediante procedimientos descritos en esta invención y conocidos en la técnica, tales como, entre otros, las publicaciones internacionales n.º WO2010005740, WO2010030763, WO2010005721, WO2010005723, WO2012054923, las publicaciones de EE. UU. n.º US20110262491, US20100104645, US20100087337, US20100068285, US20110274759, US20100068286 y US20120288541, y la patente de EE. UU. n.º N 8.206.747, 8.293.276 8.318.208 y 8.318.211. En otro aspecto, las nanopartículas poliméricas terapéuticas pueden identificarse mediante los procedimientos descritos en la publicación de EE. UU. n.º US20120140790.
- 20 En un aspecto, la nanopartícula terapéutica puede formularse para liberación sostenida. Como se usa en esta invención, "liberación sostenida" se refiere a una composición o compuesto farmacéutico que se ajusta a una tasa de liberación durante un período de tiempo específico. El período de tiempo puede incluir, entre otros, horas, días, semanas, meses y años. Como ejemplo no limitativo, la nanopartícula de liberación sostenida puede comprender un polímero y un agente terapéutico tal como, entre otros, las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm (véase la publicación internacional n.º 2010075072 y la publicación de EE. UU. n.º US20100216804, US20110217377 y US20120201859).
- 25 En un aspecto, las nanopartículas terapéuticas pueden formularse para que sean específicas de la diana. Como ejemplo no limitativo, las nanopartículas terapéuticas pueden incluir un corticoesteroide (véase la publicación internacional n.º WO2011084518). En un aspecto, las nanopartículas terapéuticas pueden formularse para que sean específicas para el cáncer. Como ejemplo no limitante, las nanopartículas terapéuticas pueden formularse en nanopartículas descritas en las Publicaciones Internacionales N.º WO2008121949, WO2010005726, WO2010005725, WO2011084521 y las Publicaciones de EE. UU. N.º US20100069426, US20120004293 y US20100104655.
- 30 En un aspecto, las nanopartículas pueden comprender una matriz polimérica. Como ejemplo no limitativo, la nanopartícula puede comprender dos o más polímeros tales como, pero sin limitarse a, polietilenos, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, polipropilfumeratos, policaprolactonas, poliamidas, poliacetales, poliéteres, poliésteres, poli(orthoésteres), policianoacrílatos, alcoholes polivinílicos, poliuretanos, polifosfacenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, policianoacrílatos, poliureas, poliestirenos, poliaminas, polilisina, poli(etilenimina), poli(éster de serina), poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(4-éster de hidroxi-L-prolina) o combinaciones de los mismos.
- 35 En un aspecto, la nanopartícula terapéutica comprende un copolímero dibloque. En un aspecto, el copolímero dibloque puede incluir PEG en combinación con un polímero tal como, entre otros, polietilenos, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, polipropilfumeratos, policaprolactonas, poliamidas, poliacetales, poliéteres, poliésteres, poli(orthoésteres), policianoacrílatos, alcoholes polivinílicos, poliuretanos, polifosfacenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, policianoacrílatos, poliureas, poliestirenos, poliaminas, polilisina, poli(etilenimina), poli(éster de serina), poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster 4-hidroxi-L-prolina) o combinaciones de los mismos.
- 40 En un aspecto, la nanopartícula terapéutica comprende un copolímero de bloque PLGA-PEG (véase la publicación de EE. UU. n.º US20120004293 y la patente de EE. UU. n.º 8.236.330) o copolímeros en bloque PLGA-PEG-PLGA (véase la patente estadounidense nº 6.004.573).. En otro ejemplo no limitativo, la nanopartícula terapéutica es una nanopartícula sigilosa que comprende un copolímero dibloque de PEG y PLA o PEG y PLGA (véase la patente de EE. UU. n.º 8.246.968).
- 45 En un aspecto, la nanopartícula terapéutica puede comprender un copolímero multibloque (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 8.263.665 y 8.287.910).
- 50 En un aspecto, los copolímeros de bloques descritos en esta invención pueden incluirse en un complejo de polímeros que comprende una micela no polimérica y el copolímero de bloques. (Véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. n.º 20120076836).

En un aspecto, la nanopartícula terapéutica puede comprender al menos un polímero acrílico. Los polímeros acrílicos incluyen, entre otros, ácido acrílico, ácido metacrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), policianoacrilatos y combinaciones de los mismos.

- 5 En un aspecto, las nanopartículas terapéuticas pueden comprender al menos un polímero catiónico descrito en esta invención y/o conocido en la técnica.
- 10 En un aspecto, las nanopartículas terapéuticas pueden comprender al menos un polímero que contiene amina tal como, entre otros, polilisina, polietilenimina, poli(amidoamina) dendrímeros, poli(beta-amino ésteres) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 8.287.849) y combinaciones de los mismos.
- 15 En un aspecto, las nanopartículas terapéuticas pueden comprender al menos un poliéster degradable que puede contener cadenas laterales poliacidónicas. Los poliésteres degradables incluyen, entre otros, poli(éster de serina), poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster 4-hidroxi-L-prolina) y combinaciones de los mismos. En otro aspecto, los poliésteres degradables pueden incluir una conjugación de PEG para formar un polímero PEGilado.
- 20 En otro aspecto, la nanopartícula terapéutica puede incluir una conjugación de al menos un ligando dirigido. El ligando de diana puede ser cualquier ligando conocido en la técnica tal como, pero sin limitación, un anticuerpo monoclonal. (Kirpotin y col, Res. Cáncer 2006 66:6732-6740).
- 25 En un aspecto, la nanopartícula terapéutica se puede formular en una solución acuosa que se puede usar para combatir el cáncer (véase la publicación internacional n.º WO2011084513 y la publicación de EE. UU. n.º US20110294717).
- 30 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm pueden encapsularse, unirse y/o asociarse con nanoportadores sintéticos. Los nanoportadores sintéticos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la Publicación internacional n.º WO2010005740, WO2010030763, WO201213501, WO2012149252, WO2012149255, WO2012149259, WO2012149265, WO2012149268, WO2012149282, WO2012149301, WO2012149393, WO2012149405, WO2012149411 y WO2012149454 y las publicaciones de EE. UU. n.º US20110262491, US20100104645, US20100087337 y US20120244222.
- 35 Los nanoportadores sintéticos pueden formularse utilizando procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en esta invención. Como ejemplo no limitativo, los nanoportadores sintéticos pueden formularse mediante los procedimientos descritos en las Publicaciones Internacionales n.º WO2010005740, WO2010030763 y WO201213501 y las publicaciones de EE. UU. n.º US20110262491, US20100104645, US20100087337 y US20120244222.
- 40 En otro aspecto, las formulaciones de nanoportadores sintéticos pueden liofilizarse mediante procedimientos descritos en la publicación internacional n.º WO2011072218 y la Patente de EE.UU. n.º 8.211.473.
- 45 En un aspecto, los nanoportadores sintéticos pueden contener grupos reactivos para liberar las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNmm descrito en esta invención (véase la publicación internacional n.º WO20120952552 y la publicación de EE. UU. n.º US20120171229).
- 50 En un aspecto, los nanoportadores sintéticos pueden contener un agente inmunoestimulador para potenciar la respuesta inmunitaria a partir del suministro del nanoportador sintético. Como ejemplo no limitante, el nanoportador sintético puede comprender un agente inmunoestimulador Th1 que puede potenciar una respuesta basada en Th1 del sistema inmunitario (véase la publicación internacional n.º WO2010123569 y la publicación de EE. UU. n.º US20110223201).
- 55 En un aspecto, los nanoportadores sintéticos pueden formularse para una liberación dirigida. En un aspecto, el nanoportador sintético se formula para liberar las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNmm a un pH específico y/o después de un intervalo de tiempo deseado. Como ejemplo no limitativo, la nanopartícula sintética puede formularse para liberar las moléculas de ARNm modificadas y/o el ARNmm después de 24 horas y/o a un pH de 4.5 (véanse las publicaciones internacionales n.º WO2010138193 y WO2010138194 y las publicaciones de EE. UU. n.º US20110020388 y US20110027217).
- 60 En un aspecto, los nanoportadores sintéticos pueden formularse para la liberación controlada y/o sostenida de las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o ARNmm descritos en esta invención. Como ejemplo no limitativo, los nanoportadores sintéticos para liberación sostenida se pueden formular mediante procedimientos conocidos en la técnica, descritos en este documento y/o como se describe en la publicación internacional n.º WO2010138192 y la publicación de EE. UU. n.º 20100303850.

- En un aspecto, el nanoportador sintético puede formularse para su uso como vacuna. En un aspecto, el nanoportador sintético puede encapsular al menos una molécula de ácido nucleico modificado y/o ARNm que codifica al menos un antígeno. Como ejemplo no limitante, el nanoportador sintético puede incluir al menos un antígeno y un excipiente para una forma de dosificación de vacuna (véase la Publicación internacional n.º WO2011150264 y la Publicación de EE. UU. n.º US20110293723).
- Como otro ejemplo no limitativo, una forma de dosificación de vacuna puede incluir al menos dos nanoportadores sintéticos con antígenos iguales o diferentes y un excipiente (véase la publicación internacional n.º WO2011150249 y la publicación de EE. UU. n.º US20110293701).
- La forma de dosificación de la vacuna se puede seleccionar mediante procedimientos descritos en esta invención, conocidos en la técnica y/o descritos en la publicación internacional n.º WO2011150258 y la publicación de EE. UU. n.º US20120027806.
- En un aspecto, el nanoportador sintético puede comprender al menos una molécula de ácido nucleico modificado y/o ARNm que codifica al menos un adyuvante. En otro aspecto, el nanoportador sintético puede comprender al menos una molécula de ácido nucleico modificada y/o ARNm y un adyuvante. Como ejemplo no limitativo, el nanoportador sintético que comprende y el adyuvante puede formularse mediante los procedimientos descritos en la publicación internacional n.º WO2011150240 y la publicación de EE. UU. n.º US20110293700.
- En un aspecto, el nanoportador sintético puede encapsular al menos una molécula de ácido nucleico modificado y/o ARNm que codifica un péptido, fragmento o región de un virus. Como ejemplo no limitativo, el nanoportador sintético puede incluir, entre otros, los nanoportadores descritos en las publicaciones internacionales n.º WO2012024621, WO201202629, WO2012024632 y las publicaciones de EE. UU. n.º US20120064110, US20120058153 y US20120058154.
- En un aspecto, la nanopartícula puede optimizarse para la administración oral. La nanopartícula puede comprender al menos un biopolímero catiónico tal como, entre otros, quitosano o un derivado del mismo. Como ejemplo no limitativo, la nanopartícula puede formularse mediante los procedimientos descritos en la publicación de EE.UU. n.º 20120282343.
- Polímeros, Nanopartículas Biodegradables y Nanopartículas de núcleo corteza**
- Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNm se pueden formular usando polímeros naturales y/o sintéticos. Los ejemplos no limitantes de polímeros que se pueden usar para la administración incluyen, entre otros, formulaciones de DYNAMIC POLYCONJUGATE® (Arrowhead Research Corp., Pasadena, CA) de MIRUS® Bio (Madison, WI) y Roche Madison (Madison, WI), formulaciones de polímeros PHASERX™ tal como, entre otros, SMARTT POLYMER TECHNOLOGY™ (Seattle, WA), DMRI/DOPE, poloxámero, adyuvante VAXFECTIN® de Vical (San Diego, CA), quitosano, ciclodextrina de Calando Pharmaceuticals (Pasadena, CA), dendrímeros y polímeros de polí(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), polímeros RONDEL™ (suministro de nanopartículas de oligonucleótidos/RNAi) (Arrowhead Research Corporation, Pasadena, CA) y polímeros cobloque sensibles al pH tales como, entre otros a, PHASERX™ (Seattle, WA).
- Un ejemplo no limitativo de formulación de quitosano incluye un núcleo de quitosano cargado positivamente y una porción exterior de sustrato cargado negativamente (Publicación de EE. UU. N.º 20120258176). El quitosano incluye, entre otros, N-trimetilquitosano, mono-N-carboximetilquitosano (MCC), N-palmitoilquitosano (NPCS), EDTA-quitosano, quitosano de bajo peso molecular, derivados de quitosano o combinaciones de los mismos.
- Un ejemplo no limitativo de formulación de quitosano incluye un núcleo de quitosano cargado positivamente y una porción exterior de sustrato cargado negativamente (Publicación de EE. UU. N.º 20120258176). El quitosano incluye, entre otros, N-trimetilquitosano, mono-N-carboximetilquitosano (MCC), N-palmitoilquitosano (NPCS), EDTA-quitosano, quitosano de bajo peso molecular, derivados de quitosano o combinaciones de los mismos.
- En un aspecto, los polímeros usados en la presente descripción se han sometido a procesamiento para reducir y/o inhibir la unión de sustancias no deseadas tales como, entre otras, bacterias, a la superficie del polímero. El polímero puede procesarse mediante procedimientos conocidos y/o descritos en la técnica y/o descritos en la Publicación internacional núm. N.º WO2012150467.
- Un ejemplo no limitativo de formulaciones de PLGA incluye, entre otros, depósitos inyectables de PLGA (por ejemplo, ELIGARD® que se forma disolviendo PLGA en 66 % de N-metil-2-pirrolidona (NMP) y siendo el resto disolvente acuoso y leuprolide. Una vez inyectados, el PLGA y el péptido de leuprolide precipitan en el espacio subcutáneo).

- Muchos de estos enfoques de polímeros han demostrado eficacia en la administración de oligonucleótidos *in vivo* en el citoplasma celular (revisado en deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132). Dos enfoques de polímeros que han producido una administración *in vivo* sólida de ácidos nucleicos, en este caso con ARN de interferencia pequeño (siARN), son los policonjugados dinámicos y las nanopartículas basadas en ciclodextrina. El primero de estos enfoques de administración utiliza policonjugados dinámicos y se ha demostrado *in vivo* en ratones que administra de forma eficaz siARN y silencia el ARNm diana endógeno en hepatocitos (Rozema y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2007 104:12982-12887). Este enfoque particular es un sistema polimérico multicomponente cuyas características clave incluyen un polímero activo en la membrana al que el ácido nucleico, en este caso siARN, se acopla covalentemente a través de un enlace disulfuro y donde tanto el PEG (para enmascarar la carga) como la N-acetilgalactosamina (para el hepatocito dirigido) se unen mediante enlaces sensibles al pH (Rozema y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2007 104:12982-12887).
- Al unirse al hepatocito y entrar en el endosoma, el complejo polimérico se desacopla en el entorno de pH bajo, y el polímero expone su carga positiva, lo que conduce al escape endosomal y la liberación citoplasmática del siARN del polímero. Mediante la sustitución del grupo de N-acetilgalactosamina por un grupo de manosa, se demostró que se podía alterar la orientación de los hepatocitos que expresan el receptor de asialoglicoproteína al endotelio sinusoidal y las células de Kupffer. Otro enfoque de polímero implica el uso de nanopartículas de policationes que contienen ciclodextrina dirigidas a la transferrina. Estas nanopartículas han demostrado un silenciamiento dirigido del producto del gen EWS-FLI1 en células tumorales de sarcoma de Ewing que expresan el receptor de transferrina (Hu-Lieskován y col., Res. Cáncer 2005 65: 8984-8982) y el siARN formulado en estas nanopartículas fue bien tolerado en primates no humanos (Heidel y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2007 104:5715-21). Ambas estrategias de administración incorporan enfoques racionales que utilizan tanto la administración dirigida como los mecanismos de escape endosómicos.
- La formulación de polímero puede permitir la liberación sostenida o retardada de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm (por ejemplo, después de una inyección intramuscular o subcutánea). El perfil de liberación alterado para la molécula de ácido nucleico modificado o ARNm puede resultar, por ejemplo, en la traducción de una proteína codificada durante un período prolongado de tiempo. La formulación polimérica también se puede usar para aumentar la estabilidad de la molécula de ácido nucleico modificado o ARNm. Los polímeros biodegradables se han utilizado previamente para proteger los ácidos nucleicos distintos del ARNm de la degradación y se ha demostrado que dan como resultado una liberación sostenida de cargas útiles *in vivo* (Rozema y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2007 104:12982-12887; Sullivan y col. , Expert Opin Drug Deliv. 2010 7:1433-1446; Convertine y col., Biomacromolecules. 2010 Oct 1; Chu y col., Acc Chem Res. 2012 Jan 13; Manganiello y col., Biomaterials. 2012 33:2301-2309 ; Benoit y col., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Singha y col., Nucleic Acid Ther. 2011 2:133-147; deFougerolles Hum Gene Ther. 2008 19:125-132; Schaffert y Wagner, Gene Ther. 2008 16:1131-1138; Chaturvedi y col., Expert Opin Drug Deliv. 2011 8:1455-1468; Davis, Mol Pharm. 2009 6:659-668; Davis, Nature 2010 464:1067-1070).
- En un aspecto, las composiciones farmacéuticas pueden ser formulaciones de liberación sostenida. En otro aspecto, las formulaciones de liberación sostenida pueden ser para administración subcutánea. Las formulaciones de liberación sostenida pueden incluir, entre otras, microesferas de PLGA, etileno acetato de vinilo (EVAc), poloxámero, GELSITE® (Nanotherapeutics, Inc. Alachua, FL), HYLENEX® (Halozyme Therapeutics, San Diego CA), selladores quirúrgicos tales como polímeros de fibrinógeno (Ethicon Inc. Cornelia, GA), TISSELL® (Baxter International, Inc Deerfield, IL), selladores a base de PEG y COSEAL® (Baxter International, Inc Deerfield, IL).
- Como ejemplo no limitativo, se puede formular ARNm modificado en microesferas de PLGA preparando las microesferas de PLGA con velocidades de liberación ajustables (por ejemplo, días y semanas) y encapsulando el ARNm modificado en las microesferas de PLGA mientras se mantiene la integridad del ARNm modificado durante el proceso de encapsulación. EVAc son polímeros biocompatibles no biodegradables que se utilizan ampliamente en aplicaciones preclínicas de implantes de liberación sostenida (p. ej., productos de liberación prolongada Ocusert, un inserto oftálmico de pilocarpina para el glaucoma o progestasert, un dispositivo intrauterino de progesterona de liberación sostenida; sistemas de administración transdérmica Testoderm, Duragesic y Selegiline; catéteres). Poloxamer F-407 NF es un copolímero tribloque de tensioactivo no iónico hidrófilo de polioxieteno-polioxipropilenopoloxieteno que tiene una baja viscosidad a temperaturas inferiores a 5 °C y forma un gel sólido a temperaturas superiores a 15 °C. Los selladores quirúrgicos a base de PEG comprenden dos componentes de PEG sintéticos mezclados en un dispositivo de administración que se puede preparar en un minuto, se sella en 3 minutos y se reabsorbe en 30 días. GELSITE® y los polímeros naturales son capaces de gelfificarse *in situ* en el sitio de administración. Se ha demostrado que interactúan con candidatos terapéuticos de proteínas y péptidos a través de la interacción iónica para proporcionar un efecto estabilizador.

Las formulaciones de polímeros también se pueden dirigir selectivamente a través de la expresión de diferentes ligandos, como lo ejemplifican, entre otros, folato, transferrina y N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Benoit y col., Biomacromolecules. 2011 12:2708-2714; Rozema y col. , Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2007 104:12982-12887; Davis,

Mol Pharm. 2009 6:659-668; Davis, Nature 2010 464:1067-1070).

Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm pueden formularse con o en un compuesto polimérico. El polímero puede incluir al menos un polímero tal como, entre otros, polietilenos, polietilenglicol (PEG), poli(l-lisina)(PLL),

- 5 PEG injertado en PLL, lipopolímero catiónico, lipopolímero catiónico biodegradable, polietilenimina (PEI) , poli(alquileniminas) ramificadas reticuladas, un derivado de poliamina, un poloxámero modificado, un polímero biodegradable, polímero biodegradable elástico, copolímero de bloque biodegradable, copolímero aleatorio biodegradable, copolímero de poliéster biodegradable, copolímero de bloque de poliéster biodegradable, copolímero aleatorio de bloque de poliéster biodegradable, copolímeros multibloque, copolímero biodegradable lineal, poli α -(4-aminobutil)-L-ácido glicólico (PAGA), copolímeros multibloque catiónicos reticulados biodegradables, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxíacidos, polipropilfumeratos, policaprolactonas, poliamidas, poliacetales, poliéteres, poliésteres, poli(ortoésteres), policianoacrilatos, alcoholes polivinílicos, poliuretanos, polifosfacenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, policianoacrilatos, poliureas, poliestirenos, poliaminas, polilisina, poli(etilenimina), poli(éster de serina), poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(4-hidroxi-L-prolina éster), polímeros acrílicos, polímeros que contienen amina, polímeros de dextrano, derivados de polímero de dextrano o combinaciones de los mismos.

Como ejemplo no limitativo, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden formularse con el compuesto polimérico de PEG injertado con PLL como se describe en la patente de EE. UU. N.º 6.177.274. La formulación se puede usar para transfectar células *in vitro* o para la administración *in vivo* de las moléculas de ácido

- 20 nucleico modificadas y el ARNmm. En otro ejemplo, las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm pueden suspenderse en una solución o medio con un polímero catiónico, en una composición farmacéutica seca o en una solución que puede secarse como se describe en la publicación de EE. UU. N.º 20090042829 y 20090042825.

25 Como otro ejemplo no limitativo, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden formularse con un copolímero de bloque PLGA-PEG (véase la publicación de EE. UU. n.º US 20120004293 y la patente de EE. UU. n.º 6.004.573). Como ejemplo no limitativo, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden formularse con un copolímero dibloque de PEG y PLA o PEG y PLGA (véase la Patente de EE. UU. n.º 8.246.968).

- 30 Se puede usar un derivado de poliamina para administrar moléculas de ácido nucleico y/o ARNmm o para tratar y/o prevenir una enfermedad o para incluirlo en un dispositivo implantable o inyectable (publicación de EE. UU. n.º 20100260817). Como ejemplo no limitativo, una composición farmacéutica puede incluir las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm y el derivado de poliamina descrito en la publicación de EE. UU. n.º 20100260817. Como ejemplo no limitante, los ácidos nucleicos modificados o el ARNmm pueden administrarse utilizando un polímero de poliamina tal como, entre otros, un polímero que comprende un polímero de adición dipolar 1,3 preparado mediante 35 la combinación de un monómero de diazida de carbohidrato con una unidad dilquina que comprende oligoaminas (Patente de EE. UU. N.º 8.236.280).

Las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNmm se pueden formular con al menos un polímero acrílico. Los polímeros acrílicos incluyen, entre otros, ácido acrílico, ácido metacrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido 40 metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), policianoacrilatos y combinaciones de los mismos.

- 45 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o ARNmm pueden formularse con al menos un polímero y/o sus derivados descritos en las Publicaciones Internacionales N.º WO2011115862, WO2012082574 y WO2012068187 y la Publicación de EE. UU. N.º 20120283427. En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden formularse con un polímero de fórmula Z como se describe en el documento WO2011115862. En otro aspecto más, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden formularse con un polímero de fórmula Z, Z' o Z" como se describe en las publicaciones internacionales N.º WO2012082574 o 50 WO2012068187. Los polímeros formulados con los ácidos nucleicos modificados y/o ARNm modificado pueden sintetizarse mediante los procedimientos descritos en las Publicaciones Internacionales N.º WO2012082574 o WO2012068187.

- 55 Las formulaciones de moléculas de ácido nucleico modificadas y/o ARNmm pueden incluir al menos un polímero que contiene amina tal como, entre otros, polilisina, polietilenimina, dendrímeros de poli(amidoamina) o combinaciones de los mismos.

- 60 Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNmm pueden formularse en un compuesto farmacéutico que incluye una poli(alquilenimina), un lipopolímero catiónico biodegradable, un copolímero de bloque biodegradable, un polímero biodegradable o un copolímero aleatorio biodegradable, un copolímero de bloque de poliéster biodegradable, un polímero de poliéster biodegradable, un copolímero aleatorio de poliéster biodegradable, un copolímero biodegradable lineal, PAGA, un copolímero multibloque catiónico reticulado biodegradable o combinaciones de los mismos. El lipopolímero catiónico biodegradable puede fabricarse mediante procedimientos

- conocidos en la técnica y/o descritos en la patente de EE. UU. n.º 6.696.038, solicitud de EE. UU. N.º 20030073619 y 20040142474. La poli(alquilenimina) se puede preparar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y/o como se describe en la publicación de EE. UU. n.º 20100004315. El polímero biodegradable, el copolímero en bloque biodegradable, el copolímero aleatorio biodegradable, el copolímero de bloque de poliéster biodegradable, el polímero de poliéster biodegradable o el copolímero aleatorio de poliéster biodegradable pueden fabricarse usando procedimientos conocidos en la técnica y/o como se describen en la patente de EE. UU. N.º 6.517.869 y 6.267.987. El copolímero biodegradable lineal puede fabricarse usando procedimientos conocidos en la técnica y/o como se describe en la patente de EE. UU. N.º 6.652.886. El polímero PAGA puede fabricarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica y/o como se describe en la patente de EE. UU. N.º 6.217.912. El polímero PAGA puede copolimerizarse para formar un copolímero o copolímero de bloque con polímeros tales como, entre otros, poli-L-lisina, poliarginina, poliornitina, histonas, avidina, protaminas, polilactidas y poli(lactida-co-glicólicos). Los copolímeros de bloques múltiples catiónicos reticulados biodegradables pueden fabricarse mediante procedimientos conocidos en la técnica y/o como se describe en la patente de EE. UU. N.º 8.057.821 o publicación de EE. UU. N.º 2012009145. Por ejemplo, los copolímeros multibloque pueden sintetizarse usando bloques de polietilenimina lineal (LPEI) que tienen patrones distintos en comparación con las polietileniminas ramificadas. Además, la composición o composición farmacéutica se puede preparar mediante los procedimientos conocidos en la técnica, descritos en esta invención, o como se describe en la publicación de EE. UU. N.º 20100004315 o Patente de EE. UU. N.º 6.267.987 y 6.217.912.
- Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNm pueden formularse con al menos un poliéster degradable que puede contener cadenas laterales poliacidáticas. Los poliésteres degradables incluyen, entre otros, poli(éster de serina), poli(L-lactida-co-L-lisina), poli(éster de 4-hidroxi-L-prolina) y combinaciones de los mismos. En otro aspecto, los poliésteres degradables pueden incluir una conjugación de PEG para formar un polímero PEGilado.
- Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNm se pueden formular con al menos un poliéster reticulado. Los poliésteres reticulados incluyen los conocidos en la técnica y descritos en la publicación de EE. UU. N.º 20120269761.
- En un aspecto, los polímeros descritos en esta invención pueden conjugarse con un PEG que termina en lípido. Como ejemplo no limitativo, PLGA puede conjugarse con un PEG que termina en lípidos formando PLGA-DSPE-PEG. Como otro ejemplo no limitante, los conjugados de PEG para usar con la presente descripción se describen en la Publicación Internacional N.º WO2008103276. Los polímeros se pueden conjugar usando un conjugado de ligando tal como, pero sin limitarse a, los conjugados descritos en la patente de EE. UU. N.º 8.273.363.
- En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNm descrito en esta invención pueden conjugararse con otro compuesto. Los ejemplos no limitativos de conjugados se describen en las Patentes de EE. UU. N.º 7.964.578 y 7.833.992. En otro aspecto, el ARN modificado puede conjugararse con conjugados de fórmula 1-122 como se describe en las Patentes de EE. UU. N.º 7.964.578 y 7.833.992. El ARN modificado descrito en esta invención puede conjugararse con un metal tal como, entre otros, oro. (Véase, por ejemplo, Giljohann y col. Journ. Amer. Chem. Soc. 2009 131(6): 2072-2073). En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNm descrito en esta invención pueden conjugararse y/o encapsularse en nanopartículas de oro. (Publicación internacional n.º WO201216269 y publicación de EE. UU. n.º 20120302940).
- Como se describe en la publicación de EE. UU. N.º 20100004313, una composición de administración de genes puede incluir una secuencia de nucleótidos y un poloxámero. Por ejemplo, el ácido nucleico modificado y el ARNm se pueden usar en una composición de administración de genes con el poloxámero descrito en la publicación de EE. UU. N.º 20100004313.
- En un aspecto, la formulación de polímero puede estabilizarse poniendo en contacto la formulación de polímero, que puede incluir un vehículo catiónico, con un lipopolímero catiónico que puede estar unido covalentemente a grupos de colesterol y polietilenglicol. La formulación de polímero puede ponerse en contacto con un lipopolímero catiónico utilizando los procedimientos descritos en la publicación de EE. UU. N.º 20090042829. El portador catiónico puede incluir, entre otros, polietilenimina, poli(trimetilenimina), poli(tetrametilenimina), polipropilenimina, aminoglucósido-poliamina, didesoxi-diamino-b-ciclodextrina, espermina, espermidina, poli(2-dimetilamino) metacrilato de etilo, poli(lisina), poli(histidina), poli(arginina), gelatina cationizada, dendrímeros, quitosano, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), cloruro de N-[1 -(2,3-dioleoloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de 1-[2-(oleoloxi)ethyl]-2-oleil-3-(2-hidroxietil)imidazolinio (DOTIM), 2,3 -dioleoloxi-N-[2(esperminacarboxamido)ethyl]-N,N-dimetil-1-propanamino trifluoroacetato (DOSPA), 3B-[N-(N',N'-Dimetilaminoetano)-carbamoyl]Clorhidrato de colesterol (DC-colesterol HCl) diheptadecilamidoglicil espermidina (DOGS), bromuro de N,N-diesterar-N,N-dimetilamonio (DDAB), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxyprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DMRIE), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio DODAC) y combinaciones de los mismos.
- Las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNm pueden formularse en un poliplex de uno o más polímeros (publicación de EE. UU. n.º 20120237565 y 20120270927). En un aspecto, el poliplex comprende dos o más polímeros

catiónicos. El polímero catiónico puede comprender una poli(etilenimina) (PEI) tal como PEI lineal.

Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm también se pueden formular como una nanopartícula utilizando una combinación de polímeros, lípidos y/u otros agentes biodegradables, tales como, entre otros, fosfato de calcio. Los componentes pueden combinarse en una arquitectura de núcleo-envoltura, híbrida y/o capa por capa, para permitir el ajuste fino de la nanopartícula de modo que se pueda mejorar la administración de la molécula de ácido nucleico modificada y el ARNmm (Wang y col., Nat Mater. 2006 5:791-796; Fuller y col., Biomaterials. 2008 29:1526-1532; DeKoker et al., Adv Drug Deliv Rev. 2011 63:748-761; Endres et al., Biomaterials. 2011 32:7721-7731; Su y col., Mol Pharm. 6 de junio de 2011;8(3):774-87). Como ejemplo no limitante, la nanopartícula puede comprender una

10 pluralidad de polímeros tales como, pero sin limitación, polímeros hidrofílicos-hidrofóbicos (por ejemplo, PEG-PLGA), polímeros hidrofóbicos (por ejemplo, PEG) y/o polímeros hidrofílicos (publicación internacional n.º WO20120225129).

Se ha demostrado que las nanopartículas de fosfato de calcio biodegradables en combinación con lípidos y/o polímeros liberan moléculas de ácido nucleico modificadas y ARNmm *in vivo*. En un aspecto, se puede usar una nanopartícula de fosfato de calcio recubierta de lípido, que también puede contener un ligando dirigido como anisamida, para administrar la molécula de ácido nucleico modificada y el ARNmm. Por ejemplo, para administrar siARN de manera eficaz en un modelo de pulmón metastásico de ratón, se utilizó una nanopartícula de fosfato de calcio recubierta de lípidos (Li y col., J Contr Rel. 2010 142: 416-421; Li y col., J Contr Rel. 2012 158: 108-114; Yang y col., Mol Ther. 2012 20:609-615). Este sistema de administración combina una nanopartícula dirigida y un componente para mejorar el escape endosómico, el fosfato de calcio, para mejorar la administración de siARN.

En un aspecto, el fosfato de calcio con un copolímero de bloque de polianión-PEG puede usarse para administrar moléculas de ácido nucleico modificadas y ARNmm (Kazikawa y col., J Contr Rel. 2004 97:345-356; Kazikawa y col., J Contr Rel. 2006 111:368-370).

25 En un aspecto, se puede usar un polímero de conversión de carga de PEG (Pitella y col., Biomaterials. 2011 32:3106-3114) para formar una nanopartícula para administrar las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm. El polímero de conversión de carga de PEG puede mejorar los copolímeros de bloque de polianión de PEG al dividirse en un polication a pH ácido, mejorando así el escape endosómico.

30 El uso de nanopartículas de núcleo-cubierta se ha centrado además en un enfoque de alto rendimiento para sintetizar núcleos de nanogel reticulados catiónicos y varias cubiertas (Siegwart y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2011 108:12996-13001). La formación de complejos, la administración y la internalización de las nanopartículas poliméricas se pueden controlar con precisión alterando la composición química en los componentes del núcleo y la cubierta de la nanopartícula. Por ejemplo, las nanopartículas de núcleo-cubierta pueden administrar eficientemente siARN a los hepatocitos de ratón después de unir covalentemente el colesterol a la nanopartícula.

40 En un aspecto, un núcleo lipídico hueco que comprende una capa media de PLGA y una capa lipídica neutra externa que contiene PEG se puede usar para administrar las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm. Como ejemplo no limitativo, en ratones que tenían un tumor que expresaba luciferasa, se determinó que la nanopartícula híbrida de lípido-polímero-lípido suprimía significativamente la expresión de luciferasa, en comparación con un lipoplejo convencional (Shi y col, Angew Chem Int Ed. 2011 50:7027-7031).

45 En un aspecto, las nanopartículas de lípidos pueden comprender un núcleo de las moléculas de ácido nucleico modificadas descritas en esta invención y una cubierta de polímero. La cubierta de polímero puede ser cualquiera de los polímeros descritos en esta invención y son conocidos en la técnica. En un aspecto adicional, la cubierta de polímero puede usarse para proteger los ácidos nucleicos modificados en el núcleo.

50 Se describen nanopartículas de núcleo-cubierta para usar con las moléculas de ácido nucleico modificadas de la presente descripción y pueden formarse mediante los procedimientos descritos en la patente de EE. UU. N.º 8.313.777.

55 En un aspecto, las nanopartículas de núcleo-cubierta pueden comprender un núcleo de las moléculas de ácido nucleico modificadas descritas en esta invención y una cubierta de polímero. La cubierta de polímero puede ser cualquiera de los polímeros descritos en esta invención y son conocidos en la técnica. En un aspecto adicional, la cubierta de polímero puede usarse para proteger las moléculas de ácido nucleico modificadas en el núcleo.

Péptidos y proteínas

60 Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm se pueden formular con péptidos y/o proteínas para aumentar la transfección de células mediante las moléculas de ácido nucleico modificadas o el ARNmm. En un aspecto, los péptidos tales como, entre otros, péptidos y proteínas que penetran en las células y péptidos que permiten

- la administración intracelular pueden usarse para administrar formulaciones farmacéuticas. Un ejemplo no limitativo de un péptido de penetración celular que se puede usar con las formulaciones farmacéuticas incluye una secuencia peptídica de penetración celular unida a políctonas que facilita el suministro al espacio intracelular, por ejemplo, péptido TAT derivado del VIH, penetratinas, transportadores o hCT. péptidos de penetración celular derivados (véase, 5 por ejemplo, Caron y col., Mol. Ther. 3(3):310-8 (2001); Lagel, péptidos de penetración celular: procesos y aplicaciones (CRC Press, Boca Raton FL, 2002), El-Andaloussi y col., Curr. Pharm. Des. 11(28):3597-611 (2003) y Deshayes y col., Cell. Mol. Life Sci. 62(16):1839-49 (2005). Las composiciones también se pueden formular para incluir un agente 10 de penetración celular, p. ej., liposomas, que potencian el suministro de las composiciones al espacio intracelular. Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm pueden formar complejos con péptidos y/o proteínas tales como, entre otros, péptidos y/o proteínas de Aileron Therapeutics (Cambridge, MA) y Permeon Biologics (Cambridge, MA) para permitir el suministro intracelular (Cronican y col., ACS Chem. Biol. 2010 5:747-752; McNaughton y col., Proc. nacional Acad. Sci. EE. UU. 2009 106:6111-6116; Sawyer, Chem Biol Drug Des. 2009 73:3-6; Verdine y Hilinski, Procedimientos Enzymol. 2012;503:3-33).
- 15 En un aspecto, el polipéptido de penetración celular puede comprender un primer dominio y un segundo dominio. El primer dominio puede comprender un polipéptido supercargado. El segundo dominio puede comprender un compañero de unión a proteínas. Tal como se usa en esta invención, "compañero de unión a proteínas" incluye, entre otros, anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos, proteínas de armazón o péptidos. El polipéptido de penetración celular puede comprender además un compañero de unión intracelular para el compañero de unión a proteínas. El 20 polipéptido de penetración celular puede ser capaz de ser secretado por una célula en la que se pueden introducir las moléculas de ácido nucleico modificadas o el ARNmm.
- 25 Las formulaciones de los péptidos o proteínas incluidos pueden usarse para aumentar la transfección celular por la molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm, alterar la biodistribución de la molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm (p. ej., dirigiéndose a tejidos o tipos de células específicos) y/o aumentar la traducción de la proteína codificada. (Véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO2012110636).
- Células
- 30 La molécula de ácido nucleico modificado y el ARNmm pueden transfecirse *ex vivo* en células, que posteriormente se trasplantan a un sujeto. Como ejemplos no limitativos, las composiciones farmacéuticas pueden incluir glóbulos rojos para administrar ARN modificado al hígado y células mieloídes, virosomas para administrar moléculas de ácido nucleico modificado y ARNmm en partículas similares a virus (VLP), y células electroporadas tales como, pero sin limitarse a, de MAXCYTE® (Gaithersburg, MD) y de ERYTECH® (Lyon, Francia) para administrar ARN modificado. Se han documentado ejemplos del uso de glóbulos rojos, partículas virales y células electroporadas para entregar 35 cargas útiles distintas del ARNmm (Godfrin y col., Expert Opin Biol Ther. 2012 12:127-133; Fang y col., Expert Opin Biol Ther. 2012 12:385-389, Hu y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 2011 108:10980-10985, Lund y col., Pharm Res. 2010 27:400-420, Huckriede y col., J Liposome Res. 2007 ;17:39-47; Cusi, Hum Vaccin. 2006 2:1-7; de Jonge y col., Gene Ther. 2006 13:400-411). Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm pueden administrarse en VLP sintéticas sintetizadas mediante los procedimientos descritos en la publicación internacional n.º WO2011085231 40 y la publicación de EE. UU. n.º 20110171248.
- 45 Las formulaciones basadas en células de las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm se pueden usar para garantizar la transfección celular (p. ej., en el portador celular), alterar la biodistribución de la molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm (p. ej., dirigiendo el portador celular a tejidos específicos o tipos de células), y/o aumentar la traducción de la proteína codificada.
- Introducción a las células
- 50 En la técnica se conocen una variedad de procedimientos y son adecuados para la introducción de ácido nucleico en una célula, incluidas técnicas mediadas por virus y no virus. Los ejemplos de técnicas típicas no virales incluyen, entre otros, electroporación, transferencia mediada por fosfato de calcio, nucleofección, sonoporación, choque térmico, magnetofección, transferencia mediada por liposomas, microinyección, transferencia mediada por microproyectiles (nanopartículas), transferencia mediada por polímeros catiónicos (DEAE-dextrano, polietilenimina, polietilenglicol (PEG) y similares) o fusión celular.
- 55 La técnica de sonoporación, o sonicación celular, es el uso de sonido (por ejemplo, frecuencias ultrasónicas) para modificar la permeabilidad de la membrana plasmática celular. Los procedimientos de sonoporación son conocidos por los expertos en la técnica y se enseñan, por ejemplo, en relación con las bacterias en la publicación de patente de EE. UU. 20100196983 y en relación con otros tipos de células, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 60 20100009424.

Las técnicas de electroporación también son bien conocidas en la técnica. En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden administrarse mediante electroporación como se describe en el Ejemplo 8.

Hialuronidasa

La inyección localizada intramuscular o subcutánea de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm puede incluir hialuronidasa, que cataliza la hidrólisis de hialuronano. Al catalizar la hidrólisis del hialuronano, un constituyente de la barrera intersticial, la hialuronidasa reduce la viscosidad del hialuronano, aumentando así la permeabilidad del tejido (Frost, Expert Opin. Drug Deliv. (2007) 4:427-440). Es útil para acelerar su dispersión y distribución sistémica de proteínas codificadas producidas por células transfectadas. Alternativamente, la hialuronidasa se puede usar para aumentar el número de células expuestas a una molécula de ácido nucleico modificado o ARNm administrado por vía intramuscular o subcutánea.

Simulaciones de nanopartículas

Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNm pueden encapsularse y/o absorberse en un simulador de nanopartículas. Un simulador de nanopartículas puede imitar la función de suministro de organismos o partículas tales como, entre otros, patógenos, virus, bacterias, hongos, parásitos, priones y células. Como ejemplo no limitativo, el ARNm modificado puede encapsularse en una partícula que no sea de hierro que puede imitar la función de administración de un virus (véase la publicación internacional n.º WO2012006376).

Nanotubos

Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm se pueden unir o enlazar de otro modo al menos a un nanotubo tal como, entre otros, nanotubos de roseta, nanotubos de roseta que tienen bases gemelas con un conector, nanotubos de carbono y/o nanotubos de carbono de pared simple. Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm pueden unirse a los nanotubos a través de fuerzas tales como, pero sin limitarse a, fuerzas estéricas, iónicas, covalentes y/u otras.

En un aspecto, el nanotubo puede liberar una o más moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm en las células. El tamaño y/o la estructura de la superficie de al menos un nanotubo puede alterarse para controlar la interacción de los nanotubos dentro del cuerpo y/o unirse o enlazarse a la molécula de ácido nucleico modificado o ARNm descrito en esta invención. En un aspecto, el bloque de construcción y/o los grupos funcionales unidos al bloque de construcción del al menos un nanotubo pueden modificarse para ajustar las dimensiones y/o propiedades del nanotubo. Como ejemplo no limitante, la longitud de los nanotubos puede alterarse para impedir que los nanotubos pasen a través de los orificios en las paredes de los vasos sanguíneos normales pero todavía lo suficientemente pequeños para atravesar los orificios más grandes en los vasos sanguíneos del tejido tumoral.

En un aspecto, al menos un nanotubo también se puede recubrir con compuestos que mejoran la administración, incluidos polímeros, tales como, entre otros, polietilenglicol. En otro aspecto, al menos un nanotubo y/o el ARNm modificado pueden mezclarse con excipientes y/o vehículos de administración farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, el ARNm modificado se une y/o se enlaza de otro modo al menos a un nanotubo de roseta. Los nanotubos de roseta pueden formarse mediante un proceso conocido en la técnica y/o mediante el proceso descrito en la Publicación Internacional N.º WO2012094304. Al menos un ARNm modificado puede unirse y/o enlazarse de otro modo al menos a un nanotubo de roseta mediante un proceso como se describe en la Publicación Internacional N.º WO2012094304 donde los nanotubos de roseta o módulos que forman nanotubos de roseta se mezclan en medios acuosos con al menos un ARNm modificado bajo condiciones que pueden hacer que al menos un ARNm modificado se una o se enlace de otro modo a los nanotubos de roseta.

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico modificada o ARNm puede unirse y/o enlazarse de otro modo al menos a un nanotubo de carbono. Como ejemplo no limitativo, la molécula de ácido nucleico modificada o ARNm puede unirse a un agente de enlace y el agente enlazado puede unirse al nanotubo de carbono (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.246.995). El nanotubo de carbono puede ser un nanotubo de pared simple (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.246.995).

Conjugados

Las moléculas de ácidos nucleicos modificados y el ARNm incluyen conjugados, tales como una molécula de ácido nucleico modificado o ARNm unido covalentemente a un portador o grupo diana, o que incluyen dos regiones codificantes que juntas producen una proteína de fusión (p. ej., que lleva un grupo diana y una proteína terapéutica o péptido).

Los conjugados incluyen una sustancia natural, tal como una proteína (p. ej., albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) o globulina); un carbohidrato (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula sintética o recombinante tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido sintético, un oligonucleótido (por ejemplo, un aptámero). Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen poliaminoácido es una polilisina (PLL), ácido poli L-aspartico, ácido poli L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Los ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímera, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o una hélice alfa péptido.

Las patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de conjugados de polinucleótidos, en particular de ARN, incluyen, entre otras, las patentes de EE. UU. n.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941; 6.294.664; 6.320.017; 6.576.752; 6.783.931; 6.900.297; 7.037.646.

En un aspecto, el conjugado puede funcionar como un portador para las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNm. El conjugado puede comprender un polímero catiónico tal como, entre otros, poliamina, polilisina, polialquilenimina y polietilenimina que pueden injertarse con poli(etilenenglicol). Como ejemplo no limitante, el conjugado puede ser similar al conjugado polimérico y el procedimiento de sintetizar el conjugado polimérico descrito en la patente de EE. UU. N.º 6.586.524.

Los conjugados también pueden incluir grupos dirigidos, por ejemplo, un agente dirigido a células o tejidos, por ejemplo, una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específico, tal como una célula renal. Un grupo diana puede ser una tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína surfactante A, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetyl-galactosamina, N-acetyl-gulucosamina manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, un péptido RGD, un mimético de péptido RGD o un aptámero.

Los grupos diana pueden ser proteínas, por ejemplo, glicoproteínas, o péptidos, por ejemplo, moléculas que tienen una afinidad específica por un co-ligando, o anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específico, tal como una célula cancerosa, una célula endotelial o célula ósea. Los grupos diana también pueden incluir hormonas y receptores de hormonas. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetyl-galactosamina, N-acetyl-gulucosamina manosa multivalente, fucosa multivalente o aptámeros. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido o un activador de p38 MAP quinasa.

El grupo diana puede ser cualquier ligando que sea capaz de dirigirse a un receptor específico. Los ejemplos incluyen, sin limitación, folato, GalNAc, galactosa, manosa, manosa-6P, aptámeros, ligandos de receptores de integrina, ligandos de receptores de quimiocinas, transferrina, biotina, ligandos de receptores de serotonina, PSMA, endotelina, GCP II, somatostatina, LDL y ligandos de HDL. En un aspecto particular, el grupo diana es un aptámero. El aptámero puede no estar modificado o tener cualquier combinación de modificaciones descritas en esta invención.

En un aspecto, las composiciones farmacéuticas pueden incluir modificaciones químicas tales como, pero sin limitación, modificaciones similares a los ácidos nucleicos bloqueados.

Las patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de ácido nucleico bloqueado (LNA) tal como los de Santaris incluyen, entre otras, las siguientes: patente de EE. UU. n.º 6.268.490; 6.670.461; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.084.125; y 7.399.845.

Las patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, entre otras, las patentes de EE. UU. n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Se pueden encontrar enseñanzas adicionales de los compuestos de PNA, por ejemplo, en Nielsen y col., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Algunos aspectos presentados en la descripción incluyen ácidos nucleicos modificados o ARNm con estructuras de fosforotioato y oligonucleósidos con otras estructuras modificadas, y en particular --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--

O--CH₂--[conocido como metileno (metilimino) o estructura principal MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- and --N(CH₃)--CH₂--CH₂--N(CH₃)--O- -CH₂--[conocido como metileno (metilimino) o columna vertebral MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --N(CH₃)--CH₂--CH₂--[donde la estructura principal de fosfodiéster nativo se representa como --O-P(O)₂--O--CH₂--] de la patente de EE. UU. mencionada anteriormente N.º 5.489.677, y las estructuras principales de amida de la patente de EE. UU. mencionada anteriormente N.º 5.602.240.

5 En algunos aspectos, los polinucleótidos presentados en esta invención tienen estructuras principales de morfolino de la patente de EE. UU. Mencionada anteriormente N.º 5.034.506.

10 Las modificaciones en la posición 2' también pueden ayudar en la administración. Preferiblemente, las modificaciones en la posición 2' no están ubicadas en una secuencia codificante de polipéptido, es decir, no en una región traducible. Las modificaciones en la posición 2' pueden ubicarse en una UTR 5', una UTR 3' y/o una región de cola. Las modificaciones en la posición 2' pueden incluir una de las siguientes en la posición 2': H (es decir, 2'-desoxi); F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; u O-alquil-O-alquilo, en el que el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ sustituido o no sustituido o alquenilo C₂ a C₁₀ y alquinilo. Ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. En otros aspectos, los ácidos nucleicos modificados o ARNm incluyen uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunos aspectos, la modificación incluye un 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., Helv. Chim. Acta , 1995, 78:486-504), es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Otra modificación ilustrativa es 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos siguientes en esta invención, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂--O--CH₂--N(CH₃)₂, también descrito en los ejemplos de esta invención a continuación. Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones, en particular la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en ARNs enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los polinucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como fracciones de ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Las patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, entre otras, las patentes de EE. UU. n.º 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

35 En otros aspectos más, la molécula de ácido nucleico modificada o ARNm se conjuga covalentemente con un polipéptido que penetra en las células. El péptido de penetración celular también puede incluir una secuencia de señal. Los conjugados pueden diseñarse para que tengan una mayor estabilidad; aumento de la transfección celular; y/o la biodistribución alterada (p. ej., dirigida a tejidos o tipos de células específicos).

40 Nanopartículas autoensambladas

Nanopartículas autoensambladas de ácido nucleico

45 Las nanopartículas autoensambladas tienen un tamaño bien definido que se puede controlar con precisión ya que las cadenas de ácido nucleico se pueden reprogramar fácilmente. Por ejemplo, el tamaño de partícula óptimo para un portador de nanoadministración dirigido al cáncer es de 20 a 100 nm, ya que un diámetro superior a 20 nm evita la eliminación renal y mejora la administración a ciertos tumores a través de una permeabilidad mejorada y un efecto de retención. Usando nanopartículas de ácido nucleico autoensambladas, una sola población uniforme en tamaño y forma que tiene una orientación espacial controlada con precisión y densidad de ligandos dirigidos contra el cáncer para una mejor administración. Como ejemplo no limitativo, se prepararon nanopartículas de oligonucleótidos mediante el autoensamblaje programable de fragmentos cortos de ADN y siARN terapéuticos. Estas nanopartículas son molecularmente idénticas con tamaño de partícula controlable y ubicación y densidad del ligando diana. Los fragmentos de ADN y los A se autoensamblaron en una reacción de una sola etapa para generar nanopartículas tetraédricas de ADN/siARN para la administración *in vivo* dirigida. (Lee y col., Nature Nanotechnology 2012 7:389-393).

60 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNm descritos en esta invención pueden formularse como nanopartículas autoensambladas. Como ejemplo no limitativo, los ácidos nucleicos se pueden usar para fabricar nanopartículas que se pueden usar en un sistema de administración para las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o ARNm (véase, por ejemplo, publicación internacional n.º WO2012125987).

En un aspecto, las nanopartículas autoensambladas de ácido nucleico pueden comprender un núcleo de las moléculas

de ácido nucleico modificado o ARNmm descrito en esta invención y una cubierta de polímero. La cubierta de polímero puede ser cualquiera de los polímeros descritos en esta invención y son conocidos en la técnica. En un aspecto adicional, la cubierta de polímero se puede usar para proteger las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm en el núcleo.

- 5 Nanopartículas autoensambladas basadas en polímeros
- Los polímeros se pueden usar para formar láminas que se autoensamblan en nanopartículas. Estas nanopartículas se pueden usar para administrar los ácidos nucleicos modificados y el ARNmm. En un aspecto, estas nanopartículas autoensambladas pueden ser microesponjas formadas por polímeros largos de horquillas de ARN que se forman en láminas "plisadas" cristalinas antes de autoensamblarse en microesponjas. Estas microesponjas son micropartículas similares a esponjas densamente empaquetadas que pueden funcionar como un portador eficiente y pueden ser capaces de entregar carga a una célula. Las microesponjas pueden tener un diámetro de 1 um a 300 nm. Las microesponjas pueden formar complejos con otros agentes conocidos en la técnica para formar microesponjas más grandes. Como ejemplo no limitante, la microesponja se puede complejar con un agente para formar una capa externa para promover la captación celular tal como policación polietilenima (PEI). Este complejo puede formar una partícula de 250 nm de diámetro que puede permanecer estable a altas temperaturas (150 °C) (Grabow y Jaeger, *Nature Materials* 2012, 11:269-269). Además, estas microesponjas pueden exhibir un extraordinario grado de protección contra la degradación por ribonucleasas.

- 10
- 15
- 20
- En otro aspecto, las nanopartículas autoensambladas basadas en polímeros tales como, pero sin limitarse a, microesponjas, pueden ser nanopartículas completamente programables. La geometría, el tamaño y la estequiometría de la nanopartícula pueden controlarse con precisión para crear la nanopartícula óptima para la administración de carga tal como, entre otras, moléculas de ácido nucleico modificadas y ARNmm.
- 25
- 30
- En un aspecto, las nanopartículas basadas en polímeros pueden comprender un núcleo de las moléculas de ácido nucleico modificadas y ARNmm descritos en este documento y una cubierta de polímero. La cubierta de polímero puede ser cualquiera de los polímeros descritos en este documento y son conocidos en la técnica. En un aspecto adicional, la cubierta de polímero se puede usar para proteger las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm en el núcleo.

Nanopartículas inorgánicas

- 35
- Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden formularse en nanopartículas inorgánicas (patente de EE. UU. n.º 8.257.745). Las nanopartículas inorgánicas pueden incluir, entre otras, sustancias arcillosas que se hinchan con agua. Como un ejemplo no limitante, la nanopartícula inorgánica puede incluir arcillas de esmectita sintéticas que se fabrican a partir de silicatos simples (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.585.108 y 8.257.745).
- 40
- En un aspecto, las nanopartículas inorgánicas pueden comprender un núcleo de los ácidos nucleicos modificados descritos en este documento y una cubierta de polímero. La cubierta de polímero puede ser cualquiera de los polímeros descritos en este documento y son conocidos en la técnica. En un aspecto adicional, la cubierta de polímero puede usarse para proteger los ácidos nucleicos modificados en el núcleo.

Nanopartículas semi-conductoras y metálicas

- 45
- 50
- Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden formularse en nanopartículas dispersables en agua que comprenden un material semiconductor o metálico (publicación de EE. UU. n.º 20120228565) o formadas en una nanopartícula magnética (publicación de EE. UU. n.º 20120265001 y 20120283503). Las nanopartículas dispersables en agua pueden ser nanopartículas hidrófobas o nanopartículas hidrófilas.

- 55
- En un aspecto, las nanopartículas semiconductoras y/o metálicas pueden comprender un núcleo de los ácidos nucleicos modificados descritos en este documento y una cubierta de polímero. La cubierta de polímero puede ser cualquiera de los polímeros descritos en este documento y son conocidos en la técnica. En un aspecto adicional, la cubierta de polímero puede usarse para proteger los ácidos nucleicos modificados en el núcleo.

Geles e hidrogeles

- 60
- En un aspecto, el ARNm modificado descrito en este documento puede encapsularse en cualquier hidrogel conocido en la técnica que puede formar un gel cuando se inyecta en un sujeto. Los hidrogeles son una red de cadenas poliméricas que son hidrófilas y, a veces, se encuentran como un gel coloidal en el que el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son polímeros naturales o sintéticos altamente absorbentes (pueden contener más del 99

% de agua). Los hidrogeles también poseen un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su importante contenido de agua. El hidrogel descrito en este documento puede usarse para encapsular nanopartículas lipídicas que son biocompatibles, biodegradables y/o porosas.

5 Como ejemplo no limitativo, el hidrogel puede ser un hidrogel funcionalizado con aptámero. El hidrogel funcionalizado con aptámero puede programarse para liberar una o más moléculas de ácido nucleico modificadas y/o ARNm usando hibridación de ácidos nucleicos. (Battig y col., J. Am. Chem. Society. 2012 134:12410-12413).

10 Como otro ejemplo no limitante, el hidrogel puede tener la forma de un ópalo invertido. Los hidrogeles de ópalo exhiben relaciones de hinchamiento más altas y la cinética de hinchamiento también es un orden de magnitud más rápida. Los procedimientos para producir hidrogeles de ópalo y la descripción de los hidrogeles de ópalo se describen en la publicación internacional n.º WO2012148684.

15 En otro ejemplo no limitativo, el hidrogel puede ser un hidrogel antibacteriano. El hidrogel antibacteriano puede comprender una sal farmacéuticamente aceptable o un material orgánico tal como, entre otros, sal de plata de grado farmacéutico y/o grado médico y gel o extracto de aloe vera. (Publicación internacional n.º WO2012151438).

20 En un aspecto, el ARNm modificado se puede encapsular en una nanopartícula lipídica y, a continuación, la nanopartícula lipídica se puede encapsular en un hidrogel.

25 En un aspecto, el ARNm modificado descrito en este documento puede encapsularse en cualquier gel conocido en la técnica. Como ejemplo no limitativo, el gel puede ser un gel inyectable de fluorouracilo o un gel inyectable de fluorouracilo que contiene un compuesto químico y/o un fármaco conocido en la técnica. Como otro ejemplo, el ARNm modificado puede encapsularse en un gel de fluorouracilo que contiene epinefrina (véase, por ejemplo, Smith y col. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1999 44(4):267-274).

30 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificado y/o el ARNm descrito en este documento pueden encapsularse en un gel de fibrina, hidrogel de fibrina o pegamento de fibrina. En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNm pueden formularse en una nanopartícula lipídica o una nanopartícula lipídica eliminada rápidamente antes de encapsularse en un gel de fibrina, hidrogel de fibrina o un pegamento de fibrina. En otro aspecto más, las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNm pueden formularse como un lipoplex antes de encapsularse en un gel de fibrina, hidrogel o pegamento de fibrina. Los geles, hidrogeles y pegamentos de fibrina comprenden dos componentes, una solución de fibrinógeno y una solución de trombina que es rica en calcio (véase, por ejemplo, Spicer y Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55; Kidd y col. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85). La concentración de los componentes del gel, hidrogel y/o pegamento de fibrina puede modificarse para cambiar las características, el tamaño de malla de la red y/o las características de degradación del gel, hidrogel y/o pegamento tales como, entre otros, cambiando las características de liberación del gel, hidrogel y/o pegamento de fibrina. (Véase, por ejemplo, Spicer y Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55; Kidd y col. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas y col. Tissue Engineering 2008. 14:119-128) . Esta característica puede ser ventajosa cuando se usa para administrar el ARNm modificado descrito en este documento. (Véase, por ejemplo, Kidd y col. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas y col. Tissue Engineering 2008. 14:119-128).

Cationes y aniones

45 Las formulaciones de moléculas de ácido nucleico modificadas descritas en este documento pueden incluir cationes o aniones. En un aspecto, las formulaciones incluyen cationes metálicos tales como, entre otros, Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺ y combinaciones de los mismos. Como ejemplo no limitativo, las formulaciones pueden incluir polímeros y un ARNm modificado complejado con un catión metálico (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.265.389 y 6.555.525).

Nanopartículas y micropartículas moldeadas

55 Las moléculas de ácido nucleico modificado y/o ARNm descritos en este documento pueden formularse en nanopartículas y/o micropartículas. Estas nanopartículas y/o micropartículas se pueden moldear en cualquier tamaño, forma y química. Como ejemplo, las nanopartículas y/o micropartículas pueden fabricarse utilizando la tecnología PRINT® de LIQUIDA TECHNOLOGIES® (Morrisville, NC) (Véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO2007024323).

60 En un aspecto, las nanopartículas moldeadas pueden comprender un núcleo de las moléculas de ácido nucleico modificado y/o el ARNm descrito en este documento y una cubierta de polímero. La cubierta de polímero puede ser cualquiera de los polímeros descritos en este documento y son conocidos en la técnica. En un aspecto adicional, la

cubierta de polímero se puede usar para proteger las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o el ARNm descritos en este documento.

Nanofundas y nanoliposomas

5 Las moléculas de ácido nucleico modificadas y/o ARNm descritos en este documento pueden formularse en nanofundas (Nano)Jackets y nanoLiposomas por Keystone Nano (State College, PA). Las nanofundas están hechas de compuestos que se encuentran naturalmente en el cuerpo, incluidos calcio, fosfato y también pueden incluir una pequeña cantidad de silicatos. Las nanofundas pueden variar en tamaño de 5 a 50 nm y pueden usarse para administrar compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos tales como, entre otros, moléculas de ácido nucleico modificadas y/o ARNm.

10 15 Los nanoliposomas están hechos de lípidos tales como, entre otros, los lípidos que se encuentran naturalmente en el cuerpo. Los nanoliposomas pueden variar en tamaño de 60 a 80 nm y pueden usarse para administrar compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos tales como, entre otros, moléculas de ácido nucleico modificadas y/o ARNm. En un aspecto, los ácidos nucleicos modificados descritos en este documento se formulan en un nanoliposoma tal como, entre otros, nanoliposomas de ceramida.

Excipientes

20 25 30 Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, que, tal como se usa en esta invención, incluye, pero no se limita a, todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Se conocen en la técnica varios excipientes para formular composiciones farmacéuticas y técnicas para preparar la composición (véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^a edición, A. R. Gennaro Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006. El uso de un medio excipiente convencional puede contemplarse dentro del alcance de la presente descripción, excepto en la medida en que cualquier medio de excipiente convencional pueda ser incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como al producir cualquier efecto biológico no deseado o interactuar de otra manera de manera perjudicial con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica.

35 40 En algunos aspectos, un excipiente farmacéuticamente aceptable es al menos en un 95 %, al menos en un 96 %, al menos en un 97 %, al menos en un 98 %, al menos en un 99 % o el 100 % puro. En algunos aspectos, un excipiente puede estar aprobado para su uso para humanos y para uso veterinario. En algunos aspectos, un excipiente está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos. En algunos aspectos, un excipiente puede ser de grado farmacéutico. En algunos aspectos, un excipiente puede cumplir con los estándares de la farmacopea de Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional.

45 Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes de dispersión y/o granulación, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes de tampón, agentes lubricantes y/o aceites. Tales excipientes pueden incluirse opcionalmente en formulaciones farmacéuticas. La composición puede incluir también excipientes tales como manteca de cacao y ceras de suppositorio, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes y/o agentes perfumantes.

50 Los diluyentes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, carbonato de sodio, fosfato de calcio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, fosfato de hidrógeno de calcio, fosfato de sodio lactosa, sacarosa, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, sorbitol, inositol, cloruro de sodio, almidón seco, almidón de maíz, azúcar en polvo, etc., y/o combinaciones de estos.

55 60 Los ejemplos de agentes de granulación y/o dispersión incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato de almidón de sodio, arcillas, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio, poli(vinil-pirrolidona) reticulado (crospovidona), almidón de carboximetilo de sodio (glicolato de almidón de sodio), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio reticulado (croscarmelosa), metilcelulosa, almidón pregelificado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio, silicato de aluminio y magnesio (VEEGUM®), lauril sulfato de sodio, compuestos de amonio cuaternario, etc., y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes tensioactivos y/o emulsionantes incluyen, de modo no taxativo, emulsionantes naturales (por

- ejemplo, acacia, agar, ácido algínico, alginato de sodio, tragacanto, condruX, colesterol, xantano, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, grasa de lana, colesterol, cera y lecitina), arcillas coloidales (por ejemplo, bentonita [silicato de aluminio] y VEEGUM® [silicato de aluminio y magnesio]), derivados de aminoácidos de cadena larga, alcoholes de alto peso molecular (por ejemplo, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol oleílico, monoestearato de triacetina, 5 distearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo y monoestearato de propilenglicol, alcohol polivinílico), carbómeros (por ejemplo, carboxi polimetileno, ácido poliacrílico, polímero de ácido acrílico y polímero de carboxivinílico), carragenano, derivados celulósicos (por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmethylcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monolaurato de sorbitán de polioxetileno [TWEEN®20], sorbitán de polioxetileno [TWEEN®60], 10 monooleato de sorbitán de polioxetileno [TWEEN®80], monopalmitato de sorbitán [SPAN®40], monoestearato de sorbitán [SPAN®60], tristearato de sorbitán [SPAN®65], monooleato de glicerilo, monooleato de sorbitán [SPAN®80]), ésteres de polioxetileno (por ejemplo, monoestearato de polioxetileno [MYRJ®45], aceite de castor hidrogenado de polioxetileno, aceite de castor polietoxilado, estearato de polioximetileno, y SOLUTOL®), ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (por ejemplo, CREMOPHOR®), éteres de polioxetileno, (por 15 ejemplo, lauril éter de polioxetileno [BRIJ®30]), poli(vinil-pirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, lauril sulfato de sodio, PLUORINC®F 68, POLOXAMER®188, bromuro de cetrimio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato de sodio, etc. y/o combinaciones de los mismos.
- 20 Los ejemplos de agentes aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, almidón (por ejemplo, almidón de maíz y pasta de almidón); gelatina; azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa, dextrina, melaza, lactosa, lactitol, manitol); gomas naturales y sintéticas (por ejemplo, acacia, alginato de sodio, extracto de musgo irlandés, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, poli(vinil-pirrolidona), 25 silicato de magnesio y aluminio (VEEGUM®) y arabogalactán); alginatos; óxido de polietileno; polietilenglicol; sales de calcio inorgánico; ácido silícico; polimetilacrilatos; ceras; agua; alcohol; etc.; y combinaciones de los mismos.
- Los ejemplos de conservantes pueden incluir, pero no se limitan a, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes de alcohol, conservantes ácidos y/u otros conservantes. 30 Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de acorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y/o sulfito de sodio. Los ejemplos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidratado, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato de sodio, ácido tartárico y/o edetato trisódico. Los ejemplos de conservantes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imidurea, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletilo, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y/o timerosal. Los ejemplos de conservantes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a, parabeno de butilo, parabeno de metilo, parabeno de etilo, parabeno de propilo, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, 40 benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y/o ácido sóblico. Los ejemplos de conservantes de alcohol incluyen, pero no se limitan a, etanol, polietilenglicol, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o alcohol feniletilo. Los ejemplos de conservantes ácidos incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, betacaroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroacético, ácido ascórbico, ácido sóblico y/o ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero no se limitan a, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato 45 de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitoluenado butilado (BHT), etilendiamina, lauril sulfato de sodio (SLS), lauril éter sulfato de sodio (SLES), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio, metabisulfito de potasio, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, metilparabeno, GERMALL®115, GERMABEN ®II, NEOLONE™, KATHON™, y/o EUXYL®.
- 50 Los ejemplos de agentes de tampón incluyen, pero no se limitan a, soluciones de tampón de citrato, soluciones de tampón de acetato, soluciones de tampón de fosfato, cloruro de amonio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, glubionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, ácido d-glucónico, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, fosfato de hidróxido de calcio, acetato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, mezclas de potasio, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, mezclas de fosfato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, mezclas de fosfato de sodio, trometamina, hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido algínico, agua libre de pirógenos, salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico, etc. y/o combinaciones de los mismos.
- 60 Los ejemplos de agentes lubricantes incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, sílice, talco, malta, behanato de glicerilo, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, lauril sulfato de magnesio, lauril sulfato de sodio, etc., y combinaciones de estos.

Los ejemplos de aceites incluyen, pero no se limitan a, almendra, almendra de albaricoque, aguacate, babasú, bergamota, semilla de corriente negra, borraja, cade, manzanilla, colza, alcaravea, carnauba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semilla de algodón, emú, eucalipto, onagra, pescado, semilla de linaza, geraniol, calabaza, semilla de uva, avellana, hisopo, miristato de isopropilo, jojoba, nuez de kukui, lavanda, limón, litsea cubeba, nuez de macadamia, malva, semilla de mango, semilla de espuma de prado, visón, nuez moscada, oliva, naranja, reloj anaranjado, palma, semilla de palma, nuez de melocotón, cacahuete, semilla de amapola, semilla de calabaza, arroz, salvado, romero, cártamo, sándalo, sabana, espino amarillo, sésamo, manteca de karité, silicona, soja, girasol, árbol de té, cardo, tsubaki, vetiver, nuez y aceites de germen de trigo. Los ejemplos de aceites incluyen, pero no se limitan a, estearato de butilo, triglicérido caprílico, triglicérido cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, miristato de isopropilo, aceite mineral, octildodecanol, alcohol oleílico, aceite de silicona y/o combinaciones de los mismos.

Excipientes tales como manteca de cacao y ceras de suppositorio, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y/o agentes perfumantes pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

Administración

La presente descripción abarca la administración de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm para fines terapéuticos, farmacéuticos, de diagnóstico o de formación de imágenes por cualquier vía adecuada, teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias de la administración de fármacos. La administración puede ser desnuda o formulada.

Administración desnuda

Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden administrarse a una célula desnuda. Como se usa en este documento, "desnudo" se refiere a la administración de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm libre de agentes que promuevan la transfección. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico modificadas o el ARNmm administrado a la célula pueden no contener modificaciones. Las moléculas de ácido nucleico modificadas desnudas o ARNmm pueden administrarse a la célula utilizando vías de administración conocidas en la técnica y descritas en este documento.

Administración formulada

Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden formularse utilizando los procedimientos descritos en este documento. Las formulaciones pueden contener moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm que pueden estar modificadas y/o no modificadas. Las formulaciones pueden incluir además, pero no se limitan a, agentes de penetración celular, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un agente de administración, un polímero bioerosionable o biocompatible, un solvente y un depósito de administración de liberación sostenida. Las moléculas de ácido nucleico modificadas formuladas o ARNmm pueden administrarse a la célula utilizando vías de administración conocidas en la técnica y descritas en este documento.

Las composiciones también se pueden formular para la administración directa a un órgano o tejido en cualquiera de varias formas en la técnica que incluyen, entre otros, remojo o baño directo, a través de un catéter, mediante geles, polvos, ungüentos, cremas, geles, lociones y/o gotas, mediante el uso de sustratos tales como telas o materiales biodegradables recubiertos o impregnados con las composiciones, y similares.

Administración

Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm pueden administrarse por cualquier vía que resulte en un resultado terapéuticamente eficaz. Estos incluyen, entre otros, enteral, gastroenteral, epidural, oral, transdérmico, epidural (peridural), intracerebral (en el cerebro), intracerebroventricular (en los ventrículos cerebrales), epikutáneo (aplicación sobre la piel), intradérmico, (en la propia piel), subcutánea (debajo de la piel), administración nasal (a través de la nariz), intravenosa (en una vena), intraarterial (en una arteria), intramuscular (en un músculo), intracardíaca (en el corazón), infusión intraósea (en la médula ósea), intratecal (en el canal espinal), intraperitoneal, (infusión o inyección en el peritoneo), infusión intravesical, intravítreo, (a través del ojo), inyección intracavernosa, (en la base del pene), administración intravaginal, intrauterina, administración extra-amniótica, transdérmica (difusión a través de la piel intacta para distribución sistémica), transmucosa (difusión a través de una membrana mucosa), insuflación (resoplado), sublingual, sublabial, enema, gotas para los ojos (sobre la conjuntiva), o en gotas para los oídos. En aspectos específicos, las composiciones se pueden administrar de una manera que les permita atravesar la barrera hematoencefálica, la barrera vascular u otra barrera epitelial. Las rutas de administración no limitantes para los ácidos

nucleicos modificados o ARNmm se describen a continuación.

Administración parenteral e inyectable

- 5 Las formas de dosificación líquidas para administración oral y parenteral incluyen, de modo no taxativo, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los ingredientes activos, las formas de dosificación líquidas pueden comprender diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, saborizantes y/o agentes perfumantes. En determinados aspectos para la administración parenteral, las composiciones se mezclan con agentes solubilizantes tales como CREMOPHOR®, alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbitatos, ciclodextrinas, polímeros y/o combinaciones de estos.

- 20 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles pueden ser soluciones, suspensiones y/o emulsiones inyectables estériles en diluyentes y/o solventes parenterales aceptables no tóxicos, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse están agua y solución de Ringer, U.S.P., y solución de cloruro de sodio isotónico. Además, pueden emplearse convencionalmente aceites estériles fijos como solvente o medio de suspensión. Con este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Pueden usarse ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

- 30 Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana y/o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

- 35 Para prolongar el efecto de un ingrediente activo, con frecuencia es conveniente disminuir la absorción del ingrediente activo a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfio con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco entonces depende de su velocidad de disolución la cual, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrado por vía parenteral se lleva a cabo al disolver o suspender el fármaco en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se hacen formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicolído. Dependiendo de la relación del fármaco con respecto al polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, se 40 puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(orthoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con el tejido corporal.

Administración rectal y vaginal

- 45 Las composiciones para administración rectal o vaginal son típicamente supositorios que se pueden preparar mezclando composiciones con excipientes no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de suppositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el ingrediente activo.

50 Administración oral

- 55 Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los ingredientes activos, las formas de dosificación líquidas pueden comprender diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán , y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y/o perfumantes. En ciertos aspectos para la administración parenteral, las composiciones se mezclan con agentes solubilizantes tales como CREMOPHOR®, alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbitatos,

cyclodextrinas, polímeros y/o combinaciones de los mismos.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, un ingrediente activo se mezcla con al menos un excipiente inerte

5 farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o rellenos o extensores (*por ejemplo*, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico), aglutinantes (*por ejemplo*, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y acacia), humectantes (*por ejemplo*, glicerol), agentes desintegrantes (*por ejemplo*, agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio), agentes retardantes de solución (*por ejemplo*, parafina), aceleradores de absorción (*por ejemplo*, compuestos de amonio cuaternario), agentes humectantes (*por ejemplo*, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol), absorbentes (*por ejemplo*, kaolin y arcilla de bentonita), y lubricantes (*por ejemplo*, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicol sólido, sulfato de laurilo de sodio) y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender agentes de tampón.

10 15 Administración tópica o transdérmica

Como se describe en este documento, las composiciones que contienen las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm pueden formularse para administración tópica. La piel puede ser un sitio diana ideal para la administración, ya que es de fácil acceso. La expresión génica puede estar restringida no solo a la piel, evitando potencialmente la toxicidad inespecífica, sino también a capas y tipos de células específicos dentro de la piel.

20 25 El sitio de expresión cutánea de las composiciones administradas dependerá de la vía de administración del ácido nucleico. Generalmente se consideran tres vías para administrar moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm a la piel: (i) aplicación tópica (p. ej., para tratamiento local/regional); (ii) inyección intradérmica (*por ejemplo*, para tratamiento local/regional); y (iii) administración sistémica (p. ej., para el tratamiento de enfermedades dermatológicas que afectan tanto a la región cutánea como a la extracutánea). Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm pueden administrarse en la piel mediante varios enfoques diferentes conocidos en la técnica. Se ha demostrado que la mayoría de los enfoques de administración tópica funcionan para la administración de ADN, tales como, entre otros, la aplicación tópica de complejo de liposoma-ADN no catiónico, complejo de liposoma-ADN catiónico, mediado por 30 partículas (biolística), transfecciones de gen mediadas por punción y enfoques de administración viral. Después de la administración del ácido nucleico, se han detectado productos génicos en varios tipos diferentes de células de la piel, incluidos, entre otros, queratinocitos basales, células de glándulas sebáceas, fibroblastos dérmicos y macrófagos dérmicos.

35 40 En un aspecto, la descripción proporciona una variedad de apósitos (p. ej., apósitos para heridas) o vendajes (p. ej., vendajes adhesivos) para llevar a cabo de manera conveniente y/o efectiva los procedimientos descritos en este documento. Típicamente, los apósitos o vendajes pueden comprender cantidades suficientes de composiciones farmacéuticas y/o moléculas de ácido nucleico modificado o ARNm descritas en este documento para permitir que un usuario realice múltiples tratamientos de un sujeto(s).

45 50 En un aspecto, la descripción proporciona que las moléculas de ácido nucleico modificadas o las composiciones de ARNm se administren en más de una inyección.

55 60 En un aspecto, antes de la administración tópica y/o transdérmica, al menos un área de tejido, tal como la piel, puede someterse a un dispositivo y/o solución que puede aumentar la permeabilidad. En un aspecto, el tejido puede someterse a un dispositivo de abrasión para aumentar la permeabilidad de la piel (véase la publicación de patente de EE. UU. n.º 20080275468). En otro aspecto, el tejido puede someterse a un dispositivo de mejora de ultrasonidos. Un dispositivo de mejora de ultrasonido puede incluir, entre otros, los dispositivos descritos en la publicación de EE. UU. n.º 20040236268 y las patentes de EE. UU. n.º 6.491.657 y 6.234.990. Los procedimientos para mejorar la permeabilidad del tejido se describen en las Publicaciones de EE. UU. n.º 20040171980 y 20040236268 y la Patente de EE. UU. n.º 6.190.315.

65 70 En un aspecto, se puede usar un dispositivo para aumentar la permeabilidad del tejido antes de administrar las formulaciones de ARNm modificado descritas en este documento. La permeabilidad de la piel puede medirse mediante procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en la patente de EE.UU. n.º 6.190.315. Como ejemplo no limitativo, una formulación de ARNm modificado puede administrarse mediante los procedimientos de administración de fármacos descritos en la patente de EE. UU. n.º 6.190.315.

75 80 En otro ejemplo no limitativo, el tejido puede tratarse con una mezcla eutéctica de crema anestésica local (EMLA) antes, durante y/o después de que el tejido pueda someterse a un dispositivo que puede aumentar la permeabilidad. Katz y col. (Anesth Analg (2004); 98:371-76) mostró que usando la crema EMLA en combinación con una energía baja, se observó un inicio de analgesia cutánea superficial tan rápido como 5 minutos después de un pretratamiento con ultrasonidos de baja energía.

En un aspecto, se pueden aplicar potenciadores al tejido antes, durante y/o después de que el tejido haya sido tratado para aumentar la permeabilidad. Los potenciadores incluyen, entre otros, potenciadores del transporte, potenciadores físicos y potenciadores de la cavitación. Los ejemplos no limitativos de potenciadores se describen en la Patente de EE.UU. n.º 6.190.315.

5 En un aspecto, se puede usar un dispositivo para aumentar la permeabilidad del tejido antes de administrar las formulaciones de ARNm modificado descritas en este documento, que además pueden contener una sustancia que provoca una respuesta inmunitaria. En otro ejemplo no limitante, una formulación que contiene una sustancia para invocar una respuesta inmune puede administrarse mediante los procedimientos descritos en las Publicaciones de EE. UU. n.º 20040171980 y 20040236268.

10 Las formas de dosificación para la administración tópica y/o transdérmica de una composición pueden incluir ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, aerosoles, inhalantes y/o parches. Generalmente, un ingrediente activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier conservante y/o tampón necesario según se requiera.

15 Además, la presente descripción contempla el uso de parches transdérmicos, que a menudo tienen la ventaja adicional de proporcionar una administración controlada de un compuesto al cuerpo. Tales formas de dosificación se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo y/o dispensando el compuesto en el medio adecuado. De manera alternativa o adicional, la velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de velocidad y/o dispersando el compuesto en una matriz polimérica y/o gel.

20 25 Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen, pero no se limitan a, preparaciones líquidas y/o semilíquidas tales como linimentos, lociones, aceite en agua y/o agua en emulsiones de aceite tales como cremas, ungüentos y/o pastas, y/o soluciones y/o suspensiones. Las formulaciones tópicamente administrables pueden, por ejemplo, comprender de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 10 % (p/p) de ingrediente activo, aunque la concentración del ingrediente activo puede ser tan alta como el límite de solubilidad del ingrediente activo en el solvente. Las formulaciones para administración tópica pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en esta invención.

Administración de depósitos

30 35 Como se describe en este documento, en algunos aspectos, la composición se formula en depósitos para liberación prolongada. Generalmente, un órgano o tejido específico (un "tejido diana") es el objetivo de la administración.

40 En algunos aspectos, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm se retienen espacialmente dentro o cerca de un tejido diana. Se proporciona un procedimiento para proporcionar una composición a un tejido diana de un mamífero poniendo en contacto el tejido diana (que contiene una o más células diana) con la composición en condiciones tales que la composición, en particular los componentes de ácido nucleico de la composición, se retiene sustancialmente en el tejido diana, lo que significa que al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 o más del 99,99 % de la composición se retiene en el tejido diana. Ventajosamente, la retención se determina midiendo la cantidad de ácido nucleico presente en la composición que entra en una o más células diana. Por ejemplo, al menos 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, 99,99 o más del 99,99 % de los ácidos nucleicos administrados al sujeto están presentes intracelularmente en un período de tiempo después de la administración. Por ejemplo, la inyección intramuscular a un mamífero se realiza usando una composición acuosa que contiene un ácido ribonucleico y un reactivo de transfección, y la retención de la composición se determina midiendo la cantidad de ácido ribonucleico presente en las células musculares.

45 50 Los aspectos de la descripción se refieren a procedimientos para proporcionar una composición a un tejido diana de un sujeto mamífero, poniendo en contacto el tejido diana (que contiene una o más células diana) con la composición en condiciones tales que la composición se retiene sustancialmente en el tejido diana. La composición contiene una cantidad eficaz de moléculas de ácido nucleico o ARNmm de manera que el polipéptido de interés se produce en al menos una célula diana. Las composiciones contienen generalmente un agente de penetración celular, aunque también se contempla un ácido nucleico "desnudo" (tal como ácidos nucleicos sin un agente de penetración celular u otro agente), y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 60 En algunas circunstancias, la cantidad de una proteína producida por las células en un tejido se incrementa convenientemente. Preferiblemente, este aumento en la producción de proteínas se restringe espacialmente a las células dentro del tejido diana. Por lo tanto, se proporcionan procedimientos para aumentar la producción de una proteína de interés en un tejido de un sujeto mamífero. Se proporciona una composición que contiene una molécula de ácido nucleico modificada o ARNmm caracterizada porque se ha determinado que una cantidad unitaria de

composición produce el polipéptido de interés en un porcentaje sustancial de células contenidas dentro de un volumen predeterminado del tejido diana.

- En algunos aspectos, la composición incluye una pluralidad de diferentes moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm, donde una o más de una de las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm codifica un polipéptido de interés. Opcionalmente, la composición contiene también un agente de penetración celular para ayudar en la administración intracelular de la composición. Se determina la dosis de la composición requerida para producir el polipéptido de interés en un porcentaje sustancial de células contenidas dentro del volumen predeterminado del tejido diana (generalmente, sin inducir una producción significativa del polipéptido de interés en el tejido adyacente al volumen predeterminado, o distalmente al tejido diana). Posteriormente a esta determinación, la dosis determinada se introduce directamente en el tejido del sujeto mamífero.

En un aspecto, la descripción proporciona que las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm se administren en más de una inyección o mediante inyecciones de dosis fraccionadas.

- En un aspecto, la descripción se puede retener cerca del tejido diana utilizando un pequeño depósito de fármaco desecharable, una bomba de parche o una bomba osmótica. Los ejemplos no limitativos de bombas de parche incluyen las fabricadas y/o vendidas por BD® (Franklin Lakes, NJ), Insulet Corporation (Bedford, MA), SteadyMed Therapeutics (San Francisco, CA), Medtronic (Minneapolis, MN) (p. ej., MiniMed), UniLife (York, PA), Valeritas (Bridgewater, NJ) y SpringLeaf Therapeutics (Boston, MA). Un ejemplo no limitante de una bomba osmótica incluye las fabricadas por DURECT® (Cupertino, CA) (por ejemplo, DUROS® y ALZET®).

Administración pulmonar

- Una composición farmacéutica se puede preparar, empaquetar y/o vender en una formulación adecuada para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Tal formulación puede comprender partículas secas que comprenden el ingrediente activo y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 7 nm o de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 6 nm. Tales composiciones se encuentran adecuadamente en forma de polvos secos para su administración utilizando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que se puede dirigir una corriente de propulsor para dispersar el polvo y/o utilizando un recipiente dispensador de solvente/polvo autropulsor tal como un dispositivo que comprende el ingrediente activo disuelto y/o suspendido en un propulsor de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Tales polvos comprenden partículas en las que al menos el 98 % de las partículas en peso tienen un diámetro mayor que 0,5 nm y al menos el 95 % de las partículas en número tienen un diámetro menor que 7 nm. Alternativamente, al menos el 95 % de las partículas en peso tienen un diámetro mayor que 1 nm y al menos el 90 % de las partículas en número tienen un diámetro menor que 6 nm. Las composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente de polvo sólido fino tal como azúcar y se proporcionan convenientemente en una forma de dosis unitaria.

- Los propulsores de bajo punto de ebullición generalmente incluyen propulsores líquidos que tienen un punto de ebullición de menos de 65 °F a presión atmosférica. Generalmente, el propulsor puede constituir del 50 al 99,9 % (p/p) de la composición, y el ingrediente activo puede constituir del 0,1 al 20 % (p/p) de la composición. Un propulsor puede comprender además ingredientes adicionales tales como un tensioactivo aniónico líquido y/o sólido y/o un diluyente sólido (que puede tener un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que comprenden el ingrediente activo).

- Como ejemplo no limitativo, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm descritos en este documento pueden formularse para administración pulmonar mediante los procedimientos descritos en la patente de EE.UU. n.º 8.257.685.

- Las composiciones farmacéuticas formuladas para la administración pulmonar pueden proporcionar un ingrediente activo en forma de gotitas de una solución y/o suspensión. Tales formulaciones se pueden preparar, empaquetar y/o vender como soluciones y/o suspensiones alcohólicas acuosas y/o diluidas, opcionalmente estériles, que comprenden el ingrediente activo, y se pueden administrar convenientemente usando cualquier dispositivo de nebulización y/o atomización. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, un agente saborizante tal como sacarina sódica, un aceite volátil, un agente de tampón, un agente tensioactivo y/o un conservante tal como metilhidroxibenzoato. Las gotas proporcionadas por esta vía de administración pueden tener un diámetro promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 200 nm.

- Administración intranasal, nasal y bucal

Las formulaciones descritas en esta invención como útiles para la administración pulmonar son útiles para la

administración intranasal de una composición farmacéutica. Otra formulación adecuada para administración intranasal es un polvo grueso que comprende el ingrediente activo y que tiene una partícula promedio de aproximadamente 0,2 µm a 500 µm. Tal formulación se administra de la manera en que se toma el rapé, es decir, mediante inhalación rápida a través del paso nasal desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de la nariz.

- 5 Las formulaciones adecuadas para la administración nasal pueden, por ejemplo, comprender de aproximadamente el 0,1 % (p/p) y hasta el 100 % (p/p) del ingrediente activo, y pueden comprender uno o más de los ingredientes adicionales descritos en esta invención. Una composición farmacéutica se puede preparar, empaquetar y/o vender en una formulación adecuada para administración bucal. Tales formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de comprimidos y/o grageas hechas usando procedimientos convencionales, y pueden, por ejemplo, 0,1 % a 20 % (p/p) de ingrediente activo, comprendiendo el equilibrio una composición soluble y/o degradable por vía oral y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en esta invención. Alternativamente, las formulaciones adecuadas para la administración bucal pueden comprender un polvo y/o una solución y/o suspensión aerosolizada y/o atomizada que comprende el ingrediente activo. Tales formulaciones en polvo, aerosolizadas y/o aerosolizadas, cuando se dispersan, pueden tener un tamaño de partícula y/o gota promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 200 nm, y pueden comprender además uno o más de cualquiera de los ingredientes adicionales descritos en esta invención.

Administración oftálmica

- 20 Una composición farmacéutica se puede preparar, empaquetar y/o vender en una formulación adecuada para administración oftálmica. Tales formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de gotas para los ojos que incluyen, por ejemplo, una solución y/o suspensión al 0,1/1,0 % (p/p) del ingrediente activo en un excipiente líquido acuoso u oleoso. Tales gotas pueden comprender además agentes de tampón, sales y/o uno o más de cualquiera de los ingredientes adicionales descritos en esta invención. Otras formulaciones administrables oftálmicamente que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcrystalina y/o en una preparación liposómica. Se contempla que las gotas para los oídos y/o gotas para los ojos forman parte de la presente descripción. Se puede preparar un dispositivo de película delgada multicapa para que contenga una composición farmacéutica para administrar al ojo y/o al tejido circundante.

- 30 Administración de carga útil: agentes detectables y agentes terapéuticos

- Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm que se describen en este documento se pueden usar en varios escenarios diferentes en los que se desea la administración de una sustancia (la "carga útil") a una diana biológica, por ejemplo, la administración de sustancias detectables para la detección de la diana, o administración de un agente terapéutico. Los procedimientos de detección pueden incluir, entre otros, procedimientos de obtención de imágenes tanto *in vitro* como *in vivo*, por ejemplo, inmunohistoquímica, imágenes por bioluminiscencia (BLI), imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), microscopía electrónica, tomografía computarizada de rayos X, imágenes Raman, tomografía de coherencia óptica, imágenes de absorción, imágenes térmicas, imágenes de reflectancia de fluorescencia, microscopía de fluorescencia, imágenes de tomografía molecular de fluorescencia, imágenes de resonancia magnética nuclear, imágenes de rayos X, imágenes de ultrasonido, imágenes fotoacústicas, ensayos de laboratorio o en cualquier situación en la que se requiera etiquetado/tinción/imagen.

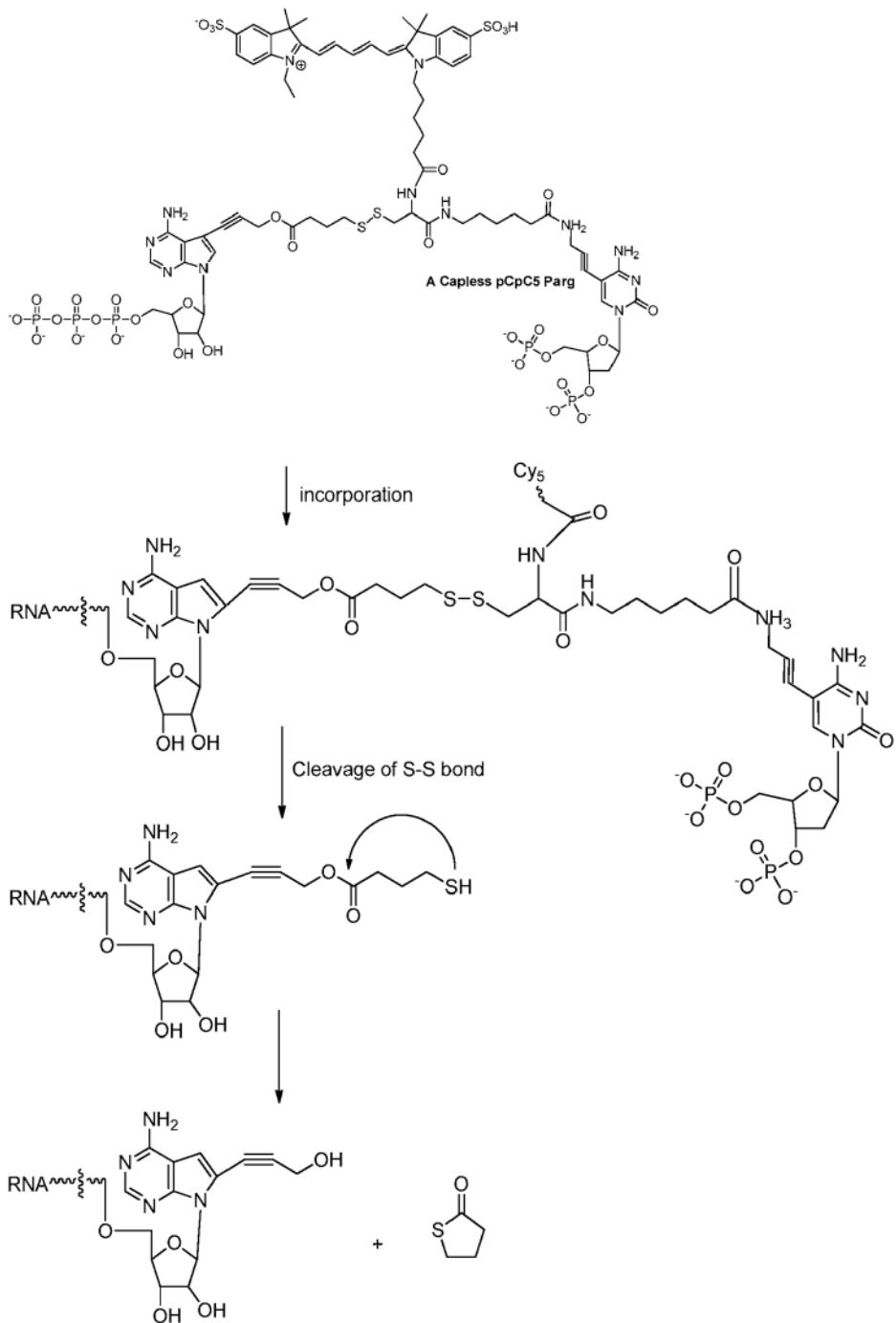
- 45 Las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm pueden diseñarse para incluir tanto un enlazador como una carga útil en cualquier orientación útil. Por ejemplo, un enlazador que tiene dos extremos se usa para unir un extremo a la carga útil y el otro extremo a la nucleobase, tal como en las posiciones C-7 o C-8 de la deaza-adenosina o deaza-guanosina o a las posiciones N-3 o C-5 de citosina o uracilo. El polinucleótido puede incluir más de una carga útil (p. ej., una etiqueta y un inhibidor de la transcripción), así como un enlazador escindible.

- 50 En un aspecto, el nucleótido modificado es un trifosfato de 7-deaza-adenosina modificado, en el que un extremo de un enlazador escindible está unido a la posición C7 de 7-deaza-adenina, el otro extremo del enlazador está unido a un inhibidor (p. ej., a la posición C5 de la nucleobase en una citidina), y se une una etiqueta (por ejemplo, Cy5) al centro del enlazador (véase, por ejemplo, el compuesto 1 de A* pCp C5 Parg sin cubierta en la Fig. 5 y las columnas 9 y 10 de la Patente de EE. UU. n.º 7.994.304). Tras la incorporación del trifosfato de 7-deaza-adenosina modificado a una región codificante, el polinucleótido resultante tiene un conector escindible unido a una etiqueta y un inhibidor (p. ej., un inhibidor de la polimerasa). Tras la escisión del conector (p. ej., con condiciones reductoras para reducir un conector que tiene un resto disulfuro escindible), se liberan la etiqueta y el inhibidor. Enlazadores y cargas útiles adicionales (p. ej., agentes terapéuticos, etiquetas detectables y cargas útiles de penetración celular) se describen en este documento.

El esquema 12 a continuación representa un nucleótido modificado de ejemplo en el que la nucleobase, la adenina, está unida a un conector en el carbono C-7 de la 7-deaza adenina. Además, el Esquema 12 representa el nucleótido

modificado con el enlazador y la carga útil, por ejemplo, un agente detectable, incorporado en el extremo 3' del ARNm. La escisión con disulfuro y la adición en 1,2 del grupo tiol al éster propargílico libera el agente detectable. La estructura restante (representada, por ejemplo, como pApC5Parg en el Esquema 12) es el inhibidor. El fundamento de la estructura de los nucleótidos modificados es que el inhibidor anclado interfiere estéricamente con la capacidad de la polimerasa para incorporar una segunda base. Por lo tanto, es crítico que la fijación sea lo suficientemente larga para afectar a esta función y que el inhibidor esté en una orientación estereoquímica que inhiba o prohíba los nucleótidos segundos y posteriores en la cadena de polinucleótidos en crecimiento.

Scheme 12



incorporación
escisión de unión S-S

15

Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm descritos en este documento se pueden usar en

- la reprogramación de células madre pluripotentes inducidas (células iPS), que pueden rastrear directamente las células que se transfectan en comparación con las células totales en el grupo. En otro ejemplo, se puede usar un fármaco que se puede unir a las moléculas de ácido nucleico modificadas o al ARNm a través de un enlazador y se puede etiquetar con fluorescencia para rastrear el fármaco *in vivo*, p. ej., intracelularmente. Otros ejemplos incluyen, pero no
- 5 se limitan a, el uso de moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm en la administración reversible de fármacos en las células.
- Las moléculas de ácido nucleico modificadas o el ARNm descritos en este documento se pueden usar en el direccionamiento intracelular de una carga útil, por ejemplo, un agente detectable o terapéutico, a un orgánulo 10 específico. Las dianas intracelulares ejemplares pueden incluir, entre otros, la localización nuclear para el procesamiento avanzado de ARNm o una secuencia de localización nuclear (NLS) unida al ARNm que contiene un inhibidor.
- Además, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm descritos en este documento pueden usarse para 15 administrar agentes terapéuticos a células o tejidos, por ejemplo, en animales vivos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos modificados o el ARNm descritos en este documento se pueden usar para administrar agentes quimioterapéuticos altamente polares para destruir células cancerosas. Las moléculas de ácido nucleico modificadas o el ARNm unido 20 al agente terapéutico a través de un enlazador pueden facilitar la permeación de los miembros, lo que permite que el agente terapéutico viaje al interior de una célula para alcanzar una diana intracelular.
- En un ejemplo, el enlazador se une en la posición 2' del anillo de ribosa y/o en la posición 3' y/o 5' de la molécula de 25 la molécula de ácido nucleico modificada o ARNm (véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO2012030683). El enlazador puede ser cualquier enlazador descrito en este documento, conocido en la técnica y/o descrito en la publicación internacional n.º WO2012030683.
- En otro ejemplo, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm se pueden unir a las moléculas de ácido 30 nucleico modificadas o ARNm en un péptido inhibidor viral (VIP) a través de un conector escindible. El enlazador escindible puede liberar el VIP y el colorante en la célula. En otro ejemplo, las moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm pueden unirse a través del conector a un ribosilato de ADP, que es responsable de las acciones de algunas 35 toxinas bacterianas, tales como la toxina del cólera, la toxina de la difteria y la toxina de la tos ferina. Estas proteínas de toxinas son ADP-ribosiltransferasas que modifican proteínas diana en células humanas. Por ejemplo, la toxina del cólera ADP-ribosilatos de proteínas G modifica las células humanas provocando una secreción masiva de líquido del revestimiento del intestino delgado, lo que provoca una diarrea potencialmente mortal.
- En algunos aspectos, la carga útil puede ser un agente terapéutico tal como una citotoxina, un ión radiactivo, un agente 40 quimioterapéutico u otro agente terapéutico. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que pueda ser perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen, entre otros, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracinediona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, 45 procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, maitansinoides, p. ej., maitansinol (véase la patente de EE. UU. n.º 5.208.020 incorporada en este documento en su totalidad), rachelmicina (CC-1065, véanse las patentes de EE. UU. n.º 5.475.092, 5.585.499 y 5.846.545), y análogos u homólogos de los mismos. Los iones radiactivos incluyen, entre otros, yodo (por ejemplo, yodo 125 o yodo 131), estroncio 89, fósforo, paladio, cesio, iridio, fosfato, cobalto, 50 uranio 90, samario 153 y praseodimio. Otros agentes terapéuticos incluyen, entre otros, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, rachelmicina (CC-1065), melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoziotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), 55 antraciclinas (p. ej., daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (p. ej., vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides).
- En algunos aspectos, la carga útil puede ser un agente detectable, tal como varias moléculas pequeñas orgánicas, compuestos inorgánicos, nanopartículas, enzimas o sustratos de enzimas, materiales fluorescentes, materiales 60 luminiscentes (p. ej., luminol), materiales bioluminiscentes (p. ej., luciferasa, luciferina y aequorina), materiales quimioluminiscentes, materiales radiactivos (p. ej., ^{18}F , ^{67}Ga , $^{81\text{m}}\text{Kr}$, ^{82}Rb , ^{111}In , ^{123}I , ^{133}Xe , ^{201}Tl , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{3}H , o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (p. ej., como perteconetato [tecnecato(VII), TcO_4^-]), y agentes de contraste (p. ej., oro (p. ej., nanopartículas de oro), gadolinio (p. ej., Gd quelado), óxidos de hierro (p. ej., óxido de hierro superparamagnético (SPION), nanopartículas de óxido de hierro monocristalino (MION) y óxido de hierro superparamagnético ultrapropio (USPIO)), quelatos de manganese (p. ej., Mn-DPD), sulfato de bario, medios de contraste yodados (iohexol), microburbujas o perfluorocarbonos). Tales marcadores detectables ópticamente incluyen, por ejemplo, sin limitación, 4-acetamido-4'-ácido isotiocianatoestileno-2,2'disulfónico, acridina y derivados (p. ej., acridina e isotiocianato de acridina); ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS); disulfonato de 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenilnaftalimida-3,5; N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; BODIPY; amarillo brillante; cumarina y derivados (p. ej., cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumara 120) y 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Cumara 151)); tintes de cianina;

cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5' 5"-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (rojo de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietiletriamina; ácido 4,4'-disotiocianatodihidroestilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-disotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]-naftaleno-1-sulfonilo (DNS, dansilcloruro); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados (p. ej., eosina e isotiocianato de eosina); eritrosina y derivados (p. ej., eritrosina B e isotiocianato de eritrosina); etidio; fluoresceína y derivados (p. ej., 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, X-rodamina-5-(y-6)-isotiocianato (QFITC o XRTC) y fluorescamina); hidróxido 2-[2-[3-[[1,3-dihidro-1,1-dimetil-3-(3-sulfopropil)-2H-benz[e]indol-2-ilideno]etilideno]-2-[4-(etoxicarbonil)-1-piperazinil]-1-ciclopenten-1-il]etenil]-1,1-dimetil-3-(3-sulfopropil)-1H-benz[e]indolio, sal interna, compuesto con n,n-dietiletanamina (1:1) (IR144); 5-cloro-2-[2-[3-[(5-cloro-3-etil-2(3H)-benzotiazol-ilideno)etilideno]-2-(difenilamino)-1-ciclopenten-1-il]etenilo] -perclorato de 3-etilbenzotiazolio (IR140); isotiocianato de verde de malaquita; 4-metilumbelíferona ortocresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Fenol rojo; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados (p. ej., pireno, butirato de pireno y succinimidil 1-pireno); puntos cuánticos de butirato; rojo reactivo 4 (CibacronTM Rojo brillante 3B-A); rodamina y derivados (p. ej., 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), lisamina rodamina B cloruro de sulfonilo rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulfurorodamina B, sulfurorodamina 101, derivado de cloruro de sulfonilo de sulfurorodamina 101 (Rojo Texas), N,N,N',N'tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA) tetrametil rodamina e isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC)); riboflavina; ácido rosólico; derivados de quelatos de terbio; cianina-3 (Cy3); cianina-5 (Cy5); cianina-5,5 (Cy5,5), cianina-7 (Cy7); IRD 700; IRD 800; Alexa647; La Jolta Azul; ftalocianina; y naftalocianina.

En algunos aspectos, el agente detectable puede ser un precursor no detectable que se vuelve detectable tras la activación (p. ej., construcciones fluorogénicas de tetrazina-fluoróforo (p. ej., tetrazina-BODIPY FL, tetrazina-Verde Oregon 488 o tetrazina-BODIPY TMR-X) o agentes fluorogénicos activables por enzimas (p. ej., PROSENSE® (VisEn Medical))). Los ensayos *in vitro* en los que se pueden usar las composiciones marcadas con enzimas incluyen, entre otros, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos de immunoprecipitación, inmunofluorescencia, inmunoensayos enzimáticos (EIA), radioinmunoensayos (RIA) y análisis de transferencia Western.

Combinaciones

Las moléculas de ácido nucleico o ARNm se pueden usar en combinación con uno o más agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de imagenología. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deben administrarse al mismo tiempo y/o formularse para su administración en conjunto, aunque estos procedimientos de administración están dentro del alcance de la presente descripción. Las composiciones se pueden administrar de forma simultánea, previa o posterior a uno o más procedimientos médicos o terapéuticos deseados. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o en un cronograma determinado para ese agente. En algunos aspectos, la presente descripción comprende la administración de composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imagenología en combinación con agentes que pueden mejorar su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción y/o modifican su distribución dentro del cuerpo. Como ejemplo no limitante, las moléculas de ácido nucleico o ARNm pueden usarse en combinación con un agente farmacéutico para el tratamiento del cáncer o para controlar las células hiperproliferativas. En la patente de EE. UU. n.º 7.964.571, se describe una terapia de combinación para el tratamiento de tumor sólido primario o metastásico utilizando una composición farmacéutica que incluye un plásmido de ADN que codifica interleucina-12 con un lipopolímero y también administrando al menos un agente anticancerígeno o quimioterapéutico. Además, las moléculas de ácido nucleico y el ARNm que codifica moléculas antiproliferativas pueden estar en una composición farmacéutica con un lipopolímero (véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. n.º 2011021823, que reivindica una composición farmacéutica que comprende un plásmido de ADN que codifica una molécula anti-proliferativa y un lipopolímero) que puede administrarse con al menos un agente quimioterapéutico o anticanceroso.

Cargas útiles de penetración celular

En algunos aspectos, los nucleótidos modificados y las moléculas de ácido nucleico modificadas, que se incorporan a un ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ARNm, también pueden incluir una carga útil que puede ser un resto que penetra en las células o un agente que mejora la administración intracelular de las composiciones. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir, entre otras, una secuencia peptídica de penetración celular que facilita la administración al espacio intracelular, por ejemplo, péptido TAT derivado del VIH, penetratinas, transportadores o péptidos de penetración celular derivados de hCT, véase, por ejemplo, Caron y col., (2001) Mol Ther. 3(3):310-8; Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL 2002); El-Andaloussi y col., (2005) Curr Pharm Des. 11(28):3597-611; y Deshayes y col., (2005) Cell Mol Life Sci. 62(16): 1839-49. Las composiciones también se pueden formular para incluir un agente de penetración celular, por ejemplo, liposomas, que mejoran el suministro de las composiciones al espacio intracelular.

Dianas biológicas

Los nucleótidos modificados y las moléculas de ácido nucleico modificadas descritas en este documento, que se incorporan a un ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ARNm, pueden usarse para administrar una carga útil a cualquier diana biológica para la que exista o pueda generarse un ligando específico. El ligando puede unirse a la diana biológica de forma covalente o no covalente.

- 5 Los ejemplos de dianas biológicas incluyen, entre otros, biopolímeros, por ejemplo, anticuerpos, ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, proteínas, enzimas; los ejemplos de proteínas incluyen, pero no se limitan a, enzimas, receptores y canales iónicos. En algunos aspectos, la diana puede ser un marcador específico de tejido o tipo de célula, por ejemplo, una proteína que se expresa específicamente en un tejido o tipo de célula seleccionado. En algunos aspectos, 10 la diana puede ser un receptor, tal como, pero sin limitarse a, receptores de membrana plasmática y receptores nucleares; ejemplos más específicos incluyen, pero no se limitan a, receptores acoplados a proteína G, proteínas de poro celular, proteínas transportadoras, anticuerpos expresados en superficie, proteínas HLA, proteínas MHC y receptores de factores de crecimiento.

15 Dosisificación

En este documento se proporcionan procedimientos que comprenden la administración de ARNm modificados y sus proteínas o complejos codificados de acuerdo con la descripción a un sujeto que lo necesite. Los ácidos nucleicos, las proteínas o los complejos, o sus composiciones farmacéuticas, de formación de imágenes, de diagnóstico o profilácticas, pueden administrarse a un sujeto utilizando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para prevenir, tratar, diagnosticar o formar imágenes de una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, una enfermedad, trastorno y/o condición relacionada con déficits de memoria de trabajo). La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad y similares. Las 20 composiciones de acuerdo con la descripción se formulan típicamente en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de las composiciones puede ser decidido por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis de formación de imágenes específico terapéuticamente efectivo, profilácticamente efectivo o apropiado para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la 25 gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o 30 coincidentes con el compuesto específico empleado; y como factores bien conocidos en las artes médicas.

35 En ciertos aspectos, las composiciones de acuerdo con la presente descripción pueden administrarse a niveles de dosificación suficientes para administrar desde aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente de 100 mg/kg, desde aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, desde aproximadamente 0,005 mg /kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 0,005 mg/kg, de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a 40 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, del peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico, de diagnóstico, profiláctico o de formación de imágenes deseado. La dosificación deseada puede administrarse tres veces al día, dos veces al día, 45 una vez al día, cada dos días, cada tercer día, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. En ciertos aspectos, la dosificación deseada puede administrarse utilizando múltiples administraciones (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).

50 De acuerdo con la presente descripción, se ha descubierto que la administración de ARNm en regímenes de dosis fraccionada produce niveles más altos de proteínas en sujetos mamíferos. Como se usa en este documento, una "dosis dividida" es la división de una dosis unitaria única o una dosis diaria total en dos o más dosis, por ejemplo, dos o más administraciones de la dosis unitaria única. Como se usa en este documento, una "dosis unitaria única" es una dosis de cualquier agente terapéutico administrado en una dosis/en un momento/vía única/punto de contacto único, es decir, evento de administración única. Como se usa en este documento, una "dosis diaria total" es una cantidad 55 administrada o prescrita en un período de 24 horas. Puede administrarse como una sola dosis unitaria. En un aspecto, los ARNm se administran a un sujeto en dosis fraccionadas. El ARNm puede formularse solo en tampón o en una formulación descrita en este documento.

60 Formas de dosificación

Una composición farmacéutica descrita en este documento se puede formular en una forma de dosificación descrita en este documento, tal como tópica, intranasal, intratraqueal o inyectable (por ejemplo, intravenosa, intraocular, intravítreo, intramuscular, intracardíaca, intraperitoneal, subcutánea).

Formas de dosificación líquidas

- 5 Las formas de dosificación líquidas para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los ingredientes activos, las formas de dosificación líquidas pueden comprender diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica que incluyen, entre otros, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germe, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. En ciertos aspectos para la administración parenteral, las composiciones se pueden mezclar con agentes solubilizantes tales como CREMOPHOR®, alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbatos, ciclodextrinas, polímeros y/o combinaciones de los mismos.
- 10
- 15 Inyectable
- Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida y pueden incluir agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles pueden ser soluciones, suspensiones y/o emulsiones inyectables estériles en diluyentes y/o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicos, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se incluyen, entre otros, agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro sódico. Los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluidos los monoglicerídos o diglicerídos sintéticos. Los ácidos grasos tales como el ácido oleico se pueden utilizar en la preparación de inyectables.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45 Pulmonar
- 50 Las formulaciones descritas en este documento como útiles para la administración pulmonar también pueden usarse para la administración intranasal de una composición farmacéutica. Otra formulación adecuada para la administración intranasal puede ser un polvo grueso que comprenda el ingrediente activo y que tenga una partícula promedio de aproximadamente 0,2 µm a 500 µm. Tal formulación se puede administrar de la misma manera que se toma el rapé, es decir, por inhalación rápida a través de las fosas nasales desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de la nariz.
- 55 Las formulaciones adecuadas para la administración nasal pueden, por ejemplo, comprender desde aproximadamente un 0,1 % (p/p) hasta un 100 % (p/p) de ingrediente activo, y pueden comprender uno o más de los ingredientes adicionales descritos en este documento. Una composición farmacéutica se puede preparar, envasar y/o vender en una formulación adecuada para la administración bucal. Tales formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de tabletas y/o pastillas preparadas usando procedimientos convencionales y pueden, por ejemplo, contener alrededor de 0,1 % a 20 % (p/p) de ingrediente activo, donde el resto puede comprender una composición soluble y/o degradable por vía oral y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en este documento.
- 60 Alternativamente, las formulaciones adecuadas para la administración bucal pueden comprender un polvo y/o una solución y/o suspensión aerosolizada y/o atomizada que comprende el ingrediente activo. Tales formulaciones en polvo, aerosolizadas y/o aerosolizadas, cuando se dispersan, pueden tener un tamaño promedio de partículas y/o gotitas en el intervalo de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 200 nm, y pueden comprender además uno o

más de los ingredientes adicionales descritos en este documento.

Se pueden encontrar consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005).

5

Recubrimientos o cubiertas

Las formas de dosificación sólidas de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden comprender agentes opacificantes y pueden ser de una composición que liberen el o los ingredientes activos solo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. Se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina llenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Propiedades de las composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se pueden caracterizar por una o más de las siguientes propiedades:

Biodisponibilidad

Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm, cuando se formulan en una composición con un agente de administración como se describe en este documento, pueden exhibir un aumento en la biodisponibilidad en comparación con una composición que carece de un agente de administración como se describe en este documento. Como se usa en este documento, el término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica de una cantidad determinada de una molécula de ácido nucleico modificada administrada a un mamífero. La biodisponibilidad se puede evaluar midiendo el área bajo la curva (AUC) o la concentración máxima en suero o plasma (Cmax) de la forma inalterada de un compuesto después de la administración del compuesto a un mamífero. AUC es una determinación del área bajo la curva que traza la concentración sérica o plasmática de un compuesto a lo largo de la ordenada (eje Y) contra el tiempo a lo largo de la abscisa (eje X). Generalmente, el AUC para un compuesto particular se puede calcular utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y como se describe en G. S. Banker, Modern Pharmaceutics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v. 72, Marcel Dekker, New York, Inc. , 1996.

El valor de C_{max} es la concentración máxima del compuesto alcanzada en el suero o plasma de un mamífero después de la administración del compuesto al mamífero. El valor de C_{max} de un compuesto particular se puede medir utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Las frases "aumento de la biodisponibilidad" o "mejora de la farmacocinética", tal como se utilizan en este documento, significan que la disponibilidad sistémica de una primera molécula de ácido nucleico modificada, medida como AUC, C_{max} o C_{min} en un mamífero, es mayor cuando se administra junto con un suministro tal como se describe en este documento, que cuando no se lleva a cabo dicha co-administración. En algunos aspectos, la biodisponibilidad de la molécula de ácido nucleico modificada puede aumentar en al menos un 2 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o aproximadamente el 100 %.

50

Ventana Terapéutica

Las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm cuando se formulan en una composición con un agente de administración como se describe en este documento, pueden exhibir un aumento en la ventana terapéutica de la composición de molécula de ácido nucleico modificada administrada en comparación con la ventana terapéutica de la composición de molécula de ácido nucleico modificada administrada que carece de un agente de administración como se describe en este documento. Tal como se usa en este documento, "ventana terapéutica" se refiere al intervalo de concentraciones plasmáticas, o el intervalo de niveles de sustancia terapéuticamente activa en el sitio de acción, con una alta probabilidad de provocar un efecto terapéutico. En algunos aspectos, la ventana terapéutica de la molécula de ácido nucleico modificada cuando se co-administra con un agente de administración como se describe en este documento puede aumentar en al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos

aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, o 5 aproximadamente el 100 %.

Volumen de distribución

10 Las moléculas de ácido nucleico modificadas, cuando se formulan en una composición con un agente de liberación como se describe en este documento, pueden exhibir un volumen de distribución mejorado (V_{dist}), por ejemplo, reducido o dirigido, en relación con una composición de molécula de ácido nucleico modificada que carece de un agente de liberación como se describe en este documento. El volumen de distribución (V_{dist}) relaciona la cantidad del fármaco en el cuerpo con la concentración del fármaco en la sangre o el plasma. Tal como se utiliza en esta invención, 15 el término "volumen de distribución" se refiere al volumen de líquido que sería necesario para contener la cantidad total del fármaco en el cuerpo a la misma concentración que en la sangre o el plasma: V_{dist} es igual a la cantidad de fármaco en el cuerpo/concentración de fármaco en sangre o plasma. Por ejemplo, para una dosis de 10 mg y una concentración plasmática de 10 mg/L, el volumen de distribución sería de 1 litro. El volumen de distribución refleja la medida en que el fármaco está presente en el tejido extravascular. Un gran volumen de distribución refleja la tendencia 20 de un compuesto a unirse a los componentes tisulares en comparación con la unión a proteínas plasmáticas. En un entorno clínico, V_{dist} se puede utilizar para determinar una dosis de carga para lograr una concentración de estado estacionario. En algunos aspectos, el volumen de distribución de la molécula de ácido nucleico modificada cuando se co-administra con un agente de administración como se describe en este documento puede disminuir al menos 25 aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos 30 aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 70%.

Efecto biológico

En un aspecto, el efecto biológico del ARNm modificado administrado a los animales puede categorizarse analizando 35 la expresión de la proteína en los animales. La expresión de la proteína se puede determinar a partir del análisis de una muestra biológica recogida de un mamífero al que se le administró el ARNm modificado. En un aspecto, puede preferirse la proteína de expresión codificada por el ARNm modificado administrado al mamífero en al menos 50 pg/ml. Por ejemplo, una expresión de proteína de 50-200 pg/ml para la proteína codificada por el ARNm modificado administrado al mamífero puede verse como una cantidad de proteína terapéuticamente eficaz en el mamífero.

Detección de ácidos nucleicos modificados por espectrometría de masas

40 La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que puede proporcionar información sobre la concentración/masa estructural y molecular de las moléculas después de su conversión en iones. Las moléculas primero se ionizan para adquirir cargas positivas o negativas y, a continuación, viajan a través del analizador de masas para llegar a diferentes áreas del detector según su relación masa/carga (m/z).

45 La espectrometría de masas se realiza utilizando un espectrómetro de masas que incluye una fuente de iones para ionizar la muestra fraccionada y crear moléculas cargadas para análisis posteriores. Por ejemplo, la ionización de la muestra se puede realizar mediante ionización por electropulverización (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización, ionización electrónica, bombardeo con átomos rápidos (FAB)/ionización secundaria líquida (LSIMS), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), ionización de campo, desorción de campo, ionización por termopulverización/pulverización por plasma e ionización por haz de partículas. El experto en la materia 50 comprenderá que la elección del procedimiento de ionización se puede determinar en función del analito que se va a medir, el tipo de muestra, el tipo de detector, la elección del modo positivo frente al negativo, etc.

55 Una vez ionizada la muestra, los iones cargados positiva o negativamente creados pueden analizarse para determinar una relación masa-carga (es decir, m/z). Los analizadores adecuados para determinar las relaciones masa-carga incluyen analizadores cuadripolares, analizadores de trampas de iones y analizadores de tiempo de vuelo. Los iones pueden detectarse usando varios modos de detección. Por ejemplo, se pueden detectar iones seleccionados (es decir, usando un modo de monitoreo de iones selectivos (SIM)), o alternativamente, se pueden detectar iones usando un modo de exploración, por ejemplo, monitoreo de reacciones múltiples (MRM) o monitoreo de reacciones seleccionadas (SRM).

Se ha demostrado que la cromatografía líquida-monitoreo de reacciones múltiples (LC-MS/MRM) junto con la dilución

marcada con isótopos estables de estándares peptídicos es un procedimiento eficaz para la verificación de proteínas (p. ej., Keshishian y col., Mol Cell Proteomics 2009 8: 2339-2349 ; Kuhn y col., Clin Chem 2009 55:1108-1117; Lopez y col., Clin Chem 2010 56:281-290). A diferencia de la espectrometría de masas no dirigida que se usa con frecuencia en los estudios de descubrimiento de biomarcadores, los procedimientos de EM dirigidos son modos de EM basados

- 5 en secuencias peptídicas que concentran toda la capacidad analítica del instrumento en decenas a cientos de péptidos seleccionados en una mezcla compleja. Al restringir la detección y la fragmentación solo a aquellos péptidos derivados de proteínas de interés, la sensibilidad y la reproducibilidad mejoran drásticamente en comparación con los procedimientos de MS en modo descubrimiento. Este procedimiento de cuantificación de proteínas mediante monitorización de reacciones múltiples (MRM) basado en espectrometría de masas puede tener un impacto
10 espectacular en el descubrimiento y la cuantificación de biomarcadores a través de perfiles de expresión de proteínas multiplexados, dirigidos y rápidos de muestras clínicas.

En un aspecto, una muestra biológica que puede contener al menos una proteína codificada por al menos un ARNm modificado puede analizarse mediante el procedimiento de MRM-MS. La cuantificación de la muestra biológica puede incluir además, pero no se limita a, péptidos o proteínas marcados isotópicamente como estándares internos.
15

Según la presente descripción, la muestra biológica, una vez obtenida del sujeto, puede someterse a digestión enzimática. Como se usa en este documento, el término "digerir" significa romper en péptidos más cortos. Como se usa en este documento, la frase "tratar una muestra para digerir proteínas" significa manipular una muestra de tal manera que se descompongan las proteínas en una muestra. Estas enzimas incluyen, pero no se limitan a, tripsina, endoproteína Glu-C y quimotripsina. En un aspecto, una muestra biológica que puede contener al menos una proteína codificada por al menos un ARNm modificado puede digerirse usando enzimas.
20

25 En un aspecto, una muestra biológica que puede contener proteína codificada por ARNm modificado puede analizarse en busca de proteína usando ionización por electropulverización. La espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI) (ESIMS) utiliza energía eléctrica para ayudar en la transferencia de iones de la solución a la fase gaseosa antes de que sean analizados por espectrometría de masas. Las muestras pueden analizarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica (p. ej., Ho y col., Clin Biochem Rev. 2003 24(1):3-12). Las especies iónicas contenidas en la solución pueden transferirse a la fase gaseosa dispersando un rocío fino de gotitas cargadas, evaporando el solvente y expulsando los iones de las gotitas cargadas para generar una neblina de gotitas altamente cargadas. La neblina de gotitas altamente cargadas puede analizarse utilizando al menos 1, al menos 2, al menos 3 o al menos 4 analizadores de masas tales como, entre otros, un analizador de masas cuadripolar. Además, el procedimiento de espectrometría de masas puede incluir una etapa de purificación. Como ejemplo no limitativo, el primer cuadripolo se puede configurar para seleccionar una sola relación m/z para que pueda filtrar otros iones
30 moleculares que tengan una relación m/z diferente, lo que puede eliminar procedimientos de purificación de muestras complicados y lentos antes del análisis MS.
35

40 En un aspecto, una muestra biológica que puede contener proteína codificada por ARNm modificado puede analizarse en busca de proteína en un sistema ESIMS en tandem (por ejemplo, MS/MS). Como ejemplos no limitantes, las gotitas pueden analizarse usando un escaneo de producto (o escaneo secundario), un escaneo de precursor (escaneo principal), una pérdida neutra o un monitoreo de reacción múltiple.

45 En un aspecto, una muestra biológica que puede contener proteína codificada por ARNm modificado puede analizarse utilizando espectrometría de masas (MALDIMS) de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). MALDI permite la vaporización e ionización no destructivas de moléculas grandes y pequeñas, tales como las proteínas. En el análisis MALDI, el analito primero se co-crystaliza con un gran exceso molar de un compuesto de matriz, que también puede incluir, entre otros, un ácido orgánico débil que absorbe ultravioleta. Ejemplos no limitantes de matrices utilizadas en MALDI son ácido α-ciano-4-hidroxicinámico, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico y ácido 2,5-dihidroxibenzoico. La radiación láser de la mezcla analito-matriz puede dar como resultado la vaporización de la matriz
50 y el analito. La desorción inducida por láser proporciona altos rendimientos de iones del analito intacto y permite la medición de compuestos con gran precisión. Las muestras pueden analizarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica (p. ej., Lewis, Wei y Siuzdak, Encyclopedia of Analytical Chemistry 2000:5880-5894). Como ejemplos no limitativos, los analizadores de masas usados en el análisis MALDI pueden incluir un tiempo de vuelo lineal (TOF), un reflectrón TOF o un analizador de masas por transformada de Fourier.
55

En un aspecto, la mezcla analito-matriz se puede formar utilizando el procedimiento de gotas secas. Una muestra biológica se mezcla con una matriz para crear una solución de matriz saturada en la que la relación matriz-muestra es de aproximadamente 5000:1. A continuación, se deja secar una alícuota (aproximadamente 0,5-2,0 uL) de la solución de matriz saturada para formar la mezcla analito-matriz.
60

En un aspecto, la mezcla analito-matriz puede formarse utilizando el procedimiento de capa fina. Primero se forma una película homogénea de matriz y, a continuación, se aplica la muestra y puede ser absorbida por la matriz para formar la mezcla analito-matriz.

En un aspecto, la mezcla analito-matriz se puede formar utilizando el procedimiento de capa gruesa. Se forma una película homogénea de matriz con un aditivo de matriz de nitrocelulosa. Una vez que se obtiene la capa de matriz de nitrocelulosa uniforme, la muestra se aplica y se absorbe en la matriz para formar la mezcla analito-matriz.

5 En un aspecto, la mezcla analito-matriz se puede formar utilizando el procedimiento de sándwich. Se prepara una capa delgada de cristales de matriz como en el procedimiento de capa delgada seguido de la adición de gotitas de ácido trifluoroacético acuoso, la muestra y la matriz. A continuación, la muestra se absorbe en la matriz para formar la mezcla analito-matriz.

10 Usos de moléculas de ácido nucleico modificadas

Agentes Terapéuticos

15 Las moléculas de ácido nucleico modificadas y las proteínas traducidas a partir de las moléculas de ácido nucleico modificadas descritas en este documento pueden usarse como agentes terapéuticos. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico modificada descrita en este documento se puede administrar a un sujeto, en el que la molécula de ácido nucleico modificada se traduce *in vivo* para producir un péptido terapéutico en el sujeto. Por consiguiente, en este documento se proporcionan composiciones, procedimientos, kits y reactivos para el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones en seres humanos y otros mamíferos. Los agentes terapéuticos activos de la presente descripción incluyen, entre otros, moléculas de ácido nucleico modificadas, células que contienen moléculas de ácido nucleico modificadas o polipéptidos traducidos de moléculas de ácido nucleico modificadas, polipéptidos traducidos de moléculas de ácido nucleico modificadas y células en contacto con células que contienen moléculas de ácido nucleico modificadas o polipéptidos traducidos a partir de moléculas de ácido nucleico modificadas.

25 En ciertos aspectos, se proporcionan terapias combinadas que pueden contener una o más moléculas de ácido nucleico modificadas que contienen regiones traducibles junto con una proteína que induce toxicidad celular dependiente de anticuerpos. Como se usa en este documento, "regiones traducibles" codifican una proteína o proteínas que pueden aumentar la inmunidad de un sujeto. Por ejemplo, en este documento se proporcionan agentes terapéuticos que contienen uno o más ácidos nucleicos que codifican trastuzumab y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En particular, tales terapias combinadas pueden ser útiles en pacientes con cáncer de mama Her2+ que desarrollan resistencia inducida a trastuzumab. (Véase, por ejemplo, Albrecht, Immunotherapy. 2(6):795-8 (2010))

35 También se proporcionan procedimientos para inducir la traducción de un polipéptido recombinante en una población celular usando las moléculas de ácido nucleico modificadas descritas en este documento. Tal traducción puede ser *in vivo*, *ex vivo*, *en cultivo* o *in vitro*. La población celular puede ponerse en contacto con una cantidad eficaz de una composición que contiene un ácido nucleico que tiene al menos una modificación de nucleósido y una región traducible que codifica el polipéptido recombinante. La población puede ponerse en contacto en condiciones tales que el ácido nucleico pueda localizarse en una o más células de la población celular y el polipéptido recombinante pueda traducirse en la célula a partir del ácido nucleico.

45 Se puede proporcionar una cantidad eficaz de la composición en función, al menos en parte, del tejido diana, el tipo de célula diana, los medios de administración, las características físicas del ácido nucleico (p. ej., tamaño y cantidad de nucleósidos modificados) y otros determinantes. En general, una cantidad eficaz de la composición proporciona una producción eficaz de proteínas en la célula, preferiblemente más eficaz que una composición que contiene una molécula de ácido nucleico no modificada correspondiente. El aumento de la eficiencia puede demostrarse mediante el aumento de la transfección celular (es decir, el porcentaje de células transfectadas con el ácido nucleico), el aumento de la traducción de proteínas del ácido nucleico, la disminución de la degradación del ácido nucleico (como se demuestra, por ejemplo, mediante el aumento de la duración de la traducción de proteínas de una molécula de ácido nucleico modificada), o respuesta inmunitaria innata reducida de la célula huésped.

55 Los aspectos de la presente descripción están dirigidos a procedimientos para inducir la traducción *in vivo* de un polipéptido recombinante en un sujeto mamífero que lo necesite. Allí, se puede administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que contiene un ácido nucleico que tiene al menos una modificación de nucleósido y una región traducible que codifica el polipéptido recombinante utilizando los procedimientos de administración descritos en este documento. El ácido nucleico se puede proporcionar en una cantidad y en otras condiciones tales que el ácido nucleico se localiza en una célula del sujeto y el polipéptido recombinante se puede traducir en la célula a partir del ácido nucleico. La célula en la que se localiza el ácido nucleico, o el tejido en el que está presente la célula, puede ser objeto de una o más rondas de administración de ácido nucleico.

60 Otros aspectos de la presente descripción se relacionan con el trasplante de células que contienen moléculas de ácido

nucleico modificadas a un sujeto mamífero. La administración de células a sujetos mamíferos es conocida por los expertos en la técnica e incluye, pero no se limita a, implantación local (p. ej., administración tópica o subcutánea), administración de órganos o inyección sistémica (p. ej., inyección intravenosa o inhalación) y la formulación de células en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que contienen moléculas de ácido nucleico

5 modificadas se formulan para la administración por vía intramuscular, transarterial, intraperitoneal, intravenosa, intranasal, subcutánea, endoscópica, transdérmica o intratecal. En algunos aspectos, la composición puede formularse para liberación prolongada.

10 El sujeto al que se le puede administrar el agente terapéutico sufre o puede estar en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección perjudicial. Se proporcionan procedimientos para identificar, diagnosticar y clasificar sujetos sobre estas bases, que pueden incluir diagnóstico clínico, niveles de biomarcadores, estudios de asociación del genoma completo (GWAS) y otros procedimientos conocidos en la técnica.

15 En ciertos aspectos, la molécula de ácido nucleico modificada administrada dirige la producción de uno o más polipéptidos recombinantes que proporcionan una actividad funcional que puede estar sustancialmente ausente en la célula en la que se puede traducir el polipéptido recombinante. Por ejemplo, la actividad funcional que falta puede ser de naturaleza enzimática, estructural o reguladora de genes.

20 En otros aspectos, la administración de una molécula de ácido nucleico modificada dirige la producción de uno o más polipéptidos recombinantes que reemplazan un polipéptido (o múltiples polipéptidos) que pueden estar sustancialmente ausentes en la célula en la que se puede traducir el polipéptido recombinante. Tal ausencia puede deberse a una mutación genética del gen codificante o a una ruta reguladora del mismo. Alternativamente, el polipéptido recombinante funciona para antagonizar la actividad de una proteína endógena presente en, sobre la superficie o secretada por la célula. Normalmente, la actividad de la proteína endógena puede ser perjudicial para el sujeto, por ejemplo, debido a la mutación de la proteína endógena que da como resultado una actividad o localización alterada. Además, el polipéptido recombinante antagoniza, directa o indirectamente, la actividad de un resto biológico presente en, sobre la superficie o secretado por la célula. Los ejemplos de restos biológicos antagonizados incluyen, pero no se limitan a, lípidos (p. ej., colesterol), una lipoproteína (p. ej., lipoproteína de baja densidad), un ácido nucleico, un carbohidrato o una toxina de molécula pequeña.

25 30 Las proteínas recombinantes descritas en este documento pueden diseñarse para su localización dentro de la célula, potencialmente dentro de un compartimento específico tal como el núcleo, o pueden diseñarse para la secreción desde la célula o la translocación a la membrana plasmática de la célula.

35 Como se describe en este documento, una característica útil de las moléculas de ácido nucleico modificadas de la presente descripción es la capacidad de reducir la respuesta inmunitaria innata de una célula a un ácido nucleico exógeno. Se proporcionan procedimientos para realizar la titulación, reducción o eliminación de la respuesta inmunitaria en una célula o una población de células. En algunos aspectos, la célula puede ponerse en contacto con una primera composición que contiene una primera dosis de un primer ácido nucleico exógeno que incluye una región traducible y al menos una modificación de nucleósido, y el nivel de la respuesta inmunitaria innata de la célula al primer ácido nucleico exógeno. puede determinarse el ácido nucleico. Posteriormente, la célula puede ponerse en contacto con una segunda composición, que incluye una segunda dosis del primer ácido nucleico exógeno, conteniendo la segunda dosis una cantidad menor del primer ácido nucleico exógeno en comparación con la primera dosis. Alternativamente, la célula puede ponerse en contacto con una primera dosis de un segundo ácido nucleico exógeno. 40 45 50 El segundo ácido nucleico exógeno puede contener uno o más nucleósidos modificados, que pueden ser iguales o diferentes del primer ácido nucleico exógeno o, alternativamente, el segundo ácido nucleico exógeno puede no contener nucleósidos modificados. Las etapas de poner en contacto la célula con la primera composición y/o la segunda composición pueden repetirse una o más veces. Además, la eficiencia de la producción de proteínas (p. ej., traducción de proteínas) en la célula puede determinarse opcionalmente, y la célula puede volver a transfecirse con la primera y/o la segunda composición repetidamente hasta que se logre una eficiencia de producción de proteínas diana.

Terapéutica para enfermedades y afecciones

55 En este documento se proporcionan procedimientos para tratar o prevenir un síntoma de enfermedades, caracterizados por una actividad proteica que falta o anómala, suministrando la actividad proteica que falta o superando la actividad proteica anómala. Debido al rápido inicio de la producción de proteínas tras la introducción de ARNm modificado, en comparación con los vectores de ADN viral, los compuestos de la presente descripción son particularmente ventajosos en el tratamiento de enfermedades agudas tales como sepsis, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio. Además, se puede lograr una titulación precisa de la proteína utilizando el ARNm modificado de la presente descripción, ya que el ARNm modificado puede alterar las tasas de transcripción y, por lo tanto, causar cambios en la expresión génica.

Las enfermedades caracterizadas por actividad proteica disfuncional o aberrante incluyen, pero no se limitan a, cáncer y enfermedades proliferativas, enfermedades genéticas (por ejemplo, fibrosis quística), enfermedades autoinmunes, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas. La presente descripción proporciona un procedimiento para tratar tales afecciones o enfermedades en un sujeto mediante

- 5 la introducción de ácidos nucleicos o terapias basadas en células que contienen las moléculas de ácido nucleico modificadas proporcionadas en este documento, en el que las moléculas de ácido nucleico modificadas codifican una proteína que antagoniza o supera de otro modo la actividad proteica aberrante presente en la célula del sujeto. Los ejemplos específicos de una proteína disfuncional incluyen, pero no se limitan a, las variantes de mutación de sentido erróneo del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que produce una variante 10 de proteína disfuncional de la proteína CFTR, que provoca la fibrosis quística.

Múltiples enfermedades pueden caracterizarse por la ausencia (o disminución sustancial de tal manera que no se produce la función proteica adecuada) de la actividad proteica. Tales proteínas pueden no estar presentes o pueden ser esencialmente no funcionales.

- 15 Por tanto, se proporcionan procedimientos para tratar la fibrosis quística en un mamífero poniendo en contacto una célula del sujeto con una molécula de ácido nucleico modificada que tiene una región traducible que codifica un polipéptido CFTR funcional, en condiciones tales que una cantidad eficaz del polipéptido CFTR está presente en la célula. Las células diana preferidas son las células epiteliales, tales como las de pulmón, y los procedimientos de 20 administración se determinan teniendo en cuenta el tejido diana; es decir, para administración pulmonar, las moléculas de ARN se formulan para administración por inhalación.

- 25 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar la hiperlipidemia en un sujeto, introduciendo en una población celular del sujeto una molécula de ARNm modificada que codifica sortilina, una proteína recientemente caracterizada por estudios genómicos, mejorando así la hiperlipidemia en un sujeto. El gen SORT1 codifica una proteína transmembrana de la red trans-Golgi (TGN) llamada sortilina. Los estudios genéticos han demostrado que uno de cada cinco individuos tiene un polimorfismo de un solo nucleótido, rs12740374, en el locus 1p13 del gen SORT1 que los predispone a tener niveles bajos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Cada copia del alelo menor, presente en aproximadamente el 30 % de 30 las personas, altera el colesterol LDL en 8 mg/dL, mientras que dos copias del alelo menor, presentes en aproximadamente el 5 % de la población, reducen el colesterol LDL en 16 mg/dL. También se ha demostrado que los portadores del alelo menor tienen un 40 % menos de riesgo de infarto de miocardio. Los estudios funcionales *in vivo* en ratones describen que la sobreexpresión de SORT1 en tejido hepático de ratón condujo a niveles de colesterol LDL significativamente más bajos, hasta un 80 % más bajos, y que silenciar SORT1 aumentó el colesterol LDL 35 aproximadamente en un 200 % (Musunuru K y col. de la variante no codificante al fenotipo a través de SORT1 en el locus de colesterol 1p13 Nature 2010; 466: 714-721).

Procedimientos de suministro de ácido nucleico celular

- 40 Los procedimientos de la presente descripción mejoran el suministro de ácido nucleico a una población celular, *in vivo*, *ex vivo* o en cultivo. Por ejemplo, un cultivo celular que contiene una pluralidad de células huésped (por ejemplo, células eucariotas tales como levaduras o células de mamíferos) puede ponerse en contacto con una composición que contiene una molécula de ácido nucleico modificada que tiene al menos una modificación de nucleósido y, opcionalmente, una región traducible. La composición también puede contener generalmente un reactivo de 45 transfección u otro compuesto que puede aumentar la eficacia de la absorción de moléculas de ácido nucleico modificadas en las células huésped. La molécula de ácido nucleico modificada puede exhibir una mayor retención en la población celular, en relación con una molécula de ácido nucleico no modificada correspondiente. La retención de la molécula de ácido nucleico modificada puede ser mayor que la retención de la molécula de ácido nucleico no modificada. En algunos aspectos, es al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 100 %, 150 %, 200 % 50 o más del 200 % mayor que la retención de la molécula de ácido nucleico no modificada. Tal ventaja de retención puede lograrse mediante una ronda de transfección con la molécula de ácido nucleico modificada, o puede obtenerse después de repetidas rondas de transfección.

- 55 En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico modificada puede suministrarse a una población de células diana con uno o más ácidos nucleicos adicionales. Tal suministro puede ser al mismo tiempo, o la molécula de ácido nucleico modificada se suministra antes de la administración de uno o más ácidos nucleicos adicionales. El uno o más ácidos nucleicos adicionales pueden ser moléculas de ácido nucleico modificadas o moléculas de ácido nucleico no modificadas. Se entiende que la presencia inicial de las moléculas de ácido nucleico modificadas puede no inducir sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de la población celular y, además, que la respuesta inmunitaria 60 innata puede no activarse por la presencia posterior de las moléculas de ácido nucleico no modificadas. A este respecto, el ácido nucleico potenciado puede no contener por sí mismo una región traducible, si la proteína que se desea que esté presente en la población de células diana se traduce a partir de moléculas de ácido nucleico no modificadas.

Fracciones de orientación

- 5 En algunos aspectos, se proporcionan moléculas de ácido nucleico modificadas para expresar un compañero de unión a proteínas o un receptor en la superficie de la célula, que puede funcionar para dirigir la célula a un espacio de tejido específico o para interactuar con un resto específico, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Los compañeros de unión a proteínas adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos, proteínas de armazón o péptidos. Además, pueden emplearse moléculas de ácido nucleico modificadas para dirigir la síntesis y la localización extracelular de lípidos, carbohidratos u otros restos biológicos.
- 10 Silenciamiento permanente de la expresión génica
- Un procedimiento para silenciar epigenéticamente la expresión génica en un sujeto mamífero, que comprende un ácido nucleico donde la región traducible codifica un polipéptido o polipéptidos capaces de dirigir la metilación de la histona H3 específica de la secuencia para iniciar la formación de heterocromatina y reducir la transcripción génica alrededor de genes específicos con el fin de silenciar el gen. Por ejemplo, una mutación de ganancia de función en el gen Janus Kinase 2 es responsable de la familia de enfermedades mieloproliferativas.
- 15 Expresión de ligando o receptor en la superficie celular
- 20 En algunos aspectos descritos en este documento, el ARN modificado se puede usar para expresar un ligando o un receptor de ligando en la superficie de una célula (p. ej., un resto guiado). Un ligando o un resto de receptor de ligando unido a una superficie celular puede permitir que la célula tenga una interacción biológica deseada con un tejido o un agente *in vivo*. Un ligando puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un aptámero, un péptido, una vitamina, un carbohidrato, una proteína o un polipéptido, un receptor, por ejemplo, un receptor de superficie celular, una molécula de adhesión, una glicoproteína, un residuo de azúcar, un agente terapéutico, un fármaco, un glicosaminoglicano o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, un ligando puede ser un anticuerpo que reconoce un antígeno específico de una célula cancerosa, haciendo que la célula sea capaz de interaccionar preferentemente con las células tumorales para permitir la localización específica del tumor de una célula modificada.
- 25 30 Un ligando puede conferir la capacidad de una composición celular de acumularse en un tejido que se va a tratar, ya que un ligando preferido puede ser capaz de interaccionar con una molécula diana en la cara externa de un tejido que se va a tratar. Generalmente se prefieren los ligandos que tienen una reactividad cruzada limitada con otros tejidos.
- 35 40 En algunos casos, un ligando puede actuar como un resto receptor que permite que la célula se dirija a un tejido específico o interactúe con un ligando específico. Tales restos guiados pueden incluir, entre otros, cualquier miembro de un par de unión específica, anticuerpos, anticuerpos monoclonales o derivados o análogos de los mismos, incluidos, entre otros: fragmentos Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), fragmentos Fab', fragmentos F(ab')2, anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos camélidos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanizados, y versiones multivalentes de los anteriores; reactivos de unión multivalente que incluyen, entre otros: anticuerpos monoespecíficos o biespecíficos, tales como fragmentos Fv estabilizados con disulfuro, tándems scFv (fragmentos (SCFV)2), diacuerpos, tricuerpos o tetracuerpos, que normalmente están unidos covalentemente o estabilizados de otro modo (es decir, cremallera o hélice de leucina estabilizado) fragmentos scFv; y otros restos guiados incluyen, por ejemplo, aptámeros, receptores y proteínas de fusión.
- 45 50 En algunos aspectos, el resto guiado puede ser un anticuerpo unido a la superficie, lo que puede permitir el ajuste de la especificidad de direccionamiento celular. Esto es especialmente útil ya que se pueden generar anticuerpos altamente específicos contra un epítopo de interés para el sitio de direccionamiento deseado. En un aspecto, múltiples anticuerpos se expresan en la superficie de una célula y cada anticuerpo puede tener una especificidad diferente para un objetivo deseado. Tales enfoques pueden aumentar la avidez y la especificidad de las interacciones de guiado.
- 55 60 Un experto en la materia puede seleccionar cualquier resto guiado en función de la localización o función deseada de la célula, por ejemplo, un ligando de receptor de estrógeno, tal como el tamoxifeno, puede dirigir células a células de cáncer de mama dependientes de estrógeno que tienen un mayor número de receptores de estrógeno en la superficie celular. Otros ejemplos no limitativos de interacciones ligando/receptor incluyen CCRI (p. ej., para el tratamiento de tejidos articulares inflamados o cerebro en artritis reumatoide y/o esclerosis múltiple), CCR7, CCR8 (p. ej., dirigido a tejido de ganglios linfáticos), CCR6, CCR9, CCR10 (p. ej., para dirigirse al tejido intestinal), CCR4, CCR10 (p. ej., para dirigirse a la piel), CXCR4 (p. ej., para transmigración mejorada general), HCELL (p. ej., para el tratamiento de inflamación y trastornos inflamatorios, médula ósea), Alpha4beta7 (p. ej., para la orientación de la mucosa intestinal), VLA-4/VCAM-1 (p. ej., para la orientación del endotelio). En general, cualquier receptor implicado en la orientación (p. ej., metástasis de cáncer) puede aprovecharse para su uso en los procedimientos y composiciones descritos en este documento.

Mediadores de la muerte celular

En un aspecto, se puede usar una composición de molécula de ácido nucleico modificada para inducir la apoptosis en una célula (p. ej., una célula cancerosa) aumentando la expresión de un receptor de muerte, un ligando de receptor de muerte o una combinación de los mismos. Este procedimiento se puede utilizar para inducir la muerte celular en cualquier célula deseada y tiene una utilidad particular en el tratamiento del cáncer en el que las células escapan a las señales apoptóticas naturales.

- 5 La apoptosis puede ser inducida por múltiples vías de señalización independientes que convergen en un mecanismo efector final que consiste en múltiples interacciones entre varios "receptores de muerte" y sus ligandos, que pertenecen a la superfamilia de receptores/ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF). Los receptores de muerte mejor caracterizados son CD95 ("Fas"), TNFR1 (p55), receptor de muerte 3 (DR3 o Apo3/TRAMO), DR4 y DR5 (apo2-TRAIL-R2). El mecanismo efector final de la apoptosis puede ser la activación de una serie de proteínas denominadas caspasas. La activación de estas caspasas da como resultado la escisión de una serie de proteínas celulares vitales y la muerte celular. El mecanismo molecular de la apoptosis inducida por ligandos/receptores de muerte es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, la apoptosis mediada por Fas/FasL se induce mediante la unión de tres moléculas FasL que inducen la trimerización del receptor Fas a través de los dominios de muerte (DD) del extremo C, que a su vez recluta una proteína adaptadora FADD (proteína asociada a Fas con dominio de muerte) y Caspasa-8. La oligomerización de este complejo trimolecular, Fas/FAIDD/caspasa-8, da como resultado la escisión proteolítica de la proenzima caspasa-8 en caspasa-8 activa que, a su vez, inicia el proceso de apoptosis mediante la activación de otras caspasas aguas abajo a través de la proteólisis, incluida la caspasa-3. Los ligandos de muerte en general son apoptóticos cuando se forman en trímeros o estructuras de orden superior. Como monómeros, pueden servir como agentes antiapoptóticos al competir con los trímeros por unirse a los receptores de muerte.
- 10 En un aspecto, la composición de la molécula de ácido nucleico modificada codifica un receptor de muerte (p. ej., Fas, TRAIL, TRAMO, TNFR, TLR, etc.). Las células creadas para expresar un receptor de muerte por transfección de ARN modificado se vuelven susceptibles a la muerte inducida por el ligando que activa ese receptor. De manera similar, las células hechas para expresar un ligando de muerte, por ejemplo, en su superficie, inducirán la muerte de las células con el receptor cuando la célula transfectada entre en contacto con la célula diana. En otro aspecto, la composición de ARN modificado codifica un ligando de receptor de muerte (p. ej., FasL, TNF, etc.). En otro aspecto, la composición de ARN modificado codifica una caspasa (por ejemplo, caspasa 3, caspasa 8, caspasa 9, etc.). Cuando las células cancerosas presentan a menudo un fallo para diferenciarse apropiadamente a una forma no proliferativa o proliferativa controlada, en otro aspecto, la composición de ARN modificado sintética codifica tanto para un receptor de muerte como para su ligando activador apropiado. En otro aspecto, la composición de ARN modificado sintética codifica un factor de diferenciación que, cuando se expresa en la célula cancerosa, como una célula madre cancerosa, inducirá a la célula a diferenciarse a un fenotipo no patógeno o que no se auto-renueve (p. ej., tasa de crecimiento celular reducida, división celular reducida, etc.) o para inducir a la célula a entrar en una fase celular inactiva (p. ej., fase de reposo G₀).
- 15 En un aspecto, un experto en la técnica apreciará que el uso de técnicas inductoras de apoptosis puede requerir que las moléculas de ácido nucleico modificadas se dirijan apropiadamente a, por ejemplo, células tumorales para evitar la muerte celular generalizada no deseada. Por lo tanto, se puede usar un mecanismo de administración (p. ej., ligando o anticuerpo unido, liposoma dirigido, etc.) que reconozca un antígeno canceroso de modo que las moléculas de ácido nucleico modificadas se expresen solo en células cancerosas.
- 20 Un experto en la técnica apreciará que el uso de técnicas inductoras de apoptosis puede requerir que las moléculas de ácido nucleico modificadas se dirijan apropiadamente a, por ejemplo, células tumorales para evitar la muerte celular generalizada no deseada. Por lo tanto, se puede usar un mecanismo de administración (p. ej., ligando o anticuerpo unido, liposoma dirigido, etc.) que reconozca un antígeno canceroso de modo que las moléculas de ácido nucleico modificadas se expresen solo en células cancerosas.
- 25 Un experto en la técnica apreciará que el uso de técnicas inductoras de apoptosis puede requerir que las moléculas de ácido nucleico modificadas se dirijan apropiadamente a, por ejemplo, células tumorales para evitar la muerte celular generalizada no deseada. Por lo tanto, se puede usar un mecanismo de administración (p. ej., ligando o anticuerpo unido, liposoma dirigido, etc.) que reconozca un antígeno canceroso de modo que las moléculas de ácido nucleico modificadas se expresen solo en células cancerosas.
- 30 Un experto en la técnica apreciará que el uso de técnicas inductoras de apoptosis puede requerir que las moléculas de ácido nucleico modificadas se dirijan apropiadamente a, por ejemplo, células tumorales para evitar la muerte celular generalizada no deseada. Por lo tanto, se puede usar un mecanismo de administración (p. ej., ligando o anticuerpo unido, liposoma dirigido, etc.) que reconozca un antígeno canceroso de modo que las moléculas de ácido nucleico modificadas se expresen solo en células cancerosas.
- 35 Un experto en la técnica apreciará que el uso de técnicas inductoras de apoptosis puede requerir que las moléculas de ácido nucleico modificadas se dirijan apropiadamente a, por ejemplo, células tumorales para evitar la muerte celular generalizada no deseada. Por lo tanto, se puede usar un mecanismo de administración (p. ej., ligando o anticuerpo unido, liposoma dirigido, etc.) que reconozca un antígeno canceroso de modo que las moléculas de ácido nucleico modificadas se expresen solo en células cancerosas.
- 40 Un experto en la técnica apreciará que el uso de técnicas inductoras de apoptosis puede requerir que las moléculas de ácido nucleico modificadas se dirijan apropiadamente a, por ejemplo, células tumorales para evitar la muerte celular generalizada no deseada. Por lo tanto, se puede usar un mecanismo de administración (p. ej., ligando o anticuerpo unido, liposoma dirigido, etc.) que reconozca un antígeno canceroso de modo que las moléculas de ácido nucleico modificadas se expresen solo en células cancerosas.
- 45 Kits y dispositivos

Kits

- 50 La descripción proporciona una variedad de kits para llevar a cabo de forma conveniente y/o eficaz los procedimientos de la presente descripción. Típicamente, los kits comprenderán cantidades y/o cantidades suficientes de componentes para permitir que un usuario realice múltiples tratamientos de un sujeto(s) y/o realice múltiples experimentos.
- 55 En un aspecto, la presente descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una primera molécula de ácido nucleico modificada o ARNm que comprende una región traducible. El kit puede comprender además un envase e instrucciones y/o un agente de administración para formar una composición de formulación. El agente de suministro puede comprender una solución salina, una solución tamponada, un lípidoide o cualquier agente de suministro descrito en este documento.
- 60 En un aspecto, la solución tampón puede incluir cloruro de sodio, cloruro de calcio, fosfato y/o EDTA. En otro aspecto, la solución tampón puede incluir, entre otros, solución salina, solución salina con calcio 2 mM, sacarosa al 5 %, sacarosa al 5 % con calcio 2 mM, manitol al 5 %, manitol al 5 % con calcio 2 mM, lactato de Ringer, cloruro de sodio, cloruro de sodio con calcio 2 mM y manosa (Véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. n.º 20120258046). En otro

aspecto, las soluciones tampón pueden precipitarse o pueden liofilizarse. La cantidad de cada componente puede variar para permitir formulaciones de tampón simples o de concentración salina más elevada reproducible, consistente. Los componentes también se pueden variar para aumentar la estabilidad de las moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm en la solución tampón durante un período de tiempo y/o bajo una variedad de condiciones.

- 5 En un aspecto, la presente descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden: una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm que comprende una región traducible, proporcionado en una cantidad eficaz para producir una cantidad deseada de una proteína codificada por la región traducible cuando se introduce en una célula diana; una segunda molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm que comprende un ácido nucleico inhibidor, proporcionado en una cantidad eficaz para inhibir sustancialmente la respuesta inmunitaria innata de la célula; y empaquetado e instrucciones.
- 10 En un aspecto, la presente descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm que comprende una región traducible donde el ácido nucleico presenta degradación reducida por una nucleasa celular y envasado e instrucciones.

- 15 En un aspecto, la presente descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm que comprende una región traducible donde el ácido nucleico presenta degradación reducida por una nucleasa celular, y una célula de mamífero adecuada para la traducción de la 20 región traducible del primer ácido nucleico.

Dispositivos

- 25 La presente descripción proporciona dispositivos que pueden incorporar moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNmm que codifican polipéptidos de interés. Estos dispositivos contienen en una formulación estable los reactivos para sintetizar un ácido nucleico en una formulación disponible para ser suministrado inmediatamente a un sujeto que lo necesite, tal como un paciente humano. Los ejemplos no limitantes de tal polipéptido de interés incluyen un factor de crecimiento y/o estimulador de la angiogénesis para la cicatrización de heridas, un antibiótico peptídico para facilitar el control de infecciones y un antígeno para estimular rápidamente una respuesta inmunitaria a un virus recién identificado.

- 30 En algunos aspectos, el dispositivo es autónomo y, opcionalmente, puede tener acceso remoto inalámbrico para obtener instrucciones para la síntesis y/o el análisis de la molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm generado. El dispositivo es capaz de realizar la síntesis móvil de al menos una molécula de ácido nucleico modificado o ARNmm y preferiblemente un número ilimitado de diferentes moléculas de ácido nucleico modificado o ARNmm. En ciertos aspectos, el dispositivo puede ser transportado por uno o un pequeño número de individuos. En otros aspectos, el dispositivo se escala para caber en una mesa de trabajo o escritorio. En otros aspectos, el dispositivo está dimensionado para caber en una maleta, mochila u objeto de tamaño similar.

- 35 40 En otro aspecto, el dispositivo puede ser un punto de atención o un dispositivo portátil. En otros aspectos, el dispositivo se escala para encajar en un vehículo tal como un coche, camión o ambulancia, o un vehículo militar tal como un tanque o un vehículo de transporte de personal. La información necesaria para generar un polipéptido de interés que codifica el ARNm modificado está presente en un medio legible por ordenador presente en el dispositivo.

- 45 En un aspecto, se puede usar un dispositivo para evaluar los niveles de una proteína que se ha administrado en forma de un ácido nucleico modificado o ARNmm. El dispositivo puede comprender una prueba de sangre, orina u otra biofluídica.

- 50 En algunos aspectos, el dispositivo es capaz de comunicarse (por ejemplo, comunicación inalámbrica) con una base de datos de secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos. El dispositivo contiene al menos un bloque de muestra para la inserción de uno o más recipientes de muestra. Dichos recipientes de muestra son capaces de aceptar en líquido o en otra forma cualquier número de materiales tales como ADN molde, nucleótidos, enzimas, tampones y otros reactivos. Los recipientes de muestra también pueden calentarse y enfriarse por contacto con el bloque de muestra. El bloque de muestra generalmente está en comunicación con una base de dispositivo con una o más unidades de control electrónico para el al menos un bloque de muestra. El bloque de muestra contiene preferiblemente un módulo de calentamiento, tal molécula de calentamiento capaz de calentar y/o enfriar los recipientes de muestra y su contenido a temperaturas entre aproximadamente -20 °C y por encima de +100 °C. La base del dispositivo está en comunicación con un suministro de voltaje tal como una batería o un suministro de voltaje externo. El dispositivo también contiene medios para almacenar y distribuir los materiales para la síntesis de ARN.

- 55 60 Opcionalmente, el bloque de muestra contiene un módulo para separar los ácidos nucleicos sintetizados. Alternativamente, el dispositivo contiene un módulo de separación vinculado operativamente al bloque de muestras.

Preferiblemente, el dispositivo contiene un medio para el análisis del ácido nucleico sintetizado. Tal análisis incluye la identidad de la secuencia (demostrada, por ejemplo, mediante hibridación), la ausencia de secuencias no deseadas, la medición de la integridad del ARNm sintetizado (por ejemplo, mediante viscosimetría microfluídica combinada con espectrofotometría) y la concentración y/o potencia del ARN modificado (por ejemplo, mediante espectrofotometría).

- 5 En ciertos aspectos, el dispositivo se combina con un medio para la detección de patógenos presentes en un material biológico obtenido de un sujeto, por ejemplo, el sistema IBIS PLEX-ID (Abbott, Abbott Park, IL) para la identificación micobiana.
- 10 Los dispositivos adecuados para su uso en la administración de composiciones farmacéuticas intradérmicas descritas en este documento incluyen dispositivos de agujas cortas tales como los descritos en las patentes de EE.UU. 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; y 5.417.662.
- 15 Las composiciones intradérmicas pueden administrarse mediante dispositivos que limitan la longitud de penetración efectiva de una aguja en la piel, tales como los descritos en la publicación PCT WO 99/34850 y equivalentes funcionales de la misma. Son adecuados los dispositivos de inyección por chorro que suministran composiciones líquidas a la dermis a través de un inyector por chorro de líquido y/o a través de una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que llega a la dermis. Los dispositivos de inyección por chorro se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. 5.480.381; 5.599.302; 5.334.144; 5.993.412; 5.649.912; 5.569.189; 5.704.911; 5.383.851; 5.893.397; 5.466.220; 5.339.163; 5.312.335; 5.503.627; 5.064.413; 5.520.639; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 4.940.460; y publicaciones PCT WO 97/37705 y WO 97/13537;
- 20 Son adecuados los dispositivos balísticos de administración de polvo/particulas que utilizan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel hasta la dermis. Como alternativa o adicionalmente, se pueden usar jeringas convencionales en el procedimiento clásico de administración intradérmica de mantoux.
- 25 Son adecuados los dispositivos balísticos de administración de polvo/particulas que utilizan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel hasta la dermis. Como alternativa o adicionalmente, se pueden usar jeringas convencionales en el procedimiento clásico de administración intradérmica de mantoux.
- 30 En algunos aspectos, el dispositivo puede ser una bomba o comprender un catéter para la administración de compuestos o composiciones a través de la barrera hematoencefálica. Tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, un dispositivo de suministro olfativo presurizado, dispositivos de iontoporesis, dispositivos microfluídicos multicapa y similares. Tales dispositivos pueden ser portátiles o estacionarios. Pueden ser implantables o anclados externamente al cuerpo o combinaciones de los mismos.
- 35 Pueden emplearse dispositivos para la administración para administrar las moléculas de ácido nucleico modificadas o el ARNm de acuerdo con los regímenes de dosificación individuales, múltiples o divididos que se enseñan en este documento. Tales dispositivos se describen a continuación.
- 40 Los procedimientos y dispositivos conocidos en la técnica para la administración múltiple a células, órganos y tejidos se contemplan para su uso junto con los procedimientos y composiciones descritos en este documento como aspectos. Estos incluyen, por ejemplo, aquellos procedimientos y dispositivos que tienen múltiples agujas, dispositivos híbridos que emplean, por ejemplo, lúmenes o catéteres, así como dispositivos que utilizan calor, corriente eléctrica o mecanismos impulsados por radiación.
- 45 Según la presente descripción, estos dispositivos de administración múltiple pueden utilizarse para administrar las dosis únicas, múltiples o fraccionadas contempladas en este documento.
- 50 Un procedimiento para administrar agentes terapéuticos a un tejido sólido ha sido descrito por Bahrami y col. y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense 20110230839. Según Bahrami, se incorpora un conjunto de agujas en un dispositivo que administra una cantidad sustancialmente igual de fluido en cualquier lugar de dicho tejido sólido a lo largo de la longitud de cada aguja.
- 55 Kodgule y col. han descrito un dispositivo para el suministro de material biológico a través del tejido biológico y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20110172610. Según Kodgule, se incorporan al dispositivo múltiples microagujas huecas hechas de uno o más metales y que tienen diámetros exteriores de aproximadamente 200 micras a aproximadamente 350 micras y longitudes de al menos 100 micras que liberan péptidos, proteínas, carbohidratos, moléculas de ácido nucleico, lípidos y otros ingredientes farmacéuticamente activos o combinaciones de los mismos.
- 60 Una sonda de administración para administrar un agente terapéutico a un tejido ha sido descrita por Gunday y col. y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20110270181. Según Gunday, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que mueve las cápsulas unidas entre una posición activada y una posición inactiva para forzar el agente fuera de las cápsulas a través de las agujas.

Assaf ha descrito un aparato médico de inyección múltiple y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20110218497. Según Assaf, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que tiene una cámara conectada a una o más de dichas agujas y unos medios para llenar continuamente la cámara con el fluido médico después de cada inyección.

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico modificado o ARNm se administra por vía subcutánea o intramuscular a través de al menos 3 agujas a tres sitios diferentes, opcionalmente adyacentes, simultáneamente, o dentro de un período de 60 minutos (por ejemplo, administración a 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sitios simultáneamente o dentro de un período de 60 minutos). Las dosis fraccionadas se pueden administrar simultáneamente al tejido adyacente utilizando los dispositivos descritos en las publicaciones de patentes de EE. UU. n.º 20110230839 y 20110218497.

Forsell ha descrito un sistema al menos parcialmente implantable para inyectar una sustancia en el cuerpo de un paciente, en particular un sistema de estimulación de la erección del pene y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20110196198. Según Forsell, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que se implanta junto con uno o más alojamientos adyacentes a los cuerpos cavernosos izquierdo y derecho del paciente. También se implantan un depósito y una bomba para suministrar fármacos a través de las agujas.

Berenson ha descrito un procedimiento para la administración transdérmica de una cantidad terapéuticamente eficaz de hierro y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. Según Berenson, se pueden usar múltiples agujas para crear múltiples microcanales en el estrato córneo para mejorar la administración transdérmica. del hierro iónico en un parche iontoporético.

Kodgule y col. han descrito un procedimiento para administrar material biológico a través del tejido biológico y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20110196308. Según Kodgule, se incorporan múltiples microagujas biodegradables que contienen un ingrediente activo terapéutico en un dispositivo que administra proteínas, carbohidratos, moléculas de ácido nucleico, lípidos y otros ingredientes farmacéuticamente activos o combinaciones de los mismos.

Donovan ha descrito un parche transdérmico que comprende una composición de toxina botulínica y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20080220020. Según Donovan, se incorporan múltiples agujas en el parche que administra la toxina botulínica debajo del estrato córneo a través de dichas agujas que se proyectan a través del estrato córneo de la piel sin romper un vaso sanguíneo.

Se puede colocar sobre la piel un pequeño reservorio de medicamento desechable, o bomba de parche, que puede contener aproximadamente de 0,2 a 15 ml de formulaciones líquidas y administrar la formulación de forma continua por vía subcutánea utilizando un pequeño orificio necesario (p. ej., calibre 26 a 34) . Como ejemplos no limitativos, la bomba de parche puede ser de 50 mm por 76 mm por 20 mm accionada por resorte con una aguja de calibre 30 a 34 (BD™ Microinfuser, Franklin Lakes NJ), 41 mm por 62 mm por 17 mm con un reservorio de 2 mL utilizado para la administración de fármacos tales como la insulina (OMNIPOD®, Insulet Corporation Bedford, MA), o 43-60 mm de diámetro, 10 mm de espesor con un reservorio de 0,5 a 10 ml (PATCHPUMP®, SteadyMed Therapeutics, San Francisco, CA). Además, la bomba de parche puede ser alimentada por batería y/o recargable.

Toubia ha descrito una sonda criogénica para la administración de un agente activo en una ubicación de tratamiento criogénico y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20080140061. Según Toubia, se incorporan múltiples agujas a la sonda que recibe el agente activo en una cámara y administra el agente al tejido.

Stock y col han descrito un procedimiento para tratar o prevenir la inflamación o promover la salud de las articulaciones y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20090155186. Según Stock, se incorporan múltiples agujas en un dispositivo que administra composiciones que contienen compuestos moduladores de la transducción de señales.

Un sistema de inyección multi-sitio ha sido descrito por Kimmell y col. y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20100256594. Según Kimmell, se incorporan múltiples agujas en un dispositivo que administra un medicamento en un estrato córneo a través de las agujas.

Dekker y col. han descrito un procedimiento para administrar interferones al compartimento intradérmico. y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20050181033. Según Dekker, múltiples agujas que tienen una salida con una altura expuesta entre 0 y 1 mm se incorporan a un dispositivo que mejora la farmacocinética y la biodisponibilidad al administrar la sustancia a una profundidad entre 0,3 mm y 2 mm.

Desai ha descrito un procedimiento para administrar genes, enzimas y agentes biológicos a células tisulares y se

enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20030073908. Según Desai, se incorporan múltiples agujas en un dispositivo que se inserta en un cuerpo y administra un fluido de medicación a través de dichas agujas.

5 Lee y col. han descrito un procedimiento para tratar arritmias cardíacas con células de fibroblastos y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20040005295. Según Lee, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que administra células de fibroblastos en la región local del tejido.

Shachar y col. han descrito un procedimiento que usa una bomba controlada magnéticamente para tratar un tumor cerebral y se enseña, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. 7.799.012 (procedimiento) y 7.799.016 (dispositivo).

10 Según Shachar, se incorporaron múltiples agujas a la bomba que empuja un agente medicante a través de las agujas a un ritmo controlado.

Los procedimientos para tratar los trastornos funcionales de la vejiga en hembras de mamífero han sido descritos por Versi y col. y se enseñan, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 8.029.496. Según Versi, se incorpora una matriz de 15 micro-agujas en un dispositivo que administra un agente terapéutico a través de las agujas directamente al trigono de la vejiga.

Un dispositivo de transporte transdérmico de micro-agujas ha sido descrito por Angel y col. y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 7.364.568. Según Angel, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que transporta una

20 sustancia a la superficie del cuerpo a través de las agujas que se insertan en la superficie desde diferentes direcciones. El dispositivo de transporte transdérmico de micro-agujas puede ser un sistema sólido de micro-agujas o un sistema hueco de micro-agujas. Como ejemplo no limitativo, el sistema de micro-agujas sólidas puede tener una capacidad de hasta 0,5 mg, con 300-1500 micro-agujas sólidas por cm² de aproximadamente 150-700 µm de altura recubiertas con un fármaco. Las micro-agujas penetran en el estrato córneo y permanecen en la piel durante un breve período (por

25 ejemplo, de 20 segundos a 15 minutos). En otro ejemplo, el sistema de micro-agujas huecas tiene una capacidad de hasta 3 ml para administrar formulaciones líquidas usando 15-20 micro-agujas por cm² con una altura aproximada de 950 µm. Las micro-agujas penetran en la piel para permitir que las formulaciones líquidas fluyan desde el dispositivo hacia la piel. El sistema de micro-agujas huecas se puede usar de 1 a 30 minutos dependiendo del volumen y la viscosidad de la formulación.

30 Un dispositivo para infusión subcutánea ha sido descrito por Dalton y col. y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 7.150.726. Según Dalton, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que suministra fluido a través de las agujas a un tejido subcutáneo.

35 Un dispositivo y un procedimiento para la administración intradérmica de vacunas y agentes terapéuticos génicos a través de microcánulas han sido descritos por Mikszta y col. y se enseñan, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 7.473.247. Según Mikszta, se incorpora al menos una micro-aguja hueca en el dispositivo que administra las vacunas a la piel del sujeto a una profundidad de entre 0,025 mm y 2 mm.

40 Pettis y col. han descrito un procedimiento para administrar insulina y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 7.722.595. Según Pettis, se incorporan dos agujas en un dispositivo en el que ambas agujas se insertan esencialmente simultáneamente en la piel con la primera a una profundidad de menos de 2,5 mm para administrar insulina al compartimento intradérmico y la segunda a una profundidad de más de 2,5 mm y menos de 5,0 mm para administrar insulina al compartimento subcutáneo.

45 La administración de inyecciones cutáneas bajo succión ha sido descrita por Kochamba y col. y se enseña, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 6.896.666. Según Kochamba, múltiples agujas en relativa adyacencia entre sí se incorporan a un dispositivo que inyecta un fluido debajo de la capa cutánea.

50 Down y col. han descrito un dispositivo para extraer o administrar una sustancia a través de la piel y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 6.607.513. Según Down, los múltiples miembros de penetración en la piel que se incorporan al dispositivo tienen longitudes de aproximadamente 100 micras a aproximadamente 2000 micras y tienen un calibre de aproximadamente 30 a 50.

55 Palmer y col. han descrito un dispositivo para suministrar una sustancia a la piel y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 6.537.242. Según Palmer, se incorpora una matriz de micro-agujas en el dispositivo que utiliza un conjunto de estiramiento para mejorar el contacto de las agujas con la piel y proporciona una administración más uniforme de la sustancia.

60 Zamoyski ha descrito un dispositivo de perfusión para la administración localizada de fármacos y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 6.468.247. Según Zamoyski, se incorporan múltiples agujas hipodérmicas al dispositivo que inyecta el contenido de las agujas hipodérmicas en un tejido a medida que se retraen dichas agujas

hipodérmicas.

Prausnitz y col. han descrito un procedimiento para mejorar el transporte de fármacos y moléculas biológicas a través del tejido mejorando la interacción entre las micro-agujas y la piel humana y se enseña, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 6.743.211. Según Prausnitz, se incorporan múltiples micro-agujas en un dispositivo que es capaz de presentar una superficie más rígida y menos deformable sobre la que se aplican las micro-agujas.

Ting y col. han descrito un dispositivo para la administración intraorgánica de agentes medicinales y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 6.077.251. Según Ting, se incorporan múltiples agujas que tienen aperturas laterales para mejorar la administración en un dispositivo que, al extender y retraer dichas agujas desde y hacia la cámara de la aguja, fuerza un agente medicinal desde un reservorio hacia dichas agujas e inyecta dicho agente medicinal en un órgano diana.

Brown ha descrito un porta agujas múltiple y un puerto de infusión subcutáneo de múltiples canales y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 4.695.273. Según Brown, múltiples agujas en el porta agujas se insertan a través del septo del puerto de infusión y se comunican con cámaras aisladas en dicho puerto de infusión.

Horn ha descrito una jeringa hipodérmica doble y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 3.552.391. Según Horn, dos agujas incorporadas en el dispositivo están separadas menos de 68 mm y pueden ser de diferentes estilos y longitudes, lo que permite realizar inyecciones a diferentes profundidades.

Hershberg ha descrito una jeringa con múltiples agujas y múltiples compartimentos de fluidos y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 3.572.336. Según Hershberg, se incorporan múltiples agujas a la jeringa que tiene múltiples compartimentos de fluidos y es capaz de administrar simultáneamente fármacos incompatibles que no se pueden mezclar para una sola inyección.

Un instrumento quirúrgico para la inyección intradérmica de fluidos ha sido descrito por Eliscu y col. y se enseña, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 2.588.623. Según Eliscu, se incorporan múltiples agujas al instrumento que inyecta fluidos por vía intradérmica con una dispersión más amplia.

Hung ha descrito un aparato para la administración simultánea de una sustancia a múltiples conductos de leche materna y se enseña, por ejemplo, en el documento EP 1818017. Según Hung, se incorporan múltiples lúmenes en el dispositivo que se inserta a través de los orificios de las redes ductales y administra un fluido a las redes ductales.

Tkebuchava ha descrito un catéter para la introducción de medicamentos en el tejido de un corazón u otros órganos y se enseña, por ejemplo, en el documento WO2006138109. Según Tkebuchava, se incorporan dos agujas curvas que penetran en la pared del órgano en una trayectoria aplanada.

Los dispositivos para administrar agentes médicos han sido descritos por Mckay y col. y se enseñan, por ejemplo, en el documento WO2006118804. Según Mckay, se incorporan múltiples agujas con múltiples orificios en cada aguja a los dispositivos para facilitar la administración regional a un tejido, tal como el espacio discal interior de un disco espinal.

Pettis ha descrito un procedimiento para administrar directamente una sustancia inmunomoduladora en un espacio intradérmico dentro de la piel de un mamífero y se enseña, por ejemplo, en el documento WO200402001. Según Pettis, se incorporan múltiples agujas en un dispositivo que administra la sustancia a través de las agujas a una profundidad de entre 0,3 mm y 2 mm.

Pettis y col. han descrito procedimientos y dispositivos para la administración de sustancias en al menos dos compartimentos de la piel para absorción sistémica y farmacocinética mejorada y se enseñan, por ejemplo, en el documento WO2003094995. Según Pettis, múltiples agujas que tienen longitudes entre alrededor de 300 µm y alrededor de 5 mm se incorporan en un dispositivo que se administra a los compartimentos de tejido intradérmico y subcutáneo simultáneamente.

Un dispositivo de administración de fármacos con agujas y un rodillo ha sido descrito por Zimmerman y col. y se enseña, por ejemplo, en el documento WO2012006259. Según Zimmerman, múltiples agujas huecas colocadas en un rodillo se incorporan al dispositivo que suministra el contenido en un depósito a través de las agujas a medida que gira el rodillo.

Se conoce en la técnica un dispositivo de suministro de fármacos tal como un stent y se enseña, por ejemplo, en las publicaciones de EE. UU. N.º US20060020329, US20040172127 y US20100161032. Las formulaciones de las

moléculas de ácido nucleico modificadas y el ARNmm descritos en este documento pueden administrarse usando stents. Además, los stents usados en este documento pueden ser capaces de administrar múltiples moléculas de ácido nucleico modificado y/o formulaciones a la misma velocidad de administración o a velocidades diferentes. Ejemplos no limitativos de fabricantes de stents incluyen CORDIS® (Miami, FL) (CYPHER®), Boston Scientific Corporation (Natick, MA) (TAXUS®), Medtronic (Minneapolis, MN) (ENDEAVOUR®) y Abbott (Abbott Park, IL) (XIENCE V®).

Procedimientos y dispositivos que utilizan catéteres y/o lúmenes

10 Pueden emplearse procedimientos y dispositivos que usan catéteres y lúmenes para administrar el ARNmm en un programa de dosificación único, múltiple o dividido. Tales procedimientos y dispositivos se describen a continuación.

15 Jacoby y col. han descrito un suministro basado en catéter de mioblastos esqueléticos al miocardio de corazones dañados y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20060263338. Según Jacoby, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo, al menos una parte de las cuales se inserta en un vaso sanguíneo y administra la composición celular a través de las agujas en la región localizada del corazón del sujeto.

20 Deem y col. han descrito un aparato para tratar el asma usando neurotoxina y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE.UU. 20060225742. Según Deem, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que suministra neurotoxina a través de las agujas al tejido bronquial.

25 Nayak ha descrito un procedimiento para administrar terapias de componentes múltiples y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 7.699.803. Según Nayak, se pueden incorporar múltiples cánulas de inyección en un dispositivo en el que se pueden incluir ranuras de profundidad para controlar la profundidad a la que se administra la sustancia terapéutica dentro del tejido.

30 McIntyre y col. han descrito un dispositivo quirúrgico para extirpar un canal y administrar al menos un agente terapéutico en una región deseada del tejido y se enseña, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 8.012.096. Según McIntyre, se incorporan múltiples agujas al dispositivo que dispensa un agente terapéutico en una región de tejido que rodea el canal y es particularmente adecuado para operaciones de revascularización transmiocárdica.

35 Versi y col. han descrito procedimientos para tratar trastornos funcionales de la vejiga en hembras de mamíferos y se enseñan, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 8.029.496. Según Versi, se incorpora una matriz de micro-agujas en un dispositivo que administra un agente terapéutico a través de las agujas directamente al trígono de la vejiga.

40 Yeshurun y col. han descrito un dispositivo y un procedimiento para suministrar fluidos a una barrera biológica flexible y se enseñan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. 7.998.119 (dispositivo) y 8.007.466 (procedimiento). Según Yeshurun, las micro-agujas del dispositivo penetran y se extienden dentro de la barrera biológica flexible y se inyecta fluido a través del orificio de las micro-agujas huecas.

45 Un procedimiento para inyectar epicárdicamente una sustancia en un área de tejido de un corazón que tiene una superficie epicárdica y está dispuesta dentro de un torso ha sido descrito por Bonner y col. y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 7.628.780. Según Bonner, los dispositivos tienen ejes alargados y cabezales de inyección distales para introducir agujas en el tejido e inyectar agentes médicos en el tejido a través de las agujas.

50 Un dispositivo para sellar una punción ha sido descrito por Nielsen y col. y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 7.972.358. Según Nielsen, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que administra un agente de cierre en el tejido que rodea el tracto de punción.

55 Chiu y col. han descrito un procedimiento para la miogénesis y la angiogénesis y se enseña, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 6.551.338. Según Chiu, se incorporan de 5 a 15 agujas que tienen un diámetro máximo de al menos 1,25 mm y una longitud efectiva para proporcionar una profundidad de punción de 6 a 20 mm en un dispositivo que se inserta en la proximidad de un miocardio y suministra un factor angiogénico o miogénico exógeno a dicho miocardio a través de los conductos que se encuentran en al menos algunas de dichas agujas.

60 Un procedimiento para el tratamiento del tejido prostático ha sido descrito por Bolmsj y col. y se enseña, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 6.524.270. Según Bolmsj, un dispositivo que comprende un catéter que se inserta a través de la uretra tiene al menos una punta hueca extensible hacia el tejido prostático circundante. Se administra un medicamento astringente y analgésico a través de dicha punta en dicho tejido prostático.

60 Un procedimiento para infundir fluidos a un sitio intraóseo ha sido descrito por Findlay y col. y se enseña, por ejemplo,

en la patente de EE. UU. 6.761.726. Según Findlay, se incorporan múltiples agujas en un dispositivo que es capaz de penetrar una cubierta dura de material cubierta por una capa de material blando y suministra un fluido a una distancia predeterminada por debajo de dicha cubierta dura de material.

- 5 Un dispositivo para inyectar medicamentos en la pared de un vaso ha sido descrito por Vigil y col. y se enseña, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.713.863. Según Vigil, se montan múltiples inyectores en cada uno de los tubos flexibles del dispositivo que introduce un fluido de medicación a través de un catéter de múltiples lúmenes, dentro de dichos tubos flexibles y fuera de dichos inyectores para su infusión en la pared del vaso.
- 10 Faxon y col. han descrito un catéter para administrar agentes terapéuticos y/o de diagnóstico al tejido que rodea un pasaje corporal y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 5.464.395. Según Faxon, se incorpora al catéter al menos una cánula de aguja que suministra los agentes deseados al tejido a través de dichas agujas que sobresalen del catéter.
- 15 Orr ha descrito catéteres con globo para administrar agentes terapéuticos y se enseñan, por ejemplo, en el documento WO2010024871. Según Orr, se incorporan múltiples agujas en los dispositivos que administran los agentes terapéuticos a diferentes profundidades dentro del tejido. En otro aspecto, se pueden usar globos liberadores de fármacos para administrar las formulaciones descritas en este documento. Los globos liberadores de fármacos se pueden utilizar en aplicaciones de lesiones diana tales como, entre otras, reestenosis en el stent, tratamiento de lesiones en vasos tortuosos, lesiones de bifurcación, lesiones femorales/poplíticas y lesiones debajo de la rodilla.
- 20

Un dispositivo para administrar agentes terapéuticos (p. ej., moléculas de ácido nucleico modificadas o ARNm) al tejido dispuesto alrededor de una luz ha sido descrito por Perry y col. y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. US20100125239. Según Perry, el catéter tiene un globo que puede recubrirse con un agente terapéutico mediante procedimientos conocidos en la técnica y descritos en Perry. Cuando el globo se expande, el agente terapéutico entrará en contacto con el tejido circundante. El dispositivo puede tener adicionalmente una fuente de calor para cambiar la temperatura del revestimiento del globo para liberar el agente terapéutico al tejido.

- Procedimientos y dispositivos que utilizan corriente eléctrica
- 30 Se pueden emplear procedimientos y dispositivos que utilizan corriente eléctrica para administrar el ARNm de acuerdo con los regímenes de dosificación individuales, múltiples o divididos que se enseñan en este documento. Tales procedimientos y dispositivos se describen a continuación.
- 35 Márquez ha descrito un dispositivo de terapia de inducción de electrocolágeno y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20090137945.
- 40 Según Márquez, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que perforan repetidamente la piel y extraen de la piel una porción de la sustancia que se aplica primero a la piel.
- 45 Un sistema electrocinético ha sido descrito por Etheredge y col. y se enseña, por ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. 20070185432. Según Etheredge, las micro-agujas se incorporan a un dispositivo que impulsa el medicamento mediante una corriente eléctrica a través de las agujas hacia el sitio de tratamiento objetivo.
- 50 Un dispositivo de iontoporesis ha sido descrito por Matsumura y col. y se enseña, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 7.437.189. Según Matsumura, se incorporan múltiples agujas en el dispositivo que es capaz de administrar fármacos ionizables en un cuerpo vivo a mayor velocidad o con mayor eficiencia.
- 55 La administración intradérmica de agentes biológicamente activos mediante inyección sin aguja y electroporación ha sido descrita por Hoffmann y col. y se enseña, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 7.171.264. Según Hoffmann, se incorporan uno o más inyectores sin aguja en un dispositivo de electroporación y la combinación de inyección sin aguja y electroporación es suficiente para introducir el agente en las células de la piel, el músculo o la mucosa.
- 60 Un procedimiento para el suministro intracelular mediado por electroporación ha sido descrito por Lundkvist y col. y se enseña, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 6.625.486. Según Lundkvist, se incorpora un par de electrodos de aguja en un catéter. Dicho catéter se coloca en un lumen del cuerpo seguido de la extensión de dichos electrodos de aguja para penetrar en el tejido que rodea dicho lumen. A continuación, el dispositivo introduce un agente a través de al menos uno de dichos electrodos de aguja y aplica un campo eléctrico mediante dicho par de electrodos de aguja para permitir que dicho agente pase a través de las membranas celulares hacia las células en el sitio de tratamiento.
- Levin y col. han descrito un sistema de administración para la inmunización transdérmica y se enseña, por ejemplo,

en el documento WO2006003659. Según Levin, se incorporan múltiples electrodos en el dispositivo que aplica energía eléctrica entre los electrodos para generar microcanales en la piel para facilitar la administración transdérmica.

Schomacker ha descrito un procedimiento para administrar energía de RF en la piel y se enseña, por ejemplo, en el documento WO2011163264. Según Schomacker, se incorporan múltiples agujas en un dispositivo que aplica vacío para hacer que la piel entre en contacto con una placa, de modo que las agujas se inserten en la piel a través de los orificios de la placa y emitan energía de radiofrecuencia.

Definiciones

En diversos lugares de la presente memoria descriptiva, se describen sustituyentes de compuestos de la presente descripción en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que la presente descripción incluya todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de tales grupos e intervalos. Por ejemplo, se pretende específicamente que el término "alquilo C₁₋₆" describa individualmente metilo, etilo, alquilo C₃, alquilo C₄, alquilo C₅ y alquilo C₆.

Acerca de: Como se usa en esta invención, el término "aproximadamente" significa +/- 10 % del valor mencionado.

Administrado en combinación: Como se usa en esta invención, el término "administrado en combinación" o "administración combinada" significa que dos o más agentes (por ejemplo, un ácido nucleico modificado o ARNmm que codifica un polipéptido anti-microbiano (por ejemplo, un polipéptido anti-bacteriano), por ejemplo, un polipéptido anti-microbiano descrito en este documento y un agente anti-microbiano (por ejemplo, un polipéptido anti-microbiano o un compuesto anti-microbiano de molécula pequeña descrito en este documento)) se administran a un sujeto al mismo tiempo o dentro de un intervalo tal que puede haber una superposición de un efecto de cada agente en el paciente. En algunos aspectos, se administran dentro de aproximadamente 60, 30, 15, 10, 5 o 1 minuto entre sí. En algunos aspectos, las administraciones de los agentes están suficientemente separadas entre sí de manera que se logra un efecto combinatorio (*por ejemplo*, un efecto sinérgico).

Animal: Como se usa en esta invención, el término «animal» se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunos aspectos, "animal" se refiere a los seres humanos en cualquier etapa del desarrollo. En algunos aspectos, "animal" se refiere a animales no humanos en cualquier etapa del desarrollo. En determinados aspectos, el animal no humano es un mamífero (p. ej., un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, un ganado, un primate o un cerdo). En algunos aspectos, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y gusanos. En algunos aspectos, el animal es un animal transgénico, un animal modificado genéticamente o un clon.

Antígenos de interés o antígenos deseados: Como se usa en esta invención, los términos "antígenos de interés" o "antígenos deseados" incluyen aquellas proteínas y otras biomoléculas proporcionadas en esta invención que están inmunoespecíficamente unidas por los anticuerpos y fragmentos, mutantes, variantes y alteraciones de estos descritos en esta invención. Los ejemplos de antígenos de interés incluyen, pero no se limitan a, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina, hGH, tPA, citocinas, tales como interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón (IFN) alfa, IFN beta, IFN gamma, IFN omega o IFN tau, factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF alfa y TNF beta, TNF gamma, TRAIL; G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 y VEGF.

Aproximadamente: Como se usa en esta invención, el término "aproximadamente" o "alrededor de", 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 determinados aspectos, 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 o menor que) del valor de referencia establecido a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto (excepto cuando dicha cantidad excede el 100 % de un valor posible).

Asociado a: como se usan en esta invención, los términos "asociado con", "conjugado", "enlazado", "unido" y "atado", cuando se usan con respecto a dos o más restos, significa que los restos están físicamente asociados o conectados entre sí, ya sea directamente o a través de uno o más restos adicionales que sirven como un agente de enlace, para formar una estructura que es lo suficientemente estable para que los restos permanezcan físicamente asociados en las condiciones en las que se usa la estructura, *por ejemplo*, condiciones fisiológicas. Una "asociación" no necesita ser estrechamente a través de enlace químico covalente directo. También puede sugerir un enlace iónico o de hidrógeno o una conectividad basada en hibridación lo suficientemente estable de modo que las entidades "asociadas" permanezcan físicamente asociadas.

- Bifuncional: como se usa en esta invención, el término "bifuncional" se refiere a cualquier sustancia, molécula o resto que es capaz de o mantiene al menos dos funciones. Las funciones pueden efectuar el mismo resultado o un resultado diferente. La estructura que produce la función puede ser la misma o diferente. Por ejemplo, el ARN modificado bifuncional puede codificar un péptido citotóxico (una primera función) mientras que los nucleósidos que comprenden el ARN codificante son, por sí mismos, citotóxicos (segunda función). En este ejemplo, la administración del ARN modificado bifuncional a una célula cancerosa produciría no solo una molécula de péptido o proteína que puede mejorar o tratar el cáncer, sino que también suministraría una carga útil citotóxica de nucleósidos a la célula en caso de degradación, en lugar de que se produzca traducción del ARN modificado.
- 10 *Biocompatible*: como se usa en esta invención, el término "biocompatible" significa compatible con células, tejidos, órganos o sistemas vivos que presentan poco o ningún riesgo de lesión, toxicidad o rechazo por parte del sistema inmunitario.
- 15 *Biodegradable*: como se usa en esta invención, el término "biodegradable" significa que puede descomponerse en productos inocuos por la acción de seres vivos.
- 20 *Biológicamente activo*: como se usa en esta invención, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier sustancia que tiene actividad en un sistema y/u organismo biológico. Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico en ese organismo, se considera biológicamente activa.
- 25 En aspectos, el ácido nucleico modificado o ARNm puede considerarse biológicamente activo si incluso una parte del ácido nucleico modificado o ARNm es biológicamente activo o imita una actividad considerada biológicamente relevante.
- Términos químicos*: a continuación se proporciona la definición de varios términos químicos de "acilo" a "tiol".
- 25 El término "acilo", tal como se usa en esta invención, representa un grupo hidrógeno o alquilo (p. ej., un grupo haloalquilo), tal como se define en esta invención, que está unido al grupo molecular original a través de un grupo carbonilo, tal como se define en esta invención, y se exemplifica mediante formilo (es decir, un grupo carboxialdehído), acetilo, propionilo, butanoilo y similares. Los ejemplos de grupos acilo no sustituidos incluyen de 1 a 7, de 1 a 11 o de 30 1 a 21 carbonos. En algunos aspectos, el grupo alquilo se sustituye además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención.
- 35 El término "acilamino", tal como se usa en esta invención, representa un grupo acilo, tal como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo amino, tal como se define en esta invención (es decir, $-\text{N}(\text{R}^{\text{N}1})\text{-C(O)-R}$, donde R es H o un grupo alquilo C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ opcionalmente sustituido y R^{N1} es como se define en esta invención). Los ejemplos de grupos acilamino no sustituidos incluyen de 1 a 41 carbonos (por ejemplo, de 1 a 7, de 1 a 13, de 1 a 21, de 2 a 7, de 2 a 13, de 2 a 21 o de 2 a 41 carbonos). En algunos aspectos, el grupo alquilo se sustituye además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención, y/o el grupo amino es $-\text{NH}_2$ o $-\text{NHR}^{\text{N}1}$, donde R^{N1} es, independientemente, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, alquilo o arilo y cada R^{N2} puede ser H, alquilo o arilo.
- 40 El término "aciloxi", como se usa en esta invención, representa un grupo acilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno (es decir, $-\text{O-C(O)-R}$, donde R es H o un grupo alquilo C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ opcionalmente sustituido). Los ejemplos de grupos aciloxi no sustituidos incluyen de 1 a 21 carbonos (por ejemplo, de 1 a 7 o de 1 a 11 carbonos). En algunos aspectos, el grupo alquilo se sustituye además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención, y/o el grupo amino es $-\text{NH}_2$ o $-\text{NHR}^{\text{N}1}$, donde R^{N1} es, independientemente, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, alquilo o arilo, y cada R^{N2} puede ser H, alquilo o arilo.
- 45 El término "alcarilo", como se usa en esta invención, representa un grupo arilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo alquileno, como se define en esta invención. Los ejemplos de grupos alcarilo no sustituidos son de 7 a 30 carbonos (por ejemplo, de 7 a 16 o de 7 a 20 carbonos, tal como arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀, arilo C₁₋₁₀ alq-C₆₋₁₀ o arilo C₁₋₂₀ alq-C₆₋₁₀). En algunos aspectos, el alquileno y el arilo se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para los grupos respectivos. Otros grupos precedidos por el prefijo "alq-" se definen de la misma manera, donde "alq" se refiere a un alquileno C₁₋₆, a menos que se indique lo contrario, y la estructura química unida es como se define en esta invención.
- 50 El término "alqcicloalquilo" representa un grupo cicloalquilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo alquileno, como se define en esta invención (por ejemplo, un grupo alquileno de 1 a 4, de 1 a 6, de 1 a 10 o forma 1 a 20 carbonos). En algunos aspectos, el alquileno y el cicloalquilo se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para el grupo respectivo.
- 55
- 60

- El término "alquenilo", como se usa en esta invención, representa grupos de cadena lineal o ramificada monovalentes de, a menos que se especifique lo contrario, de 2 a 20 carbonos (p. ej., de 2 a 6 o de 2 a 10 carbonos) que contienen uno o más enlaces dobles carbono-carbono y se exemplifica mediante etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenoilo, 2-butenoilo y similares. Los alquenilos incluyen tanto isómeros cis como trans. Los grupos alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes que se seleccionan, independientemente, de amino, arilo, cicloalquilo o heterociclico (por ejemplo, heteroarilo), como se define en esta invención, o cualquiera de los ejemplos de grupos sustituyentes alquilo descritos en esta invención.
- 5 El término "alqueniloxi" representa un sustituyente químico de fórmula —OR, donde R es un grupo alquenilo C₂₋₂₀ (p. ej., alquenilo C₂₋₆ o C₂₋₁₀), a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos de grupos alqueniloxi incluyen eteniloxi, propeniloxi y similares. En algunos aspectos, el grupo alquenilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxi).
- 10 El término "alqheteroarilo" se refiere a un grupo heteroarilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo alquieno, como se define en esta invención. Los ejemplos de grupos heteroarilo no sustituidos son de 2 a 32 carbonos (por ejemplo, de 2 a 22, de 2 a 18, de 2 a 17, de 2 a 16, de 3 a 15, de 2 a 14, de 2 a 13, o de 2 a 12 carbonos, tales como heteroarilo C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂, heteroarilo C₁₋₁₀ alq-C₁₋₁₂ o heteroarilo C₁₋₂₀ alq-C₁₋₁₂). En algunos aspectos, el alquieno y el heteroarilo se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para el grupo respectivo. Los grupos alqheteroarilo son un subconjunto de grupos alqheterociclico.
- 15 20 El término "alqheterociclico" representa un grupo heterociclico, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo alquieno, como se define en esta invención. Los ejemplos de grupos alqheterociclico no sustituidos son de 2 a 32 carbonos (por ejemplo, de 2 a 22, de 2 a 18, de 2 a 17, de 2 a 16, de 3 a 15, de 2 a 14, de 2 a 13, o de 2 a 12 carbonos, tales como heterociclico C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂, heterociclico C₁₋₁₀ alq-C₁₋₁₂ o heterociclico C₁₋₂₀ alq-C₁₋₁₂). En algunos aspectos, el alquieno y el heterociclico se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para el grupo respectivo.
- 25 El término "alcoxi" representa un sustituyente químico de fórmula —OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₂₀ (p. ej., alquilo C₁₋₆ o C₁₋₁₀), a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi (p. ej., n-propoxi e isopropoxi), t-butoxi y similares. En algunos aspectos, el grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención (por ejemplo, hidroxi o alcoxi).
- 30 El término "alcoxialcoxi" representa un grupo alcoxi que está sustituido con un grupo alcoxi. Los ejemplos de grupos alcoxialcoxi no sustituidos incluyen entre 2 y 40 carbonos (por ejemplo, de 2 a 12 o de 2 a 20 carbonos, tal como alcoxi C₁₋₆-alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₁₀-alcoxi C₁₋₁₀ o alcoxi C₁₋₂₀-alcoxi C₁₋₂₀). En algunos aspectos, cada grupo alcoxi se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.
- 35 El término "alcoxialquilo" representa un grupo alquilo que está sustituido con un grupo alcoxi. Los ejemplos de grupos alcoxialquilo no sustituidos incluyen entre 2 y 40 carbonos (por ejemplo, de 2 a 12 o de 2 a 20 carbonos, tal como alquilo C₁₋₆ alcoxi-C₁₋₆, alquilo C₁₋₁₀ alcoxi-C₁₋₁₀ o alquilo C₁₋₂₀ alcoxi-C₁₋₂₀). En algunos aspectos, el alquilo y el alcoxi se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para el grupo respectivo.
- 40 45 El término "alcoxicarbonilo", tal como se usa en esta invención, representa un alcoxi, tal como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un átomo de carbonilo (por ejemplo, -C(O)-OR, donde R es H o un grupo alquilo C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ opcionalmente sustituido). Los ejemplos de alcoxicarbonilo no sustituido incluyen de 1 a 21 carbonos (por ejemplo, de 1 a 11 o de 1 a 7 carbonos). En algunos aspectos, el grupo alcoxi se sustituye además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención.
- 50 55 El término "alcoxicarbonilalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, como se define en esta invención, que está sustituido con un grupo alcoxicarbonilo, como se define en esta invención (por ejemplo, -O-alquilo-C(O)-OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ opcionalmente sustituido). Los ejemplos de alcoxicarbonilalcoxi no sustituido incluyen de 3 a 41 carbonos (por ejemplo, de 3 a 10, de 3 a 13, de 3 a 17, de 3 a 21 o de 3 a 31 carbonos, tal como alcoxi C₁₋₆ alcoxicarbonilo-C₁₋₆, alcoxi C₁₋₁₀ alcoxicarbonilo-C₁₋₁₀ o alcoxi C₁₋₂₀ alcoxicarbonilo-C₁₋₂₀). En algunos aspectos, cada grupo alcoxi se sustituye además de forma independiente con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes, como se describe en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxi).
- 60 El término "alcoxicarbonilalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, que está sustituido con un grupo alcoxicarbonilo, como se define en esta invención (por ejemplo, -alquil-C(O)-OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₂₀, C₁₋₁₀ o C₁₋₆ opcionalmente sustituido). Los ejemplos de alcoxicarbonilalquilo no sustituido incluyen de 3 a 41 carbonos (por ejemplo, de 3 a 10, de 3 a 13, de 3 a 17, de 3 a 21 o de 3 a 31 carbonos, tal como alcoxicarbonil-C₁₋₆ alquilo C₁₋₆, alcoxicarbonil-C₁₋₁₀ alquilo C₁₋₁₀ o alcoxicarbonil-C₁₋₂₀).

²⁰ alquilo C₁₋₂₀). En algunos aspectos, cada grupo alquilo y alcoxi se sustituye además de forma independiente con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxi).

- El término "alquilo", como se usa en esta invención, incluye tanto a grupos saturados de cadena lineal como de cadena ramificada de 1 a 20 carbonos (por ejemplo, de 1 a 10 o de 1 a 6), a menos que se especifique lo contrario. Los grupos alquilo se ejemplifican por metilo, etilo, n- e iso-propilo, n-, sec-, iso- y tert-butilo, neopentilo, y similares, y pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres o, en el caso de los grupos alquilo de dos carbonos o más, cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: (1) alcoxi C₁₋₆; (2) alquilsulfínilo C₁₋₆; (3) amino, como se define en esta invención (por ejemplo, amino no sustituido (es decir, -NH₂) o un amino sustituido (es decir, -N(R^{N1})₂, donde R^{N1} es como se define para amino); (4) arilo C₆₋₁₀ alcoxi-C₁₋₆; (5) azido; (6) halo; (7) (heterociclico)oxi C₂₋₉; (8) hidroxi; (9) nitró; (10) oxo (por ejemplo, carboxialdehído o acilo); (11) espirociclo C₁₋₇; (12) tioalcoxi; (13) tiol; (14) -CO₂R^A donde R^A se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c) arilo C₆₋₁₀, (d) hidrógeno, (e) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, (f) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (15) -C(O)NR^B'RC', donde cada uno de R^B' y RC' se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀, y (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo; (16) -SO₂R^D', donde R^D' se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, y (d) hidroxi; (17) -SO₂NR^E'RF', donde cada uno de R^E' y RF' se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo; (18) -C(O)R^G', donde R^G' se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c) arilo C₆₋₁₀, (d) hidrógeno, (e) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, (f) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (19) -NR^H'C(O)R^I', donde R^H' se selecciona del grupo que consiste en (a1) hidrógeno y (b1) alquilo C₁₋₆, y R^I' se selecciona del grupo que consiste en (a2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b2) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c2) arilo C₆₋₁₀, (d2) hidrógeno, (e2) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g2) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h2) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (20) -NR^J'C(O)OR^K', donde R^J' se selecciona del grupo que consiste en (a1) hidrógeno y (b1) alquilo C₁₋₆, y R^K' se selecciona del grupo que consiste en (a2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b2) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c2) arilo C₆₋₁₀, (d2) hidrógeno, (e2) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g2) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h2) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; y (21) amidina. En algunos aspectos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención. Por ejemplo, el grupo alquieno de un alcarilo C₁ se puede sustituir además con un grupo oxo para proporcionar el respectivo sustituyente del ariloilo.

El término "alquieno" y el prefijo "alq-", como se usa en esta invención, representan un grupo hidrocarburo divalente saturado derivado de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno, y se ejemplifica por metileno, etileno, isopropileno, y similares. El término "alquieno C_{x-y}" y el prefijo "alq- C_{x-y}" representan grupos alquieno que tienen entre los carbonos x e y. Los valores de ejemplo para x son 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y los valores de ejemplo para y son 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 (por ejemplo, alquieno C₁₋₆, C₁₋₁₀, C₂₋₂₀, C₂₋₆, C₂₋₁₀ o C₂₋₂₀). En algunos aspectos, el alquieno se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para un grupo alquilo.

El término "alquilsulfínilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo unido al grupo molecular original a través de un grupo -S(O)-. Los ejemplos de grupos alquilsulfínilo no sustituidos son de 1 a 6, de 1 a 10 o de 1 a 20 carbonos. En algunos aspectos, el grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

El término "alquilsulfinalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo alquilsulfinilo. Los ejemplos de grupos alquilsulfinalquilo no sustituidos son de 2 a 12, de 2 a 20 o de 2 a 40 carbonos. En algunos aspectos, cada grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

- 5 El término "alquinilo", como se usa en esta invención, representa grupos de cadena lineal o ramificada monovalentes de 2 a 20 átomos de carbono (p. ej., de 2 a 4, de 2 a 6 o de 2 a 10 carbonos) que contienen un enlace triple carbono-carbono y se exemplifica mediante etinilo, 1-propinilo y similares. Los grupos alquinilo pueden estar opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes que se seleccionan, independientemente, de arilo, cicloalquilo o heterociclico (por ejemplo, heteroarilo), como se define en esta invención, o cualquiera de los ejemplos de grupos sustituyentes alquilo descritos en esta invención.
- 10

- 15 El término "alquiniloxi" representa un sustituyente químico de fórmula -OR, donde R es un grupo alquinilo C₂₋₂₀ (p. ej., alquinilo C₂₋₆ o C₂₋₁₀), a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos de grupos alquiniloxi incluyen etiniloxi, propiniloxi y similares. En algunos aspectos, el grupo alquinilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxi).

El término "amidina", como se usa en esta invención, representa un grupo —C(=NH)NH₂.

- 20 El término "amino", como se usa en esta invención, representa —N(R^{N1})₂, donde cada R^{N1} es, independientemente, H, OH, NO₂, N(R^{N2})₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, un grupo protector de N, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, arilo, alcarilo, cicloalquilo, alqcicloalquilo, carboxialquilo, sulfoalquilo, heterociclico (por ejemplo, heteroarilo), o alqheterociclico (por ejemplo, alqheteroarilo), donde cada uno de estos grupos R^{N1} mencionados pueden ser opcionalmente sustituidos, como se define en esta invención para cada grupo; o dos R^{N1} combinados para formar un heterociclico o un grupo protector de N, y donde cada R^{N2} es, independientemente, H, alquilo o arilo. Los grupos amino pueden ser un amino no sustituido (es decir, —NH₂) o un amino sustituido (es decir, —N(R^{N1})₂). En un aspecto preferido, amino es —NH₂ o —NHR^{N1}, donde R^{N1} es, independientemente, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, alquilo, carboxialquilo, sulfoalquilo, o arilo y cada R^{N2} puede ser H, alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), o arilo C₆₋₁₀.
- 25

- 30 El término "aminoácido", como se describe en esta invención, se refiere a una molécula que tiene una cadena lateral, un grupo amino y un grupo ácido (por ejemplo, un grupo carboxi de —CO₂H o un grupo sulfo de —SO₃H), donde el aminoácido se une al grupo molecular original por la cadena lateral, grupo amino o grupo ácido (por ejemplo, la cadena lateral). En algunos aspectos, el aminoácido se une al grupo molecular original por un grupo carbonilo, donde la cadena lateral o el grupo amino se une al grupo carbonilo. Las cadenas laterales ejemplares incluyen un alquilo, arilo, heterociclico, alcarilo, alqheterociclico, aminoalquilo, carbamoilalquilo y carboxialquilo opcionalmente sustituido. Los aminoácidos ejemplares incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, hidroxinorvalina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, pirrolisina, selenocisteína, serina, taurina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Los grupos de aminoácidos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres o, en el caso de grupos de aminoácidos de dos carbonos o más, cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: (1) alcoxi C₁₋₆; (2) alquilsulfinilo C₁₋₆; (3) amino, como se define en esta invención, (por ejemplo, amino no sustituido (es decir, -NH₂) o un amino sustituido (es decir, -N(R^{N1})₂, donde R^{N1} es como se define para amino); (4) C₆₋₁₀ arilo-C₁₋₆ alcoxi; (5) azido; (6) halo; (7) (heterociclico)oxi C₂₋₉; (8) hidroxi; (9) nitro; (10) oxo (por ejemplo, carboxialdehído o acilo); (11) espirociclico C₁₋₇; (12) tioalcoxi; (13) tiol; (14) -CO₂R^{A1}, donde R^{A1} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c) arilo C₆₋₁₀, (d) hidrógeno, (e) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, (f) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (15) -C(O)NR^{B1}R^{C1}, donde cada uno de R^{B1} y R^{C1} se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀, y (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo; (16) -SO₂R^{D1}, donde R^{D1} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, y (d) hidroxi; (17) -SO₂NRE^{E1}R^{F1}, donde cada uno de R^{E1} y R^{F1} se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo; (18) -C(O)R^{G1}, donde R^{G1} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c) arilo C₆₋₁₀, (d) hidrógeno, (e) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, (f) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (19) -NR^{H1}C(O)R^{I1}, donde R^{H1} se selecciona del grupo que consiste
- 55
- 60

- en (al) hidrógeno y (b1) alquilo C₁₋₆ y R^I se selecciona del grupo que consiste en (a2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b2) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c2) arilo C₆₋₁₀, (d2) hidrógeno, (e2) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g2) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h2) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (20) -NR^JC(O)OR^K, donde R^J se selecciona del grupo que consiste en (al) hidrógeno y (b1) alquilo C₁₋₆, y R^K se selecciona del grupo que consiste en (a2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b2) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c2) arilo C₆₋₁₀, (d2) hidrógeno, (e2) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g2) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h2) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; y (21) amidina. En algunos aspectos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención.
- El término "aminoalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, tal como se define en esta invención, sustituido por un grupo amino, como se define en esta invención. El alquilo y el amino pueden sustituirse adicionalmente con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para el grupo respectivo (por ejemplo, CO₂R^{A'}, donde R^{A'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀, por ejemplo, carboxi).
- El término "aminoalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo amino, tal como se define en esta invención. El alquilo y el amino pueden sustituirse adicionalmente con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para el grupo respectivo (por ejemplo, CO₂R^{A'}, donde R^{A'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀, por ejemplo, carboxi).
- El término "arilo", como se usa en esta invención, representa un sistema anular carbocíclico mono, bicíclico o multicíclico que tiene uno o dos anillos aromáticos y se exemplifica por fenilo, naftilo, 1,2-dihidronaftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, antracenilo, fenantrenilo, fluorenilo, indanilo, indenilo y similares, y puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: (1) acilo C₁₋₇ (por ejemplo, carboxialdehído); (2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ alquilo, alquilsulfinilo C₁₋₆ alquilo, amino-C₁₋₆ alquilo, azido-C₁₋₆ alquilo, (carboxialdehído)-alquilo C₁₋₆, halo-C₁₋₆ alquilo (por ejemplo, perfluoroalquilo), hidroxi-C₁₋₆ alquilo, nitro-C₁₋₆ alquilo o tioalcoxi C₁₋₆ alquilo); (3) C₁₋₂₀ alcoxi (por ejemplo, alcoxi C₁₋₆, tal como perfluoroalcoxi); (4) alquilsulfinilo C₁₋₆; (5) arilo C₆₋₁₀; (6) amino; (7) C₁₋₆ alquil-C₆₋₁₀ arilo; (8) azido; (9) cicloalquilo C₃₋₈; (10) cicloalquilo C₁₋₆ alq-C₃₋₈; (11) halo; (12) heterociclico C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₁₂); (13) (heterociclico C₁₋₁₂)oxi; (14) hidroxi; (15) nitro; (16) tioalcoxi C₁₋₂₀ (por ejemplo, tioalcoxi C₁₋₆); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'}, donde q es un número entero de cero a cuatro, y R^{A'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'}R^{C'}, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^{B'} y R^{C'} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'}, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^{D'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo, (b) arilo C₆₋₁₀ y (c) arilo alc-C₆₋₁₀; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^{E'}R^{F'}, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde cada uno de R^{E'} y R^{F'} se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (21) tiol; (22) ariloxi C₆₋₁₀; (23) cicloalcoxi C₃₋₈; (24) arilo C₆₋₁₀-alcoxi C₁₋₆; (25) heterociclico C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂); (26) alquenilo C₂₋₂₀; y (27) alquinilo C₂₋₂₀. En algunos aspectos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención. Por ejemplo, el grupo alquieno de un alcarilo C₁-alcarilo o un alqheterociclico C₁ se puede sustituir adicionalmente con un grupo oxo para proporcionar el grupo sustituyente ariloilo y (heterociclico)oil respectivo.
- El término "arilalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcarilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno. Los ejemplos de grupos alcoxialquilo no sustituidos incluyen de 7 a 30 carbonos (por ejemplo, de 7 a 16 o de 7 a 20 carbonos, tal como alcoxi C₆₋₁₀ arilo-C₁₋₆, alcoxi C₆₋₁₀ arilo-C₁₋₁₀ o alcoxi C₆₋₁₀ arilo-C₁₋₂₀). En algunos aspectos, el grupo arilalcoxi se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención.
- El término "ariloxi" representa un sustituyente químico de fórmula -OR', donde R' es un grupo de arilo de 6 a 18 carbonos, a menos que se especifique lo contrario. En algunos aspectos, el grupo arilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención.

El término "ariloilo", como se usa en esta invención, representa un grupo arilo, como se define en esta invención, que

está unido al grupo molecular original a través de un grupo carbonilo. Los ejemplos de grupos ariloilo no sustituidos son de 7 a 11 carbonos. En algunos aspectos, el grupo arilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención.

5 El término "azido" representa un grupo $-N_3$, que también se puede representar como $-N=N=N$.

El término "bicíclico", como se usa en esta invención, se refiere a una estructura que tiene dos anillos, que pueden ser aromáticos o no aromáticos. Las estructuras bicíclicas incluyen grupos espirociclico, como se define en esta invención, y dos anillos que comparten uno o más puentes, donde dichos puentes pueden incluir un átomo o una cadena que incluye dos, tres o más átomos. Los ejemplos de grupos bicíclicos incluyen un grupo carbociclico bicíclico, donde el primer y segundo anillos son grupos carbociclico, como se define en esta invención; un grupo arilo bicíclico, donde el primer y segundo anillos son grupos arilo, como se define en esta invención; grupos heterociclico bicíclicos, donde el primer anillo es un grupo heterociclico y el segundo anillo es un grupo carbociclico (por ejemplo, arilo) o heterociclico (por ejemplo, heteroarilo); y grupos heteroarilo bicíclicos, donde el primer anillo es un grupo heteroarilo y el segundo anillo es un grupo carbociclico (por ejemplo, arilo) o heterociclico (por ejemplo, heteroarilo). En algunos aspectos, el grupo bicíclico se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención para los grupos cicloalquilo, heterociclico y arilo.

20 Los términos "carbocíclico" y "carbociclico", como se usan en esta invención, se refieren a una estructura monocíclica, bicíclica o trícíclica de C₃₋₁₂ opcionalmente sustituida en la que los anillos, que pueden ser aromáticos o no aromáticos, están formados por átomos de carbono. Las estructuras carbocíclicas incluyen grupos cicloalquilo, cicloalquenilo y arilo.

25 El término "carbamolio", como se usa en esta invención, representa $-C(O)-N(R^{N1})_2$, donde el significado de cada R^{N1} se encuentra en la definición de "amino" proporcionada en esta invención.

30 El término "carbamoilalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo carbamolio, como se define en esta invención. El grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

35 El término "carbamilo", como se usa en esta invención, se refiere a un grupo carbamato que tiene la estructura -NR^{N1}C(=O)OR u -OC(=O)N(R^{N1})₂, donde el significado de cada R^{N1} se encuentra en la definición de "amino" proporcionada en esta invención, y R es alquilo, cicloalquilo, alqcicloalquilo, arilo, alcarilo, heterociclico (por ejemplo, heteroarilo) o alqheterociclico (por ejemplo, alqheteroarilo), como se define en esta invención.

40 El término "carbonilo", como se usa en esta invención, representa un grupo C(O), que también se puede representar como C=O.

El término "carboxialdehído" representa un grupo acilo que tiene la estructura —CHO.

45 El término "carboxi", como se usa en esta invención, significa —CO₂H.

El término "carboxialcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, como se define en esta invención, sustituido por un grupo carboxi, como se define en esta invención. El grupo alcoxi se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para el grupo alquilo.

50 El término "carboxialquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo carboxi, como se define en esta invención. El grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

55 El término "ciano", como se usa en esta invención, representa un grupo —CN.

El término "cicloalcoxi" representa un sustituyente químico de fórmula —OR, donde R es un grupo cicloalquilo C₃₋₈, como se define en esta invención, a menos que se especifique lo contrario. El grupo cicloalquilo puede estar sustituido además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención. Los ejemplos de grupos cicloalcoxi no sustituidos son de 3 a 8 carbonos.

60 El término "cicloalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo hidrocarburo cíclico no aromático saturado o insaturado monovalente de tres a ocho carbonos, a menos que se especifique lo contrario, y se exemplifica mediante ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, heptilo de biciclo [2.2.1.] y similares. Cuando el grupo cicloalquilo incluye un doble enlace carbono-carbono, el grupo cicloalquilo puede denominarse grupo

- "cicloalquenilo". Los ejemplos de grupos cicloalquenilo incluyen ciclopentenilo, ciclohexenilo y similares. Los grupos cicloalquilo se pueden sustituir opcionalmente con: (1) C₁₋₇ acilo (por ejemplo, carboxialdehido); (2) C₁₋₂₀ alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ alquilo, alquilsulfinilo C₁₋₆ alquilo, amino-C₁₋₆ alquilo, azido-C₁₋₆ alquilo, (carboxialdehido)-alquilo C₁₋₆, halo-C₁₋₆ alquilo (por ejemplo, perfluoroalquilo), hidroxi-C₁₋₆ alquilo, nitro-C₁₋₆ alquilo o tioalcoxi C₁₋₆ alquilo); (3) C₁₋₂₀ alcoxi (por ejemplo, alcoxi C₁₋₆, tal como perfluoroalcoxi); (4) C₁₋₆ alquilsulfinilo; (5) C₆₋₁₀ arilo; (6) amino; (7) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo; (8) azido; (9) C₃₋₈ cicloalquilo; (10) cicloalquilo C₁₋₆ alq-C₃₋₈; (11) halo; (12) heterociclico C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₁₂); (13) (heterociclico C₁₋₁₂)oxi; (14) hidroxi; (15) nitro; (16) tioalcoxi C₁₋₂₀ (por ejemplo, tioalcoxi C₁₋₆); (17) —(CH₂)_qCO₂R^A, donde q es un número entero de cero a cuatro, y R^A se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (18) —(CH₂)_qCONR^BR^C, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^B y R^C se seleccionan independientemente del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₆₋₁₀, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (19) —(CH₂)_qSO₂R^D, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^D se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₆₋₁₀, (b) arilo C₆₋₁₀ y (c) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (20) —(CH₂)_qSO₂NR^ER^F, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde cada uno de R^E y R^F se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₆₋₁₀, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (21) tiol; (22) ariloxi C₆₋₁₀; (23) cicloalcoxi C₃₋₈; (24) arilo C₆₋₁₀-alcoxi C₁₋₆; (25) heterociclico C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂); (26) oxo; (27) C₂₋₂₀ alquenilo; y (28) C₂₋₂₀ alquinilo. En algunos aspectos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención. Por ejemplo, el grupo alquieno de un alcarilo C₁-alcarilo o un alqheterociclico C₁ se puede sustituir adicionalmente con un grupo oxo para proporcionar el grupo sustituyente ariloilo y (heterociclico)oil respectivo
- El término "diasterómero", significa estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí y no son superponibles.

El término "cantidad eficaz" de un agente, como se usa en esta invención, es esa cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados, por ejemplo, resultados clínicos, y, como tal, una "cantidad eficaz" depende del contexto en el que se aplica. Por ejemplo, en el contexto de la administración de un agente que trata el cáncer, una cantidad eficaz de un agente es, por ejemplo, una cantidad suficiente para lograr el tratamiento, como se define en esta invención, del cáncer, en comparación con la respuesta obtenida sin la administración del agente.

El término "enantiómero", como se usa en esta invención, significa cada forma ópticamente activa individual de un compuesto, que tiene una pureza óptica o exceso enantiomérico (como se determina mediante procedimientos estándar en la técnica) de al menos un 80 % (es decir, al menos un 90 % de un enantiómero y como máximo un 10 % del otro enantiómero), preferentemente al menos un 90 % y más preferentemente al menos un 98 %.

El término «halo», como se usa en esta invención, representa un halógeno seleccionado de bromo, cloro, yodo o flúor.

El término "haloalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, como se define en esta invención, sustituido por un grupo halógeno (es decir, F, Cl, Br o I). Un haloalcoxi puede sustituirse con uno, dos, tres o, en el caso de grupos alquilo de dos carbonos o más, cuatro halógenos. Los grupos haloalcoxi incluyen perfluoroalcoxi (por ejemplo, -OCF₃), -OCHF₂, -OCH₂F, -OCCI₃, -OCH₂CH₂Br, -OCH₂CH(CH₂CH₂Br)CH₃ y -OCHICH₃. En algunos aspectos, el grupo haloalcoxi se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para grupos alquilo.

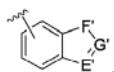
El término "haloalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo halógeno (es decir, F, Cl, Br o I). Un haloalquilo puede sustituirse con uno, dos, tres o, en el caso de grupos alquilo de dos carbonos o más, cuatro halógenos. Los grupos haloalquilo incluyen perfluoroalquilos (por ejemplo, -CF₃), -CHF₂, -CH₂F, -CCl₃, -CH₂CH₂Br, -CH₂CH(CH₂CH₂Br)CH₃ y -CHICH₃. En algunos aspectos, el grupo haloalquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para grupos alquilo.

El término "heteroalquieno", como se usa en esta invención, se refiere a un grupo alquieno, como se define en esta invención, en el que uno o dos de los átomos de carbono constituyentes se han reemplazado cada uno por nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunos aspectos, el grupo heteroalquieno se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para los grupos alquieno.

El término "heteroarilo", como se usa en esta invención, representa ese subconjunto de heterociclos, como se define en esta invención, que son aromáticos: es decir, contienen 4n+2 pi electrones dentro del sistema de anillo mono o multicíclico. Los ejemplos de grupos heteroarilo no sustituidos son de 1 a 12 (por ejemplo, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 2 a 12, 2 a 11, 2 a 10 o 2 a 9) carbonos. En algunos aspectos, el heteroarilo se sustituye con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define para un grupo heterociclico.

El término "heterociclico", como se usa en esta invención, representa un anillo de 5, 6 o 7 miembros, a menos que se especifique lo contrario, que contiene uno, dos, tres o cuatro heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. El anillo de 5 miembros tiene de cero a dos dobles enlaces, y los

anillos de 6 y 7 miembros tienen de cero a tres dobles enlaces. Los ejemplos de grupos heterociclico no sustituidos son de 1 a 12 (por ejemplo, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 2 a 12, 2 a 11, 2 a 10 o 2 a 9) carbonos. El término "heterociclico" también representa un compuesto heterocíclico que tiene una estructura multicíclica unida en la que uno o más carbonos y/o heteroátomos forman puentes entre dos miembros no adyacentes de un anillo monocíclico, por ejemplo, 5 un grupo quinuclidinilo. El término "heterociclico" incluye grupos bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos en los que cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores está fusionado a uno, dos o tres anillos carbocíclicos, por ejemplo, un anillo arilo, un anillo ciclohexano, un anillo ciclohexeno, un anillo ciclopentano, un anillo ciclopenteno u otro anillo heterocíclico monocíclico, tal como indolilo, quinolilo, isoquinolilo, tetrahidroquinolilo, benzofurilo, benzotienilo y similares. Los ejemplos de heterociclicos fusionados incluyen tropanos y 1,2,3,5,8a-hexahidroindolizina. Los 10 heterocíclicos incluyen pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, pirazolílico, pirazolidinilo, imidazolílico, imidazolinilo, imidazolidinilo, piridílico, piperidinilo, homopiperidinilo, pirazinilo, piperazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, oxazolílico, oxazolidinilo, isoxazolílico, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiazolílico, tiazolidinilo, isotiazolílico, isotiazolidinilo, indolílico, indazolílico, quinolílico, isoquinolílico, quinoxalinílico, dihidroquinoxalinílico, quinazolinílico, cinolinílico, ftalazinílico, bencimidazolílico, benzotiazolílico, benzoxazolílico, benzotiadiazolílico, furilo, tienilo, tiazolidinílico, isotiazolílico, triazolílico, 15 tetrazolílico, oxadiazolílico (por ejemplo, 1,2,3-oxadiazolílico), purinílico, tiadiazolílico (por ejemplo, 1,2,3-tiadiazolílico), tetrahidrofuránico, dihidrofuránico, tetrahidrotienílico, dihidrotienílico, dihidroindolílico, dihidroquinolílico, tetrahidroquinolílico, tetrahidroisoquinolílico, dihidroisoquinolílico, piranílico, dihidropiranílico, ditiazolílico, benzofuranílico, isobenzofuranílico, benzotienílico, y similares, incluyendo las formas dihidro y tetrahidro de los mismos, donde uno o más enlaces dobles se reducen y se reemplazan con hidrógenos. Aún otros heterociclicos ejemplares incluyen: 2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-oxazolílico; 2,3-dihidro-2-oxo-1H-imidazolílico; 2,3,4,5-tetrahidro-5-oxo-1H-pirazolílico (por ejemplo, 2,3,4,5-tetrahidro-2-fenil-5-oxo-1H-pirazolílico); 2,3,4,5-tetrahidro-2,4-dioxo-1H-imidazolílico (por ejemplo, 2,3,4,5-tetrahidro-2,4-dioxo-5-metil-5-fenil-1H-imidazolílico); 2,3-dihidro-2-tioxo-1,3,4-oxadiazolílico (por ejemplo, 2,3-dihidro-2-tioxo-5-fenil-1,3,4-oxadiazolílico); 4,5-dihidro-5-oxo-1H-triazolílico (por ejemplo, 4,5-dihidro-3-metil-4-amino 5-oxo-1H-triazolílico); 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxopiridinílico (por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxo-3,3-dietilpiridinílico); 2,6-dioxo-piperidinílico (por ejemplo, 2,6-dioxo-3-etil-3-fenilpiperidinílico); 1,6-dihidro-6-oxopirimidinílico; 1,6-dihidro-4-oxopirimidinílico (por ejemplo, 2-(metiltio)-1,6-dihidro-4-oxo-5-metilpirimidin-1-il); 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxopirimidinílico (por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxo-3-etilpirimidinílico); 1,6-dihidro-6-oxo-piridazinílico (por ejemplo, 1,6-dihidro-6-oxo-3-etylpiridazinílico); 1,6-dihidro-6-oxo-1,2,4-triazinílico (por ejemplo, 1,6-dihidro-5-isopropil-6-oxo-1,2,4-triazinílico); 2,3-dihidro-2-oxo-1H-indolílico (por ejemplo, 3,3-dimetil-2,3-dihidro-2-oxo-1H-indolílico y 2,3-dihidro-2-oxo-3,3'-espiropropano-1H-indol-1-il); 30 1,3-dihidro-1-oxo-2H-iso-indolílico; 1,3-dihidro-1,3-dioxo-2H-iso-indolílico; 1H-benzopirazolílico (por ejemplo, 1-(etoxicarbonilo)-1H-benzopirazolílico); 2,3-dihidro-2-oxo-1H-bencimidazolílico (por ejemplo, 3-etyl-2,3-dihidro-2-oxo-1H-bencimidazolílico); 2,3-dihidro-2-oxo-benzoxazolílico (por ejemplo, 5-cloro-2,3-dihidro-2-oxo-benzoxazolílico); 2,3-dihidro-2-oxo-benzoxazolílico; 2-oxo-2H-benzopiranílico; 1,4-benzodioxanílico; 1,3-benzodioxanílico; 2,3-dihidro-3-oxo, 4H-1,3-benzotiazinílico; 3,4-dihidro-4-oxo-3H-quinazolinílico (por ejemplo, 2-metil-3,4-dihidro-4-oxo-3H-quinazolinílico); 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxo-3H-quinazolinílico (por ejemplo, 1-etyl-1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxo-3H-quinazolinílico); 1,2,3,6-tetrahidro-2,6-dioxo-7H-purinílico (por ejemplo, 1,2,3,6-tetrahidro-1,3-dimetil-2,6-dioxo-7H-purinílico); 1,2,3,6-tetrahidro-2,6-dioxo-1H-purinílico (por ejemplo, 1,2,3,6-tetrahidro-3,7-dimetil-2,6-dioxo-1H-purinílico); 2-oxobenz[c,d]indolílico; 1,1-dioxo-2H-naft[1,8-c,d]isotiazolílico; y 1,8-naftilendicarboxamido. Los heterocíclicos adicionales incluyen 3,3a,4,5,6,6a-hexahidropirrolo[3,4-b]pirrol-(2H)-il, y 2,5-diazabiciclo[2.2.1]heptan-2-il, homopiperazinílico (o diazepanílico), tetrahidropiranílico, ditiazolílico, benzofuranílico, benzotienílico, oxepanílico, tiepanílico, azocanílico, oxezanílico y tiocanílico. Los grupos heterocíclicos incluyen también grupos de la fórmula



45 donde

E' se selecciona del grupo que consiste en -N- y -CH-; F' se selecciona del grupo que consiste en -N=CH-, -NH-CH₂-, -NH-C(O)-, -NH-, -CH=N-, -CH₂-NH-, -C(O)-NH-, -CH=CH-, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂O-, -OCH₂-, -O-, y -S-; y G' se selecciona del grupo que consiste en -CH- y -N-. Cualquier de los grupos heterociclico mencionados en esta invención puede estar opcionalmente sustituido con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: (1) C₁₋₇ acilo (por ejemplo, carboxialdehído); (2) C₁₋₂₀ alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ alquilo, alquilsulfínico C₁₋₆ alquilo, amino-C₁₋₆ alquilo, azido-C₁₋₆ alquilo, (carboxialdehído)-alquilo C₁₋₆, halo-C₁₋₆ alquilo (por ejemplo, perfluoroalquilo), hidroxi-C₁₋₆ alquilo, nitro-C₁₋₆ alquilo o tioalcoxi C₁₋₆ alquilo); (3) C₁₋₂₀ alcoxi (por ejemplo, alcoxi C₁₋₆, tal como perfluoroalcoxi); (4) C₁₋₆ alquilsulfínico; (5) C₆₋₁₀ arilo; (6) amino; (7) C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀ arilo; (8) azido; (9) C₃₋₈ cicloalquilo; (10) cicloalquilo C₁₋₆ alq-C₃₋₈; (11) halo; (12) heterociclico C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₂₋₁₂); (13) (heterociclico C₁₋₁₂)oxi; (14) hidroxi; (15) nitro; (16) tioalcoxi C₁₋₂₀ (por ejemplo, tioalcoxi C₁₋₆); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'}, donde q es un número entero de cero a cuatro, y R^{A'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (18) -(CH₂)_qCONR^{B'}R^{C'}, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^{B'} y R^{C'} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (19) -(CH₂)_qSO₂R^{D'}, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^{D'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀ y (c) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^{E'}R^{F'}, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde cada uno de R^{E'} y R^{F'} se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y

(d) arilo C₁₋₆ alq-C₆₋₁₀; (21) tiol; (22) ariloxi C₆₋₁₀; (23) cicloalcoxi C₃₋₈; (24) arilalcoxi; (25) heterociclico C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₆ alq-C₁₋₁₂); (26) oxo; (27) heterociclico C₁₋₁₂)imino; (28) alquenilo C₂₋₂₀; y (29) alquinilo C₂₋₂₀. En algunos aspectos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención. Por ejemplo, el grupo alquileno de un alquilo C₁-alcarilo o un alqheterociclico C₁ se puede sustituir adicionalmente con un grupo oxo para proporcionar el grupo sustituyente ariloilo y (heterociclico)oil respectivo.

El término "(heterociclico) imino", como se usa en esta invención, representa un grupo heterociclico, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo imino. En algunos aspectos, el grupo heterociclico se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

El término "(heterociclico)oxi", como se usa en esta invención, representa un grupo heterociclico, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno. En algunos aspectos, el grupo heterociclico se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

El término "(heterociclico)oil", como se usa en esta invención, representa un grupo heterociclico, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo carbonilo. En algunos aspectos, el grupo heterociclico se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

El término "hidrocarburo", como se usa en esta invención, representa un grupo que consiste solo en átomos de carbono e hidrógeno.

El término "hidroxi", como se usa en esta invención, representa un grupo —OH.

El término "hidroxialquenilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquenilo, como se define en esta invención, sustituido por uno a tres grupos hidroxi, con la condición de que no más de un grupo hidroxi pueda estar unido a un único átomo de carbono del grupo alquilo, y se ejemplifica mediante dihidroxipropenilo, hidroxiisopentenilo y similares.

El término "hidroxialquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por uno a tres grupos hidroxi, con la condición de que no más de un grupo hidroxi pueda estar unido a un único átomo de carbono del grupo alquilo, y se ejemplifica mediante hidroximetilo, dihidroxipropilo y similares.

El término "isómero", como se usa en esta invención, significa cualquier tautómero, estereoísomero, enantiómero o diastereómero de cualquier compuesto. Se reconoce que los compuestos pueden tener uno o más centros quirales y/o enlaces dobles y, por lo tanto, existen como estereoísomeros, tal como los isómeros de doble enlace (es decir, los isómeros geométricos de E/Z) o los diastereómeros (por ejemplo, enantiómeros (es decir, (+) o (-)) o los isómeros cis/trans). Según la descripción, las estructuras químicas que se muestran en esta invención, y, por lo tanto, los compuestos, abarcan todos los estereoísomeros correspondientes, es decir, tanto la forma estereomericamente pura (por ejemplo, geométricamente pura, enantiomericamente pura, o diastereomericamente pura) y mezclas estereoísoméricas y enantioméricas, por ejemplo, racematos. Las mezclas enantioméricas y estereoísoméricas de compuestos se pueden resolver típicamente en sus enantiómeros componentes o estereoísomeros por procedimientos bien conocidos, tales como cromatografía de gases de fase quiral, cromatografía líquida de alta potencia de fase quiral, que cristaliza el compuesto como un complejo de sal quiral, o cristaliza el compuesto en un solvente quiral. Los enantiómeros y los estereoísomeros también se pueden obtener a partir de intermedios, reactivos y catalizadores estereomérica o enantiomericamente puros por procedimientos sintéticos asimétricos bien conocidos.

El término "amino protegido de N", como se usa en esta invención, se refiere a un grupo amino, como se define en esta invención, al que se une a uno o dos grupos protectores de N, como se define en esta invención.

El término "grupo protector de N", como se usa en esta invención, representa aquellos grupos destinados a proteger a un grupo amino contra reacciones no deseadas durante los procedimientos sintéticos. Los grupos protectores de N comúnmente utilizados se describen en Greene, "Grupos de protección en la síntesis orgánica", 3^a edición (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999). Los grupos protectores de N incluyen grupos de acilo, ariloilo o carbamilo tales como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, t-butilacetilo, 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, o-nitrofenoxiacetilo, α-clorobutirilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, 4-nitrobenzoilo, y auxiliares quirales, tales como D, L o D, L-aminoácidos protegidos o no protegidos tales como alanina, leucina, fenilalanina y similares; grupos que contienen sulfonilo, tales como bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo, y similares; grupos de formación de carbamato tales como benciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 2,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,4,5-trimetoxibenciloxicarbonilo, 1-(p-bifenil)-1-metiletoxicarbonilo, α,α-dimetil-3,5-

5 dimetoxibencoxicarbonilo, benzhidriloxy carbonilo, t-butiloxicarbonilo, diisopropilmethoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, alliloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, fenoxicarbonilo, 4-nitrofenoxi carbonilo, fluorenil-9-metoxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, cyclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo, y similares, grupos alcarilos tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo, y similares y grupos sililo, tales como trimetilsililo, y similares. Los grupos protectores de N preferidos son formil, acetilo, benzoilo, pivaloil, t-butilacetilo, alanilo, fenilsulfonilo, bencilo, t-butiloxicarbonilo (Boc) y benciloxcarbonilo (Cbz).

El término "nitro", como se usa en esta invención, representa un grupo —NO_2 .

10 El término "oxo", como se usa en esta invención, representa =O.

El término "perfluoroalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, donde cada radical hidrógeno unido al grupo alquilo se ha reemplazado por un radical fluoruro. Los grupos perfluoroalquilo se ejemplifican mediante trifluorometilo, pentafluoroetilo y similares.

15 El término "perfluoroalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, como se define en esta invención, donde cada radical de hidrógeno unido al grupo alcoxi se ha reemplazado por un radical fluoruro. Los grupos perfluoroalcoxi se ejemplifican mediante trifluorometoxi, pentafluoroetoxi y similares.

20 El término "espirociclilo", como se usa en esta invención, representa un diradical de alquíleno C₂₋₇, cuyos dos extremos están unidos al mismo átomo de carbono del grupo original para formar un grupo espirocíclico, y también un diradical de heteroalquileno C₁₋₆, cuyos dos extremos están unidos al mismo átomo. El radical heteroalquileno que forma el grupo espirociclilo puede contener uno, dos, tres o cuatro heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. En algunos aspectos, el grupo espirociclilo incluye de uno a siete carbonos, excluyendo el átomo de carbono al que se une el diradical. Los grupos espirociclilo pueden estar opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes proporcionados en esta invención como sustituyentes opcionales para grupos cicloalquilo y/o heterociclilo.

30 El término "estereoisómero", como se usa en esta invención, se refiere a todas las formas isoméricas y conformacionales diferentes posibles que un compuesto puede poseer (por ejemplo, un compuesto de cualquier fórmula descrita en esta invención), en particular todas las formas isoméricas estereoquímicas y conformacionales posibles, todos los diastereómeros, enantiómeros y/o conformadores de la estructura molecular básica. Algunos compuestos pueden existir en diferentes formas tautoméricas, todas estas últimas incluidas dentro de la presente descripción.

35 El término "sulfoalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo sulfo de $\text{—SO}_3\text{H}$. En algunos aspectos, el grupo alquilo puede sustituirse adicionalmente con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

40 El término "sulfonilo", como se usa en esta invención, representa un grupo —S(O)_2 .

El término "tioalcarilo", como se usa en esta invención, representa un sustituyente químico de fórmula —SR , donde R es un grupo alcarilo. En algunos aspectos, el grupo alcarilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

45 El término "tioalqheterociclilo", como se usa en esta invención, representa un sustituyente químico de fórmula —SR , donde R es un grupo alqheterociclilo. En algunos aspectos, el grupo alqheterociclilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

50 El término "tioalcoxi", como se usa en esta invención, representa un sustituyente químico de fórmula —SR , donde R es un grupo alquilo, como se define en esta invención. En algunos aspectos, el grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

El término "tiol" representa un grupo —SH .

55 **Compuesto:** Como se usa en esta invención, el término "compuesto" pretende incluir todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros e isótopos de las estructuras representadas.

60 Los compuestos descritos en esta invención pueden ser asimétricos (por ejemplo, que tienen uno o más estereocentros). Todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros, son contemplados a menos que se indique lo contrario. Los compuestos de la presente descripción que contienen átomos de carbono sustituidos

- asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. En la técnica se conocen procedimientos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente activos, tales como mediante resolución de mezclas racémicas o mediante síntesis estereoselectiva. Muchos isómeros geométricos de olefinas, enlaces dobles C=N y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en esta invención, y todos estos isómeros estables se contemplan en la presente descripción. Los isómeros geométricos cis y trans de los compuestos de la presente descripción se describen y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas.
- 5
- Los compuestos de la presente descripción también incluyen formas tautoméricas. Las formas tautoméricas son el resultado del intercambio de un enlace sencillo con un enlace doble adyacente y la migración concomitante de un protón. Las formas tautoméricas incluyen tautómeros prototrópicos que son estados de protonación isomérica que tienen la misma fórmula empírica y carga total. Los ejemplos de tautómeros prototrópicos incluyen pares de cetona — enol, pares de amida — ácido imídico, pares de lactama — lactim, pares de amida — ácido imídico, pares de enamina — imina y formas anulares donde un protón puede ocupar dos o más posiciones de un sistema heterocíclico, tal como 1H- y 3H-imidazol, 1H-, 2H- y 4H-1,2,4-triazol, 1H- y 2H-isoindol y 1H- y 2H-pirazol. Las formas tautoméricas pueden estar en equilibrio o bloqueadas estéricamente en una forma mediante sustitución adecuada.
- 10
- 15
- Los compuestos de la presente descripción también incluyen todos los isótopos de los átomos que ocurren en los compuestos intermedios o finales. "Isótopos" se refiere a átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa resultantes de un número diferente de neutrones en los núcleos. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio.
- 20
- 25
- Los compuestos y sales de la presente descripción se pueden preparar en combinación con moléculas de solvente o agua para formar solvatos e hidratos mediante procedimientos de rutina.
- 30
- 35
- Conservado: Como se usa en esta invención, el término "conservado" se refiere a nucleótidos o residuos de aminoácidos de una secuencia de polinucleótidos o secuencia de polipéptidos, respectivamente, que son aquellos que ocurren inalterados en la misma posición de dos o más secuencias que se comparan. Los nucleótidos o aminoácidos que se conservan relativamente son aquellos que se conservan entre secuencias más relacionadas que los nucleótidos o aminoácidos que aparecen en otras partes de las secuencias.
- 40
- 45
- En algunos aspectos, se dice que dos o más secuencias están "completamente conservadas" si son 100 % idénticas entre sí. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias están "altamente conservadas" si son al menos en un 70 % idénticas, al menos en un 80 % idénticas, al menos en un 90 % idénticas o al menos en un 95 % idénticas entre sí. En algunos aspectos, se dice que dos o más secuencias están "altamente conservadas" si son alrededor del 70 % idénticas, alrededor del 80 % idénticas, alrededor del 90 % idénticas, alrededor del 95 %, alrededor del 98 % o alrededor del 99 % idénticas entre sí. En algunos aspectos, se dice que dos o más secuencias están "conservadas" si son al menos en un 30 % idénticas, al menos en un 40 % idénticas, al menos en un 50 % idénticas, al menos en un 60 % idénticas, al menos en un 70 % idénticas, al menos en un 80 % idénticas, al menos en un 90 % idénticas o al menos en un 95 % idénticas entre sí. En algunos aspectos, se dice que dos o más secuencias están "conservadas" si son aproximadamente en un 30 % idénticas, aproximadamente en un 40 % idénticas, aproximadamente en un 50 % idénticas, aproximadamente en un 60 % idénticas, aproximadamente en un 70 % idénticas, aproximadamente en un 80 % idénticas, aproximadamente en un 90 % idénticas, aproximadamente en un 95 % idénticas, aproximadamente en un 98 % idénticas o aproximadamente en un 99 % idénticas entre sí.
- 50
- La conservación de la secuencia puede aplicarse a toda la longitud de un oligonucleótido o polipéptido o puede aplicarse a una porción, región o característica de este.
- 55
- Liberación controlada: como se usa en esta invención, el término "liberación controlada" se refiere a una composición farmacéutica o perfil de liberación de compuesto que se ajusta a un patrón particular de liberación para lograr un resultado terapéutico.
- Cíclico o Ciclado: como se usa en esta invención, el término «cíclico» se refiere a la presencia de un bucle continuo. Las moléculas cíclicas no necesitan ser circulares, sólo unidas para formar una cadena ininterrumpida de subunidades.
- 55
- Las moléculas cíclicas tales como el ARN diseñado o ARNm pueden ser unidades individuales o multímeros o comprender uno o más componentes de una estructura compleja o de orden superior.
- 60
- Citostático: como se usa en esta invención, "citostático" se refiere a inhibir, reducir, suprimir el crecimiento, división o multiplicación de una célula (*por ejemplo*, una célula de mamífero (*por ejemplo*, una célula humana)), bacteria, virus, hongo, protozoario, parásito, prión o una combinación de los mismos.
- Citotóxico: como se usa en esta invención, "citotóxico" se refiere a destruir o causar un efecto perjudicial, tóxico o

mortal en una célula (*por ejemplo*, una célula de mamífero (*por ejemplo*, una célula humana)), bacteria, virus, hongo, protozoario, parásito, prión o una combinación de los mismos.

5 *Administración*: como se usa en esta invención, "administración" se refiere al acto o manera de administrar un compuesto, sustancia, entidad, resto, carga o carga útil.

Agente de administración: como se usa en esta invención, «agente de administración» se refiere a cualquier sustancia que facilita, al menos en parte, la administración *in vivo* de un ácido nucleico modificado o ARNmm a células diana.

10 *Desestabilizado*: como se usa en esta invención, el término "inestable", "desestabilizar" o "región desestabilizadora" significa una región o molécula que es menos estable que una forma inicial, de tipo salvaje o natural de la misma región o molécula.

15 *Etiqueta detectable*: como se usa en esta invención, "etiqueta detectable" se refiere a uno o más marcadores, señales o restos que se unen, incorporan o asocian con otra entidad que se detecta fácilmente mediante procedimientos conocidos en la técnica que incluyen radiografía, fluorescencia, quimioluminiscencia, actividad enzimática, absorbancia y similares. Las etiquetas detectables incluyen radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, enzimas, tintes, iones metálicos, ligandos tales como biotina, avidina, estreptavidina y haptenos, puntos cuánticos y similares. Las etiquetas detectables se pueden ubicar en cualquier posición en los péptidos o proteínas descritas en esta invención.

20 Pueden estar dentro de los aminoácidos, los péptidos o las proteínas, o ubicados en los extremos N o C.

Digerir: como se usa en esta invención, el término "digerir" significa dividir en partes o componentes más pequeños. Cuando se hace referencia a polipéptidos o proteínas, la digestión resulta en la producción de péptidos.

25 *Distal*: como se usa en esta invención, el término "distal" significa situado lejos del centro o lejos de un punto o región de interés.

Factor de división de dosis (DSF)-relación de PUD del tratamiento dividido de dosis dividido por PUD de la dosis diaria total o la dosis unitaria única. El valor se deriva de la comparación de los grupos de regímenes de dosificación.

30 Encapsular: como se usa en esta invención, el término "encapsular" significa encerrar, rodear o revestir.

Diseñado: como se usa en esta invención, los aspectos se "diseñan" cuando se conciben para tener una característica o propiedad, ya sea estructural o química, que varía desde un punto de partida, tipo salvaje o molécula nativa.

35 Exosoma: como se usa en esta invención, "exosoma" es una vesícula secretada por células de mamífero.

40 *Expresión*: como se usa en esta invención, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a uno o más de los siguientes eventos: (1) producción de una plantilla de ARN a partir de una secuencia de ADN (*por ejemplo*, mediante transcripción); (2) procesamiento de una transcripción de ARN (*por ejemplo*, mediante unión, edición, formación de tapa 5' y/o procesamiento de extremo 3'); (3) traducción de un ARN en un polipéptido o proteína; y (4) modificación postraduccional de un polipéptido o proteína.

45 *Característica*: como se usa en esta invención, una «característica» se refiere a una característica, una propiedad o un elemento distintivo.

Formulación: como se usa en esta invención, una "formulación" incluye al menos un ácido nucleico modificado o ARNmm y un agente de administración.

50 *Fragmento*: Un "fragmento", como se usa en esta invención, se refiere a una porción. Por ejemplo, los fragmentos de proteínas pueden comprender polipéptidos obtenidos mediante la digestión de proteínas de longitud completa aisladas de células cultivadas.

55 *Funcional*: como se usa en esta invención, una molécula biológica «funcional» es una molécula biológica en una forma en la que presenta una propiedad y/o actividad por la cual se caracteriza.

60 *Homología*: Como se usa en esta invención, el término "homología" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, *por ejemplo*, entre moléculas de ácido nucleico (*por ejemplo*, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptido. En algunos aspectos, se considera que las moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos en un 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %,

80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idénticas o similares. El término «homólogo» se refiere necesariamente a una comparación entre al menos dos secuencias (secuencias de polinucleótidos o polipéptidos). De acuerdo con la descripción, se considera que dos secuencias de polinucleótidos son homólogas si los polipéptidos que codifican son al menos alrededor del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso 99 % para al menos una extensión de al menos 5 aproximadamente 20 aminoácidos. En algunos aspectos, las secuencias de polinucleótidos homólogas se caracterizan por la capacidad de codificar una extensión de al menos 4-5 aminoácidos especificados de forma única. Para las secuencias de polinucleótidos de menos de 60 nucleótidos de longitud, la homología se determina mediante la capacidad de codificar una extensión de al menos 4-5 aminoácidos especificados de forma única. De acuerdo con la descripción, se considera que dos secuencias de proteínas son homólogas si las proteínas son al menos 10 aproximadamente en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % idénticas para al menos una extensión de al menos 15 aproximadamente 20 aminoácidos.

Identidad: como se usa en esta invención, el término "identidad" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, *por ejemplo*, entre moléculas de oligonucleótidos (*por ejemplo*, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de polinucleótidos, por ejemplo, se puede realizar alineando las dos secuencias para fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de ácido nucleico para una alineación óptima y se pueden ignorar secuencias no idénticas para fines de comparación). En determinados aspectos, la longitud de una secuencia alineada a efectos de comparación es al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al 20 menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o el 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación se comparan los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando se ocupa una posición en la primera secuencia por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las 25 secuencias, teniendo en cuenta la cantidad de huecos y la longitud de cada hueco, que debe introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar mediante el uso de procedimientos tales como los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed. Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputación: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed. Academic Press, Nueva York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds. Humana Press, Nueva Jersey, 1994; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991.

30 Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar, alternativamente, mediante el uso del programa GAP en el paquete de software GCG mediante el uso de una matriz NWGapDNA.CMP. Los 35 procedimientos comúnmente empleados para determinar el porcentaje de identidad entre secuencias incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Carillo, H. y Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988). Las técnicas para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Los ejemplos de software informático para determinar la homología entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programa GCG, Devereux, J., y col., Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA Altschul, S. F. y 40 col., J. Molec. Biol., 215, 403 (1990).

Inhibir la expresión de un gen: como se usa en esta invención, la frase "inhibir la expresión de un gen" significa causar una reducción en la cantidad de un producto de expresión del gen. El producto de expresión puede ser un ARN transcrita del gen (*por ejemplo*, un ARNm) o un polipéptido traducido de un ARNm transcrita del gen. Típicamente, 45 una reducción en el nivel de un ARNm da como resultado una reducción en el nivel de un polipéptido traducido de este. El nivel de expresión se puede determinar utilizando técnicas estándar para medir ARNm o proteína.

In vitro: como se usa en esta invención, el término "in vitro" se refiere a eventos que ocurren en un entorno artificial, *por ejemplo*, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, en una placa de Petri, etc., en lugar de dentro de un organismo (*por ejemplo*, animal, planta o microbio).

In vivo: como se usa en esta invención, el término "in vivo" se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo (*por ejemplo*, animal, planta o microbio o célula o tejido de este).

60 *Aislado:* como se usa en esta invención, el término "aislado" se refiere a una sustancia o entidad que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que se asoció (ya sea en la naturaleza o en un entorno experimental). Las sustancias aisladas pueden tener diferentes niveles de pureza en relación con las sustancias de las que se han asociado. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %,

- aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 % o más de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. En algunos aspectos, los agentes aislados son más que aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %,
- 5 aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más que aproximadamente el 99 % puros. Como se usa en esta invención, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. *Sustancialmente aislado*: Por "sustancialmente aislado" se entiende que el compuesto se separa sustancialmente del entorno en el que se formó o se detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en el compuesto de la presente descripción. La separación sustancial puede incluir
- 10 composiciones que contienen al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor del 60 %, al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 97 %, o al menos alrededor del 99 % en peso del compuesto de la presente descripción, o una sal de este. Los procedimientos para aislar compuestos y sus sales son rutinarios en la técnica.
- 15 *Enlazador*: como se usa en esta invención, un enlazador se refiere a un grupo de átomos, por ejemplo, 10-1.000 átomos, y puede estar compuesto por los átomos o grupos tales como, pero no limitado a, carbono, amino, alquilamino, oxígeno, azufre, sulfóxido, sulfonylo, carbonilo e imina. El enlazador se puede unir a un nucleósido o nucleótido modificado en la nucleobase o resto de azúcar en un primer extremo, y a una carga útil, por ejemplo, un agente detectable o terapéutico, en un segundo extremo. El enlazador puede ser de longitud suficiente para no interferir con la incorporación en una secuencia de ácido nucleico. El enlazador se puede utilizar para cualquier propósito útil, tal como formar multímeros de ARNm (por ejemplo, mediante el enlace de dos o más moléculas de ácido nucleico modificado o moléculas de ARNm) o conjugados de ARNm, así como para administrar una carga útil, tal como se describe en esta invención. Los ejemplos de grupos químicos que se pueden incorporar en el enlazador incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alquenilo, alquinilo, amido, amino, éter, tioéter, éster, alquieno, heteroalquieno, arilo o heterociclico, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido, como se describe en esta invención. Los ejemplos de enlazadores incluyen, pero no se limitan a, alcanos insaturados, polietilenglicoles (por ejemplo, unidades monoméricas de etileno o propilenglicol, por ejemplo, dietilenglicol, dipropilenglicol, trietilenglicol, tripripilenglicol, tetraetilenglicol o tetraetilenglicol) y polímeros de dextrano y derivados de los mismos. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, restos escindibles dentro del enlazador, tales como, por ejemplo, un enlace disulfuro (-S-S-) o un enlace azo (-N=N-), que se pueden escindir usando un agente reductor o fotólisis. Los ejemplos no limitantes de un enlace que se puede escindir selectivamente incluyen un enlace amido que se puede escindir, por ejemplo, mediante el uso de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) u otros agentes reductores y/o fotólisis, así como un enlace éster que se puede escindir, por ejemplo, mediante hidrólisis ácida o básica.
- 35 *Sitio de unión de microARN (miARN)*: como se usa en esta invención, un sitio de unión de microARN (miARN) representa una ubicación de nucleótido o región de un transcripto de ácido nucleico al que se une al menos la región "semilla" de un miARN.
- 40 *Modificado*: como se usa en esta invención "modificado" se refiere a un estado o estructura cambiada de una molécula. Las moléculas se pueden modificar de muchas maneras, incluyendo química, estructural y funcionalmente. En aspecto, las moléculas de ARNm se modifican mediante la introducción de nucleósidos y/o nucleótidos no naturales.
- 45 *Moco*: como se usa en esta invención, "moco" se refiere a una sustancia natural que es viscosa y comprende glicoproteínas de mucina.
- 50 *De origen natural*: como se usa en esta invención, "de origen natural" significa que existe en la naturaleza sin ayuda artificial.
- 55 *Vertebrados no humanos*: como se usa en esta invención, un "vertebrado no humano" incluye todos los vertebrados excepto *Homo sapiens*, incluyendo especies salvajes y domesticadas. Los ejemplos de vertebrados no humanos incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, tales como alpaca, banteng, bisonte, camello, gato, ganado, ciervo, perro, burro, gayal, cabra, conejillo de indias, caballo, llama, mulo, cerdo, conejo, reno, búfalo de agua de oveja y yak.
- 60 *Fuera de la diana*: como se usa en esta invención, "fuera de la diana" se refiere a cualquier efecto no deseado en cualquiera de una o más transcripciones de diana, gen o celular.
- 65 *Marco de lectura abierto*: como se usa en esta invención, "marco de lectura abierto" u "ORF" se refiere a una secuencia que no contiene un codón de terminación en un marco de lectura dado.
- 70 *Enlazado operativamente*: como se usa en esta invención, la frase "enlazado operativamente" se refiere a una conexión funcional entre dos o más moléculas, construcciones, transcripciones, entidades, restos o similares.

Paratopo: como se usa en esta invención, un "paratopo" se refiere al sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

Paciente: como se usa en esta invención, "paciente" se refiere a un sujeto que puede buscar o necesitar tratamiento, requiere tratamiento, está recibiendo tratamiento, recibirá tratamiento o un sujeto que está bajo el cuidado de un profesional capacitado para una enfermedad o afección particular.

Péptido: como se usa en esta invención, "péptido" es menor o igual que 50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud.

10 *Farmacéuticamente aceptable:* la frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en esta invención para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance de un juicio médico sólido, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

15 *Excipientes farmacéuticamente aceptables:* la frase "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en esta invención, se refiere a cualquier ingrediente que no sea los compuestos descritos en esta invención (por ejemplo, un vehículo capaz de suspender o disolver el compuesto activo) y que tiene las propiedades de ser sustancialmente no tóxico y no inflamatorio en un paciente. Los excipientes pueden incluir, por ejemplo: antiadherentes, antioxidantes, aglutinantes, recubrimientos, ayudas a la compresión, desintegrantes, colorantes (colores), emolientes, 20 emulsionantes, rellenos (diluyentes), formadores o recubrimientos de película, sabores, fragancias, deslizantes (potenciadores de flujo), lubricantes, conservantes, tintas de impresión, sorbentes, agentes de suspensión o dispersión, edulcorantes y aguas de hidratación. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a: hidroxitolueno butilado (BHT), carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), estearato de calcio, croscarmelosa, polivinilpirrolidona reticulada, ácido cítrico, crospovidona, cisteína, etilcelulosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, lactosa, estearato de magnesio, maltitol, manitol, metionina, metilcelulosa, metilparabeno, celulosa microcristalina, polietenglicol, polivinilpirrolidona, povidona, almidón pregelatinizado, propilparabeno, palmitato de retinilo, goma laca, dióxido de silicio, carboximetilcelulosa sódica, citrato de sodio, almidón glicolato de sodio, sorbitol, almidón (maíz), ácido esteárico, sacarosa, talco, dióxido de titanio, vitamina A, vitamina E, vitamina C y xilitol.

30 *Sales farmacéuticamente aceptables:* la presente descripción también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en esta invención. Como se usa en esta invención, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos donde el compuesto original se modifica mediante la conversión de un ácido o resto base existente a su forma de sal (por ejemplo, mediante la reacción del grupo base libre con un ácido orgánico adecuado). Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales 35 ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfonato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, 40 glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, bromhidrato, clorhidrato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, valerato, sales y similares. Las sales de metales alcalinotérreos o alcalinos representativas incluyen cationes de sodio, litio, potasio, 45 calcio, magnesio y similares, así como amonio no tóxico, amonio cuaternario y amina, que incluyen, pero no se limitan a, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente descripción incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto original formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente descripción se pueden sintetizar a partir del compuesto original que 50 contiene un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a ed., Mack Publishing Company, 55 Easton, Pa., 1985, p. 1418, Sales farmacéuticas: Propiedades, selección y uso, P.H. Stahl y C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, y Berge y col., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977).

60 Solvato farmacéuticamente aceptable: el término "solvato farmacéuticamente aceptable", como se usa en esta invención, significa un compuesto en el que se incorporan moléculas de un solvente adecuado en la red cristalina. Un solvente adecuado es fisiológicamente tolerable a la dosis administrada. Por ejemplo, los solvatos se pueden preparar por cristalización, recristalización o precipitación a partir de una solución que incluye solventes orgánicos, agua o una mezcla de los mismos. Ejemplos de solventes adecuados son etanol, agua (por ejemplo, mono-, di- y trihidratos), N-metilpirrolidinona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), N,N'-dimetilformamida (DMF), N,N'-dimetilacetamida (DMAc), 1,3-dimethyl-2-imidazolidinona (DMEU), 1,3-dimethyl-3,4,5,6-tetrahidro-2-(1H)-pirimidinona (DMPU), acetonitrilo (ACN),

propilenglicol, acetato de etilo, alcohol bencílico, 2-pirrolidona, benzoato de bencilo y similares. Cuando el solvente es agua, el solvato se denomina "hidrato".

Farmacocinética: como se usa en esta invención, "farmacocinética" se refiere a una o más propiedades de una molécula o compuesto en lo que se refiere a la determinación del destino de sustancias administradas a un organismo vivo. La farmacocinética se divide en varias áreas, incluyendo el grado y la tasa de absorción, distribución, metabolismo y excreción. Esto se conoce comúnmente como ADME donde: (A) Absorción es el proceso de una sustancia que entra en la circulación sanguínea; (D) Distribución es la dispersión o diseminación de sustancias a través de los fluidos y tejidos del cuerpo; (M) Metabolismo (o Biotransformación) es la transformación irreversible de compuestos originales en metabolitos hija; y (E) Excreción (o Eliminación) se refiere a la eliminación de las sustancias del cuerpo. En raras ocasiones, algunos fármacos se acumulan irreversiblemente en el tejido corporal.

Efecto farmacológico: como se usa en esta invención, un "efecto farmacológico" es un fenómeno biológico medible en un organismo o sistema que ocurre después de que el organismo o sistema haya estado en contacto o expuesto a un agente exógeno. Los efectos farmacológicos pueden dar lugar a resultados terapéuticamente efectivos, tales como el tratamiento, la mejora de uno o más síntomas, el diagnóstico, la prevención y el retraso de la aparición de una enfermedad, trastorno, afección o infección. La medición de tales fenómenos biológicos puede ser cuantitativa, cualitativa o relativa a otro fenómeno biológico. Las mediciones cuantitativas pueden ser estadísticamente significativas. Las mediciones cualitativas pueden ser por grado o tipo y pueden ser al menos de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más diferentes. Pueden ser observables como presentes o ausentes, mejores o peores, mayores o menores. Los agentes exógenos, cuando se refieren a efectos farmacológicos, son aquellos agentes que son, en todo o en parte, extraños al organismo o sistema. Por ejemplo, las modificaciones a una biomolécula de tipo salvaje, ya sean estructurales o químicas, producirían un agente exógeno. Asimismo, la incorporación o combinación de una molécula de tipo salvaje en o con un compuesto, molécula o sustancia que no se encuentra naturalmente en el organismo o sistema también produciría un agente exógeno. El ARNm modificado comprende agentes exógenos. Los ejemplos de efectos farmacológicos incluyen, pero no se limitan a, alteración en el recuento de células tales como un aumento o disminución de neutrófilos, reticulocitos, granulocitos, eritrocitos (glóbulos rojos), megacariocitos, plaquetas, monocitos, macrófagos del tejido conectivo, células epidérmicas de langerhans, osteoclastos, células dendríticas, células microgliales, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células T auxiliares, células T supresoras, células T citotóxicas, células T asesinas naturales, células B, células asesinas naturales o reticulocitos. Los efectos farmacológicos también incluyen alteraciones en la química de la sangre, pH, hemoglobina, hematocrito, cambios en los niveles de enzimas tales como, entre otras, las enzimas hepáticas AST y ALT, cambios en los perfiles de lípidos, electrolitos, marcadores metabólicos, hormonas u otros marcadores o perfiles conocidos por los expertos en la técnica.

Fisicoquímico: como se usa en esta invención, "fisicoquímico" significa o se relaciona con una propiedad física y/o química.

Prevención: como se usa en esta invención, el término "prevención" se refiere a retrasar parcial o completamente el inicio de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección; retrasar parcial o completamente el inicio de uno o más síntomas, características o manifestaciones clínicas de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección particular; retrasar parcial o completamente el inicio de uno o más síntomas, características o manifestaciones de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección particular; retrasar parcial o completamente el progreso de una infección, una enfermedad, trastorno y/o afección particular; y/o disminuir el riesgo de desarrollar patología asociada con la infección, la enfermedad, el trastorno y/o la afección.

Profármaco: la presente descripción también incluye profármacos de los compuestos descritos en esta invención. Como se usa en esta invención, "profármacos" se refiere a cualquier sustancia, molécula o entidad que se encuentra en una forma predispuesta para que esa sustancia, molécula o entidad actúe como terapéutica tras una alteración química o física. Los profármacos pueden unirse covalentemente o secuestrarse de alguna manera y que liberan o se convierten en el resto de fármaco activo antes, después o tras administrarse a un sujeto mamífero. Los profármacos se pueden preparar modificando los grupos funcionales presentes en los compuestos de tal manera que las modificaciones se escinden, ya sea en la manipulación de rutina o *in vivo*, a los compuestos originales. Los profármacos incluyen compuestos donde los grupos hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo se unen a cualquier grupo que, cuando se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo libre, respectivamente. La preparación y el uso de profármacos se trata en T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 de A.C.S. Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987.

Proliferar: como se usa en esta invención, el término "proliferar" significa crecer, expandirse o aumentar o hacer que crezca, se expanda o aumente rápidamente. "Proliferativo" significa tener la capacidad de proliferar. "Antiproliferativo" significa que tiene propiedades contrarias o no aplicables a las propiedades proliferativas.

Proteínas de interés: como se usa en esta invención, los términos "proteínas de interés" o "proteínas deseadas" incluyen aquellas proporcionadas en esta invención y fragmentos, mutantes, variantes y alteraciones de estas.

5 *Proximal:* como se usa en esta invención, el término "proximal" significa situado más cerca del centro o de un punto o región de interés.

10 Pseudouridina: como se usa en esta invención, pseudouridina se refiere al isómero C-glucósido del nucleósido uridina. Un "análogo de pseudouridina" es cualquier modificación, variante, isoforma o derivado de pseudouridina. Por ejemplo, los análogos de pseudouridina incluyen, entre otros, 1-carboximetil-pseudouridina, 1-propinil-pseudouridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 1-taurinometil-4-tio-pseudouridina, 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 1-metil-4-tio-pseudouridina ($m^1s^4\psi$), 4-tio-1-metil-pseudouridina, 3-metil-pseudouridina ($m^3\psi$), 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina (acp³ ψ) y 2'-O-metil-pseudouridina (ψm).

15 15 *Purificado:* c se usa en este documento, "purificar", "purificado", "purificación" significa hacer sustancialmente puro o claro desde componentes no deseados, contaminación del material, mezcla o imperfección.

20 20 *Muestra:* como se usa en esta invención, el término "muestra" o "muestra biológica" se refiere a un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes (por ejemplo, fluidos corporales, que incluyen pero no se limitan a sangre, moco, líquido linfático, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido amniótico, sangre del cordón amniótico, orina, líquido vaginal y semen). Una muestra puede incluir además un homogeneizado, lisado o extracto preparado a partir de un organismo completo o un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes, o una fracción o parte de estos, que incluye pero no se limita a, por ejemplo, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, las secciones externas de la piel, tractos respiratorios, intestinales y genitourinarios, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores, órganos. Una muestra se refiere además a un medio, tal como un caldo o gel de nutrientes, que puede contener componentes celulares, tal como proteínas o molécula de ácido nucleico.

30 30 *Secuencias de señales:* como se usa en esta invención, la frase "secuencias de señales" se refiere a una secuencia que puede dirigir el transporte o localización de una proteína.

35 35 *Dosis unitaria única:* como se usa en esta invención, una "dosis unitaria única" es una dosis de cualquier agente terapéutico administrado en una dosis/a la vez/vía única/punto de contacto único, es decir, evento de administración única.

40 40 *Similitud:* como se usa en esta invención, el término "similitud" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, *por ejemplo*, entre moléculas de polinucleótidos (*por ejemplo*, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo del porcentaje de similitud de moléculas poliméricas entre sí se puede realizar de la misma manera que un cálculo del porcentaje de identidad, excepto que el cálculo del porcentaje de similitud tiene en cuenta las sustituciones conservadoras como se entiende en la técnica.

45 45 *Dosis dividida:* como se usa en esta invención, una "dosis dividida" es la división de una sola dosis unitaria o dosis diaria total en dos o más dosis.

50 50 *Estable:* como se usa en esta invención "estable" se refiere a un compuesto que es lo suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento a un grado útil de pureza de una mezcla de reacción, y preferentemente capaz de formularse en un agente terapéutico eficaz.

55 55 *Estabilizado:* como se usa en esta invención, el término "estabilizar", "estabilizado", "región estabilizada" significa hacer o volverse estable.

60 60 *Sujeto:* como se usa en esta invención, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo al cual se le puede administrar una composición de la descripción de acuerdo con la descripción, por ejemplo, con fines experimentales, diagnósticos, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y humanos) y/o plantas.

65 65 *Sustancialmente:* como se usa en esta invención, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las artes biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o proceden a completarse o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en esta invención para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

Sustancialmente igual: como se usa en esta invención en lo que se refiere a las diferencias de tiempo entre dosis, el término significa más/menos el 2 %.

5 *Sustancialmente de forma simultánea:* como se usa en esta invención y como se refiere a múltiples dosis, el término significa dentro de 2 segundos.

Que padece: un individuo "que padece" una enfermedad, trastorno y/o afección ha sido diagnosticado con o muestra uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afección.

10 *Susceptible a:* un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno y/o afección no ha sido diagnosticado y/o puede no presentar síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección, pero tiene una propensión a desarrollar una enfermedad o sus síntomas. En algunos aspectos, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, cáncer) puede caracterizarse por uno o más de los siguientes: (1) una mutación genética asociada con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (2) un polimorfismo genético asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (3) aumento y/o disminución de la expresión y/o actividad de una proteína y/o ácido nucleico asociado con la enfermedad, trastorno y/o afección; (4) hábitos y/o estilos de vida asociados con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (5) antecedentes familiares de la enfermedad, trastorno y/o afección; y (6) exposición y/o infección con un microbio asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunos aspectos, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunos aspectos, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

25 *Liberación sostenida:* como se usa en esta invención, el término "liberación sostenida" se refiere a una composición farmacéutica o perfil de liberación de compuesto que se ajusta a una velocidad de liberación durante un período de tiempo específico.

30 *Sintético:* el término "sintético" significa producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. La síntesis de polinucleótidos o polipéptidos u otras moléculas puede ser química o enzimática.

35 *Células diana:* como se usa en esta invención, "células diana" se refiere a una o más células de interés. Las células pueden encontrarse *in vitro*, *in vivo*, *in situ* o en el tejido u órgano de un organismo. El organismo puede ser un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano y más preferentemente un paciente.

40 *Agente terapéutico:* el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico, diagnóstico y/o profiláctico y/o produce un efecto biológico y/o farmacológico deseado.

45 *Cantidad terapéuticamente efectiva:* como se usa en esta invención, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un agente que se va a administrar (por ejemplo, ácido nucleico, fármaco, agente terapéutico, agente de diagnóstico, agente profiláctico, etc.) que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible de padecer una infección, enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, mejorar los síntomas, diagnosticar, prevenir y/o retrasar el inicio de la infección, enfermedad, trastorno y/o afección.

50 *Resultado terapéuticamente efectivo:* como se usa en esta invención, el término "resultado terapéuticamente efectivo" significa un resultado que es suficiente en un sujeto que padece o es susceptible de padecer una infección, enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, mejorar los síntomas, diagnosticar, prevenir y/o retrasar el inicio de la infección, enfermedad, trastorno y/o afección.

55 *Dosis diaria total:* como se usa en esta invención, una "dosis diaria total" es una cantidad dada o prescrita en un período de 24 horas. Puede administrarse como una sola dosis unitaria.

60 *Factor de transcripción:* como se usa en esta invención, el término "factor de transcripción" se refiere a una proteína de unión a ADN que regula la transcripción de ADN en ARN, por ejemplo, mediante la activación o represión de la transcripción. Algunos factores de transcripción afectan a la regulación de la transcripción sola, mientras que otros actúan en conjunto con otras proteínas. Algunos factores de transcripción pueden activar y reprimir la transcripción bajo ciertas condiciones. En general, los factores de transcripción se unen a una secuencia diana específica o secuencias altamente similares a una secuencia de consenso específica en una región reguladora de un gen diana. Los factores de transcripción pueden regular la transcripción de un gen diana solo o en un complejo con otras moléculas.

65 *Tratamiento:* como se usa en esta invención, el término "tratamiento" se refiere a aliviar parcial o completamente,

mejorar, favorecer, aliviar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección particular. Por ejemplo, "tratar" el cáncer puede referirse a la inhibición de la supervivencia, el crecimiento y/o la propagación de un tumor. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que no exhibe signos de una enfermedad, trastorno y/o afección y/o a un sujeto que exhibe solo signos tempranos de una enfermedad, trastorno y/o afección con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad, trastorno y/o afección.

5 *No modificado:* como se usa en esta invención, "no modificado" se refiere a cualquier sustancia, compuesto o molécula antes de ser cambiado de cualquier manera. No modificado puede, pero no siempre, referirse al tipo salvaje o la forma nativa de una biomolécula. Las moléculas pueden sufrir una serie de modificaciones mediante las cuales cada molécula modificada puede servir como la molécula de partida "no modificada" para una modificación posterior.

10 En las reivindicaciones, los artículos tales como «un», «una» y «el/la» pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o que sea evidente a partir del contexto. Las 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 en, empleados en o de otra manera relevantes para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o de otra manera sea evidente a partir del contexto. La descripción incluye aspectos en los que exactamente un miembro del grupo está presente en, empleado en, o de otra manera relevante a un producto o proceso dado. La descripción incluye aspectos en los que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en, o de otro modo relevantes para un producto o proceso dado.

15 También se observa que se pretende que el término "que comprende" sea abierto y permita la inclusión de elementos o etapas adicionales.

20 **25** Cuando se dan intervalos, se incluyen los puntos finales. Además, se debe entender que, a menos que se indique lo contrario o que sea evidente a partir del contexto y la comprensión de un experto en la materia, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor o subintervalo específico dentro de los intervalos indicados en diferentes aspectos de la descripción a la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

30 Los títulos de las secciones y tablas no pretenden ser limitativos.

EJEMPLOS

35 **Ejemplo 1. Producción de ARNm modificado**

Los ARNm modificados (ARNmm) se pueden elaborar utilizando procedimientos y materiales de laboratorio estándar. El marco de lectura abierto (ORF) del gen de interés puede estar flanqueado por una región no traducida 5' (UTR) que puede contener una fuerte señal de iniciación de traducción de Kozak y/o una UTR 3' alfa-globina que puede incluir una secuencia oligo(dT) para la adición de una cola de poliA.

40 Los ARNm modificados pueden modificarse para reducir la respuesta inmunitaria innata celular. Las modificaciones para reducir la respuesta celular pueden incluir pseudouridina (ψ) y 5-metil-citidina (5meC o m⁵C). (Véase, Kariko K y col. *Immunity* 23:165-75 (2005), Kariko K y col. *Mol Ther* 16:1833-40 (2008), Anderson BR y col. *NAR* (2010)

45 El ORF también puede incluir varias adiciones aguas arriba o aguas abajo (tal como, pero no limitado a, β -globina, etiquetas, etc.) se pueden ordenar desde un servicio de optimización tal como, pero limitado a, DNA2.0 (Menlo Park, CA) y puede contener múltiples sitios de clonación que pueden tener reconocimiento XbaI. Tras la recepción del ADN plasmídico, puede reconstituirse y transformarse en *E. coli* químicamente competente.

50 Se utiliza *E. coli* NEB DH5-alfa competente. Las transformaciones se realizan según las instrucciones de NEB utilizando 100 ng de plásmido. El protocolo es el siguiente:

55 1. Descongelar un tubo de células de *E. coli* NEB 5-alfa Competent en hielo durante 10 minutos.

2. Añadir 1-5 μ l que contenga 1 pg-100 ng de ADN de plásmido a la mezcla celular. Con cuidado, mover el tubo 4-5 veces para mezclar las células y el ADN. No hacer vórtices.

3. Colocar la mezcla en hielo durante 30 minutos. No mezclar.

60 4. Calentar el choque a 42 °C durante exactamente 30 segundos. No mezclar.

5. Colocar en hielo durante 5 minutos. No mezclar.
6. Pipetear 950 µl de SOC a temperatura ambiente en la mezcla.
- 5 7. Colocar a 37 °C durante 60 minutos. Agitar vigorosamente (250 rpm) o girar.
8. Calentar las placas de selección a 37 °C.
- 10 9. Mezclar bien las células moviendo el tubo e invirtiendo.
- Extender 50-100 µl de cada dilución en una placa de selección e incubar durante la noche a 37 °C. Alternativamente, incubar a 30 °C durante 24-36 horas o 25 °C durante 48 horas.
- 15 A continuación, se usa una sola colonia para inocular 5 ml de medio de crecimiento LB usando el antibiótico apropiado y, a continuación, se deja crecer (250 RPM, 37 °C) durante 5 horas. A continuación, se utiliza para inocular un medio de cultivo de 200 ml y se deja crecer durante la noche en las mismas condiciones.
- 20 Para aislar el plásmido (hasta 850 µg), se realiza una preparación máxima utilizando el Kit Invitrogen PURELINK™ HiPure Maxiprep (Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Con el fin de generar ADNc para la transcripción *in vitro* (IVT), el plásmido (un ejemplo de lo cual se muestra en la figura 3) se linealiza primero usando una enzima de restricción tal como XbaI. Un resumen de restricción típico con XbaI comprenderá lo siguiente: Plásmido 1,0 µg; 10x Tampón 1,0 µl; XbaI 1,5 µl; dH₂O hasta 10 µl; incubado a 37 °C durante 1 hora Si se realiza a escala de laboratorio (< 5 µg), la reacción se limpia utilizando el Micro Kit de PCR PURELINK™ de Invitrogen (Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Es posible que sea necesario realizar purificaciones a mayor escala con un producto que tenga una mayor capacidad de carga, como el kit de PCR PURELINK™ estándar de Invitrogen (Carlsbad, CA). Despues de la limpieza, el vector linealizado se cuantifica usando NanoDrop y se analiza para confirmar la linealización usando electroforesis en gel de agarosa.
- 30 Los procedimientos descritos en esta invención para producir ARNm modificado pueden usarse para producir moléculas de todos los tamaños, incluidas moléculas largas. Se ha producido ARNm modificado usando los procedimientos descritos para moléculas de diferentes tamaños, incluyendo glucosidasa, alfa; ácido (GAA) (3,2 kb), regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) (4,7 kb), factor VII (7,3 kb), lipasa ácida lisosomal (45,4 kDa), glucocerebrosidasa (59,7 kDa) e iduronato 2-sulfatasa (76 kDa).
- 35 Como ejemplo no limitativo, G-CSF puede representar el polipéptido de interés. Las secuencias utilizadas en las etapas descritas en los Ejemplos 1-5 se muestran en la Tabla 4. Cabe señalar que el codón de inicio (ATG) se ha subrayado en cada secuencia de la Tabla 4.
- 40

Tabla 4. Secuencias G-CSF

SEQ NO	ID	Descripción
3		<p>Secuencia de ADNc:</p> <p><u>ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAG</u> <u>CTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTCAGGAAGCCACCCC</u> <u>CTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCAGAGCTTCCCTGCTCAAGTGCTTAG</u> <u>AGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCAGGAGAAG</u> <u>CTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTC</u> <u>GGACACTCTGGCATCCCTGGCTCCCTGAGCAGCTGCCAGGCC</u> <u>AGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGTTGAGCCAACCTCCATAGCGGCCCTTT</u> <u>CCTCTACCAGGGGCTCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCGAGTT</u> <u>GGGTCCCACCTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTGCCAC</u> <u>CACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCTGCCCTGCA</u> <u>GCCCACCCAGGGTGCATGCCGGCCTCGCCTCTGCTTCCAGCGCCGG</u> <u>GCAGGAGGGTCTGGTTGCCATCTGCAGAGCTTCCGGAGGTG</u> <u>TCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCAGCCCTGA</u></p>

SEQ NO	ID	Descripción
4		ADNc que tiene sitio de polimerasa T7, el sitio de restricción Afel y Xba: TAATACCGACTCACTATA GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC <u>ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAG</u> CTGCTGCTGTGGCACAGTCAGTCACTCTGGACAGTCAGGAAGCCACCCCC CTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCAGAGCTTCTGCTCAAGTGCTTAG AGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAG CTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTCTGCTC GGACACTCTCTGGCATCCCCTGGCTCCCTGAGCAGCTGCCAGGCC AGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCCATAGCGGCCCTTT CCTCTACCAGGGGCTCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCGAGTT GGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTGCCGACTTGCAC CACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCTGCCCTGCA GCCCACCCAGGGTGCATGCCGGCCTCGCCTCTGCTTCCAGCGCCGG GCAGGAGGGGCTGGTGCCTCCATCTGCAGAGCTTCCGGAGGTG TCGTACCGCTTCTACGCCACCTTGCCTGCCCAGCCCTGA AGCGCTGCCTTCTGCAGGGCTTGCCTCTGCCATGCCCTCTCTCC CTTGCACCTGTACCTCTGGTCTTGAATAAACGCTGAGTAGGAAGGCG GCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
5		Secuencia optimizada; que contiene el sitio de polimerasa T7, el sitio de restricción Afel y Xba TAATACCGACTCACTATA GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC <u>ATGGCCGGTCCCGCAGCCAAAGCCCCATGAAACTTATGGCCCTGCAG</u> TTGCTGCTTGGCACTGCCCTCTGGACAGTCAGTCCAAGAACGCACTCCTC TCGGACCTGCCTCATCGTGCAGTCATTCTTTGAAGTGTCTGGA GCAGGGTGCAGAAGATTCAAGGGCGATGGAGGCCGACTCCAAGAGAAC TCTGCAGCATAAAACTTGCATCCCGAGGAGCTCGTACTGCTCGG GCACAGCTGGGATTCCCTGGGCTCTCTCGTCTGTCCCGTCAG GCTTGCAGTGGCAGGGTGCCTTCCCAGCTCCACTCCGGTTGTTCTT GTATCAGGGACTGCTGCAAGCCCTGAGGGAAATCTGCCAGAACATTGGG CCCGACGCTGGACACGTTGCAGCTCGACGTGGCGGATTCGCAACAAC CATCTGGCAGCAGATGGAGGAACGGGGATGGCACCCGCGCTGCAGCC CACGCAGGGGCAATGCCGGCTTGCCTCGTCCAGCGCAGGGC GGGTGGAGTCCTCGTAGCGAGCCACCTCAATCATTGGAAAGTCTCG TACCGGGTGCAGACATCTGCAGCCGTGA AGCGCTGCCTTCTGCAGGGCTTGCCTCTGCCATGCCCTCTCTCC CTTGCACCTGTACCTCTGGTCTTGAATAAACGCTGAGTAGGAAGGCG GCCGCTCGAGCATGCATCTAGA
6		Secuencia de ARNm (transcrita) GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAUAUAAGAGCCAC C <u>AUGGCCGGUCCCCGCGACCCAAAGCCCCAUUACUUAUGGCCUGCA</u>

SEQ NO	ID	Descripción
		GUUGCUGCUUUGGCACUCGGCCCUCUGGACAGUCCAAGAAGCGACUC CUCUCGGACCUGCCUCAUCGUUGCCGCAGUCAUCCUUUGAAGUGU CUGGAGCAGGUGCGAAAGAUUCAGGGCGAUGGAGCCGCACUCCAAG AGAACGUCUGCGCGACAUAACAAACUUUGCCAUCCCGAGGAGCUCGUA CUCGUUCGGGCACAGCUUGGGAUUCCCUGGGCUCCUCUCGUCCUG UCCGUUCGCAGGCCUUGCAGUUGGCAGGGUGCCUUUCCCAGCUCCACU CCGGUUUGUUCUUGUAUCAGGGACUGCUGCAAGCCCUUGAGGGAAU CUCGCCAGAAUUGGGCCCGACGCUGGACACGUUGCAGCUCGACGUGG CGGAUUUCGCAACAAACCAUCUGGCAGCAGAUGGAGGAACUGGGGAU GGCACCCGCGCUGCAGCCCACGCAGGGGGCAAUGCCGGCCUUUGCGU CCGCGUUUCAGCGCAGGGCGGGUGGAGUCCUCGUAGCGAGGCCACCUU CAAUCAUUUUUGGAAGUCUCGUACCGGGUGCUGAGACAUCUUGCGC AGCCGUGA AGCGCUGCCUUCUGCGGGGUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUC UCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUUUAAAAGCCUGAGUAGGA AG

Ejemplo 2: PCR para la producción de ADNc

- Los procedimientos de PCR para la preparación de ADNc se realizan utilizando 2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix de Kapa Biosystems (Woburn, MA). Este sistema incluye 2x KAPA ReadyMix 12,5 µl; cebador directo (10 uM) 0,75 µl; cebador inverso (10 uM) 0,75 µl; ADNc de plantilla 100 ng; y dH₂O diluido a 25,0 µl. Las condiciones de reacción son a 95° C durante 5 minutos y 25 ciclos de 98° C durante 20 segundos, a continuación 58° C durante 15 segundos, a continuación 72° C durante 45 segundos, a continuación 72° C durante 5 minutos y a continuación 4° C hasta la terminación.
- El cebador inverso incorpora una poli-T₁₂₀ para una poli-A₁₂₀ en el ARNm. Se pueden usar otros cebadores inversos con tractos de poli-T más largos o más cortos para ajustar la longitud de la cola de poli-A en el ARNm.
- La reacción se limpia con el Micro Kit de PCR PURELINK™ de Invitrogen (Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante (hasta 5 µg). Las reacciones más grandes requerirán una limpieza utilizando un producto con una mayor capacidad. Después de la limpieza, el ADNc se cuantifica usando NANODROP™ y se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar que el ADNc es el tamaño esperado. A continuación, el ADNc se somete a análisis de secuenciación antes de proceder a la reacción de transcripción *in vitro*.

Ejemplo 3. Transcripción in vitro

La reacción de transcripción *in vitro* genera ARNm que contiene nucleótidos modificados o ARN modificado. La mezcla de nucleótido trifosfato de entrada (NTP) se realiza internamente utilizando NTP naturales y no naturales.

- Una reacción de transcripción *in vitro* típica incluye lo siguiente:

Plantilla de ADNc	1,0 µg
10x tampón de transcripción (Tris-HCl 400 mM pH 8.0, MgCl ₂ 190 mM, DTT 50 mM, espermidina 10 mM)	2,0 µl
NTP personalizados (25 mM cada uno)	7,2 µl
Inhibidor de RNasa	20 U
ARN polimerasa T7	3000 U
dH ₂ O Incubación a 37° C	Hasta 20,0 µl, e durante 3 h-5 h.

La mezcla de IVT cruda se puede almacenar a 4° C durante la noche para su limpieza al día siguiente. A continuación, se utiliza 1 U de DNasa libre de RNasa para digerir la plantilla original. Después de 15 minutos de incubación a 37° C,

el ARNm se purifica utilizando el kit MEGACLEAR™ de Ambion (Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit puede purificar hasta 500 µg de ARN. Después de la limpieza, el ARN se cuantifica utilizando NanoDrop y se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar que el ARN es del tamaño adecuado y que no se ha producido degradación del ARN.

5

Ejemplo 4. Recubrimiento enzimático de ARNm

El recubrimiento del ARNm se realiza de la siguiente manera cuando la mezcla incluye: ARN IVT 60 µg-180 µg y dH₂O hasta 72 µl. La mezcla se incuba a 65° C durante 5 minutos para desnaturizar el ARN y, a continuación, se transfiere 10 inmediatamente al hielo.

A continuación, el protocolo implica la mezcla de 10x de tampón de recubrimiento (0,5 M de Tris-HCl (pH 8.0), 60 mM de KCl, 12,5 mM de MgCl₂) (10,0 µl); 20 mM de GTP (5,0 µl); 20 mM de S-adenosil metionina (2,5 µl); inhibidor de RNasa (100 U); 2'-O-metiltransferasa (400 U); enzima de recubrimiento de Vaccinia (Guanilil transferasa) (40 U); dH₂O (hasta 28 µl); e incubación a 37 °C durante 30 minutos para 60 µg de ARN o hasta 2 horas para 180 µg de ARN.

A continuación, el ARNm se purifica utilizando el kit MEGACLEAR™ de Ambion (Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la limpieza, el ARN se cuantifica utilizando NANODROP™ (ThermoFisher, Waltham, MA) y se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar que el ARN es del tamaño adecuado y que no se ha producido degradación del ARN. El producto de ARN también se puede secuenciar mediante la ejecución de una PCR de transcripción inversa para generar el ADNc para la secuenciación.

Ejemplo 5. Reacción de cola PoliA

25 Sin un poli-T en el ADNc, se debe realizar una reacción de cola poli-A antes de limpiar el producto final. Esto se hace mezclando ARN IVT recubierto (100 µl); inhibidor de RNasa (20 U); tampón de cola 10x (Tris-HCl 0,5 M (pH 8.0), NaCl 2,5 M, MgCl₂ 100 mM)(12,0 µl); ATP 20 mM (6,0 µl); polimerasa Poli-A (20 U); dH₂O hasta 123,5 µl e incubación a 37 °C durante 30 min. Si la cola de poli-A ya está en la transcripción, entonces la reacción de cola puede omitirse y proceder directamente a la limpieza con el kit MEGACLEAR™ de Ambion (Austin, TX) (hasta 500 µg). La polimerasa 30 Poli-A es preferentemente una enzima recombinante expresada en levadura.

Para los estudios realizados y descritos en esta invención, la cola de poli-A se codifica en la plantilla IVT para comprender 160 nucleótidos de longitud. Sin embargo, debe entenderse que la procesividad o integridad de la reacción de cola de poli-A puede no siempre resultar exactamente en 160 nucleótidos. Por lo tanto, las colas de poli-A de 35 aproximadamente 160 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 150-165, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 o 165 se abarcan también.

Ejemplo 6. Tapas 5' naturales y análogos de tapa 5'

40 El recubrimiento 5' del ARN modificado se puede completar de manera concomitante durante la reacción de transcripción in vitro usando los siguientes análogos químicos de tapa de ARN para generar la estructura de tapa de 5'-guanosina según los protocolos del fabricante: 3'-O-Me-m7G(5')ppp (5') G [la tapa ARCA];G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m7G(5')ppp(5')A; m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). El recubrimiento 5' del ARN modificado puede completarse después de la transcripción utilizando una enzima de recubrimiento del virus Vaccinia 45 para generar la estructura "Tapa 0": m7G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). La estructura Tapa 1 se puede generar utilizando tanto la enzima de recubrimiento del virus Vaccinia como una 2'-O metil-transferasa para generar: m7G(5')ppp(5')G-2'-O-metilo. La estructura de Tapa 2 puede generarse a partir de la estructura Tapa 1 seguida de la 2'-O-metilación del 5'-antepenúltimo nucleótido utilizando una 2'-O metiltransferasa. La estructura Tapa 50 3 puede generarse a partir de la estructura Tapa 2 seguida de la 2'-O-metilación del 5'-preantepenúltimo nucleótido utilizando una 2'-O metiltransferasa. Las enzimas se derivan preferentemente de una fuente recombinante.

Cuando se transfecan en células de mamífero, los ARNm modificados tienen una estabilidad de entre 12 y 18 horas o más de 18 horas, por ejemplo, 24, 36, 48, 60, 72 o más de 72 horas.

55

Ejemplo 7. Recubrimiento

A. Ensayo de expresión de proteína

60 ARNm sintéticos que codifican G-CSF humano (ADNc mostrado en la SEQ ID NO: 5; secuencia de ARNm totalmente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina que se muestra en la SEQ ID NO: 6 con una cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos de longitud no mostrada en la secuencia)

que contiene el análogo de tapa ARCA (3' O-Me-m7G(5')ppp(5')G) o la estructura Tapa1 se puede transfectar en queratinocitos primarios humanos a concentraciones iguales. 6, 12, 24 y 36 horas después de la transfección, la cantidad de G-CSF secretada en el medio de cultivo puede ensayarse mediante ELISA. Los ARNm sintéticos que secretan niveles más altos de G-CSF en el medio corresponderían a un ARNm sintético con una estructura de Tapa más competente en traducción.

B. Síntesis de análisis de pureza

ARNm sintéticos que codifican G-CSF humano (ADNc mostrado en la SEQ ID NO: 5; secuencia de ARNm totalmente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina que se muestra en la SEQ ID NO: 6 con una cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos en longitud no mostrada en la secuencia) que contienen el análogo de tapa ARCA o los productos de síntesis en bruto de estructura Tapa1 se pueden comparar en cuanto a pureza mediante electroforesis en gel de agarosa-urea desnaturizante o análisis HPLC. Los ARNm sintéticos con una sola banda consolidada por electroforesis corresponden al producto de mayor pureza en comparación con un ARNm sintético con múltiples bandas o bandas en rayas. Los ARNm sintéticos con un solo pico de HPLC también corresponderían a un producto de mayor pureza. La reacción de recubrimiento con una mayor eficiencia proporcionaría una población de ARNm más pura.

C. Análisis de citoquinas

ARNm sintéticos que codifican G-CSF humano (ADNc mostrado en la SEQ ID NO: 5; secuencia de ARNm totalmente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina que se muestra en la SEQ ID NO: 6 con una cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos de longitud no mostrada en la secuencia) que contiene el análogo de tapa ARCA o la estructura Tapa1 se puede transfectar en queratinocitos primarios humanos en múltiples concentraciones. 6, 12, 24 y 36 horas después de la transfección, la cantidad de citoquinas proinflamatorias tales como TNF-alfa e IFN-beta secretadas en el medio de cultivo, puede analizarse mediante ELISA. Los ARNm sintéticos que secretan niveles más altos de citoquinas proinflamatorias en el medio corresponderían a un ARNm sintético que contiene una estructura de tapa activadora del sistema inmunitario.

D. Eficiencia de la reacción de recubrimiento

ARNm sintéticos que codifican G-CSF humano (ADNc mostrado en la SEQ ID NO: 5; secuencia de ARNm completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina que se muestra en la SEQ ID NO: 6 con una cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos de longitud no se muestra en la secuencia) que contiene el análogo de tapa ARCA o la estructura Tapa1 se puede analizar para determinar la eficiencia de la reacción caperuza mediante LC-MS después del tratamiento con nucleasa de ARNm recubierta. El tratamiento con nucleasa de los ARNm recubiertos produciría una mezcla de nucleótidos libres y la estructura de tapa de 5'-5-trifosfato con recubrimiento detectable por LC-MS. La cantidad de producto recubierto en los espectros de LC-MS se puede expresar como un porcentaje del ARNm total de la reacción y correspondería a la eficiencia de la reacción de recubrimiento. La estructura de tapa con mayor eficiencia de reacción de recubrimiento tendría una mayor cantidad de producto recubierto por LC-MS.

Ejemplo 8. Electroforesis en gel de agarosa de ARN modificado o productos de RT PCR

Los ARN modificados individuales (200-400 ng en un volumen de 20 µl) o los productos de PCR transcritos inversamente (200-400 ng) se cargan en un pocillo en un E-Gel de agarosa al 1,2 % no desnaturizante (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se ejecutan durante 12-15 minutos según el protocolo del fabricante.

Ejemplo 9. Formulación de ARNm modificado utilizando lipidoídes

Los ARNm modificados (ARNmm) se formulan para experimentos *in vitro* mezclando el ARNmm con el lipidoide en una proporción establecida antes de agregarlo a las células. La formulación *in vivo* puede requerir la adición de ingredientes adicionales para facilitar la circulación por todo el cuerpo. Para probar la capacidad de estos lipidoídes para formar partículas adecuadas para el trabajo *in vivo*, se usó como punto de partida un proceso de formulación estándar usado para formulaciones de siARN-lipidoídes. Las formulaciones iniciales de ARNmm-lipidoide pueden consistir en partículas compuestas de 42 % de lipidoide, 48 % de colesterol y 10 % de PEG, siendo posible una mayor optimización de las proporciones. Después de la formación de la partícula, se agrega ARNmm y se permite que se integre con el complejo. La eficiencia de encapsulación se determina usando un ensayo estándar de exclusión de colorantes.

Materiales y procedimientos para los Ejemplos 10-14**A. Síntesis de lípidos**

- Se sintetizaron seis lípidos, DLin-DMA, DLin-K-DMA, DLin-KC2-DMA, 98N12-5, C12-200 y DLin-MC3-DMA, mediante procedimientos descritos en la técnica para formularlos con ARN modificado. Se sintetizaron DLin-DMA y precursores como se describe en Heyes y col., J. Control Release, 2005, 107, 276-287. DLin-K-DMA y DLin-KC2-DMA y precursores se sintetizaron como se describe en Semple y col., Nature Biotechnology, 2010, 28, 172-176. 98N12-5 y el precursor se sintetizaron como se describe en Akinc y col., Nature Biotechnology, 2008, 26, 561-569.
- 5 C12-200 y precursores se sintetizaron según el procedimiento descrito en Love y col., PNAS, 2010, 107, 1864-1869.
- 10 Se añadió 2-epoxidodecano (5,10 g, 27,7 mmol, 8,2 eq) a un vial que contenía Amine 200 (0,723 g, 3,36 mmol, 1 eq) y una barra agitadora. El vial se selló y se calentó a 80 °C. La reacción se agitó durante 4 días a 80 °C. A continuación, la mezcla se purificó por cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de diclorometano puro (DCM) a DCM:MeOH 98:2. El compuesto diana se purificó adicionalmente por RP-HPLC para proporcionar el compuesto deseado.
- 15 DLin-MC3-DMA y los precursores se sintetizaron según los procedimientos descritos en el documento WO 2010054401. Una mezcla de metanol de dilinoleilo (1,5 g, 2,8 mmol, 1 eq), ácido N,N-dimetilaminobutírico (1,5 g, 2,8 mmol, 1 eq), DIPEA (0,73 mL, 4,2 mmol, 1,5 eq) y TBTU (1,35 g, 4,2 mmol, 1,5 eq) en 10 mL de DMF se agitó durante 20 10 h a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó en éter y se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhídrico, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando un gradiente de DCM a DCM:MeOH 98:2. Posteriormente, el compuesto diana se sometió a una purificación adicional por RP-HPLC que se realizó utilizando una columna YMC - Pack C4 para producir el compuesto diana.

B. Formulación de nanopartículas de ARN modificadas

- Soluciones de lípidos sintetizados, 1,2-diestearoil-3-fosfatidilcolina (DSPC) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), colesterol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) y α -[3'-(1,2- dimiristoil-3-propanoxi)-carboxamida-propil]- ω -metoxipolioxietileno (PEG-c-DOMG) (NOF, Bouwelven, Bélgica) se prepararon a concentraciones de 50 mM en etanol y se almacenaron a -20 °C. Los lípidos se combinaron para producir una relación molar de 50:10:38,5:1,5 (Lípido: DSPC: Colesterol: PEG-c-DOMG) y se diluyeron con etanol hasta una concentración lipídica final de 25 mM. Las soluciones de ARNm modificado a una concentración de 1-2 mg/ml en agua se diluyeron en tampón de citrato de sodio 50 mM a un pH de 3 para formar una solución madre de ARNm modificado. Se prepararon formulaciones del lípido y el ARNm modificado combinando la solución lipídica sintetizada con la solución de ARNm modificado en una relación en peso de lípido total a ARNm modificado de 10:1, 15:1, 20:1 y 30:1. La solución etanólica de lípidos se inyectó rápidamente en una solución acuosa modificada de ARNm para obtener una suspensión que contenía 33 % de etanol. Las soluciones se inyectaron manualmente (MI) o con la ayuda de una bomba de jeringa (SP) (Harvard Pump 33 Dual Syringe Pump Harvard Apparatus Holliston, MA).
- 30 40 Para eliminar el etanol y lograr el intercambio de tampón, las formulaciones se dializaron dos veces frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.4, en volúmenes 200 veces mayores que el producto primario, utilizando cassettes Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford , IL) con un límite de peso molecular (MWCO) de 10 KD. La primera diálsis se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 3 horas y, a continuación, las formulaciones se dializaron durante la noche a 4 °C. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró a través de un filtro estéril de 45 0,2 μ m (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) en viales de vidrio y se selló con un cierre de presión.

C. Caracterización de formulaciones

- 50 Se utilizó un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para determinar el tamaño de partícula, el índice de polidispersión (PDI) y el potencial zeta de las nanopartículas de ARNm modificadas en IX PBS para determinar el tamaño de partícula y 15 mM PBS en determinación del potencial zeta.
- 55 Se utilizó espectroscopia ultravioleta-visible para determinar la concentración de la formulación de nanopartículas de ARNm modificado. Se añadieron 100 μ L de la formulación diluida en IX PBS a 900 μ L de una mezcla 4:1 (v/v) de metanol y cloroformo. Después de mezclar, se registró el espectro de absorbancia de la solución entre 230 nm y 330 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). La concentración de ARN modificado en la formulación de nanopartículas se calculó en función del coeficiente de extinción del ARN modificado utilizado en la formulación y de la diferencia entre la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y el valor de referencia a una longitud de onda de 330 nm.
- 60 60 Se utilizó el ensayo de ARN QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA) para evaluar la encapsulación del ARN modificado por la nanopartícula. Las muestras se diluyeron a una concentración de

aproximadamente 5 µg/ml en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5). Se transfirieron 50 µL de las muestras diluidas a una placa de poliestireno de 96 pocillos, a continuación se agregaron 50 µL de tampón TE o 50 µL de una solución Triton X-100 al 2 %. La placa se incubó a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos. El reactivo RIBOGREEN® se diluyó 1:100 en tampón TE, se agregaron 100 µL de esta solución a cada pocillo. La intensidad de la fluorescencia se midió utilizando un lector de placas de fluorescencia (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) a una longitud de onda de excitación de ~480 nm y una longitud de onda de emisión de ~520 nm. Los valores de fluorescencia del blanco de reactivo se restaron de los de cada una de las muestras y el porcentaje de ARN libre modificado se determinó dividiendo la intensidad de fluorescencia de la muestra intacta (sin adición de Triton X-100) por el valor de fluorescencia de la muestra fragmentada (causada por la adición de Triton X-100).

10

D. Incubación *in vitro*

Se sembraron células epiteliales de riñón embrionario humano (HEK293) y células epiteliales de carcinoma hepatocelular (HepG2) (LGC Standards GmbH, Wesel, Alemania) en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Alemania) y las placas para células HEK293 se cubrieron previamente con colágeno tipo 1. Se sembraron HEK293 a una densidad de 30.000 y HepG2 a una densidad de 35.000 células por pocillo en 100 µL de medio de cultivo celular. Para HEK293 el medio de cultivo celular fue DMEM, FCS al 10 %, añadiendo L-Glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 1 x aminoácidos no esenciales (Biochrom AG, Berlín, Alemania) y bicarbonato de sodio 1,2 mg/ml (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) y para HepG2 el medio de cultivo fue MEM (Gibco Life Technologies, Darmstadt, Alemania), FCS al 10 % añadiendo L-Glutamina 2mM, Sodiopiruvato 1 mM y 1x aminoácidos no esenciales (Biochrom AG, Berlín, Alemania). Formulaciones que contienen ARNm de mCherry (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en secuencia; tapa 5', Tapa1); se agregaron por cuadruplicado directamente después de sembrar las células y se incubaron. El ADNc de mCherry con el promotor T7, región 5' no traducida (UTR) y 3' UTR utilizada en la transcripción *in vitro* (IVT) se proporciona en la SEQ ID NO: 8. El ARNm de mCherry se modificó con 5meC en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina.

Las células se recolectaron transfiriendo los sobrenadantes de los medios de cultivo a una placa de fondo en U Pro-Bind de 96 pocillos (Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania). Las células se tripsinizaron con ½ volumen de tripsina/EDTA (Biochrom AG, Berlín, Alemania), se combinaron con los sobrenadantes respectivos y se fijaron añadiendo un volumen de PBS/FCS al 2 % (ambos Biochrom AG, Berlín, Alemania)/formaldehído al 0,5 % (Merck, Darmstadt, Alemania). A continuación, las muestras se sometieron a una medición de citómetro de flujo con un láser de excitación de 532 nm y el filtro 610/20 para PE-Texas Red en un citómetro LSRII (Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania). La intensidad de fluorescencia media (MFI) de todos los eventos y la desviación estándar de cuatro pocillos independientes se presentan para las muestras analizadas.

Ejemplo 10. Purificación de formulaciones de nanopartículas

Se probaron formulaciones de nanopartículas de DLin-KC2-DMA y 98N12-5 en HEK293 y HepG2 para determinar si la intensidad fluorescente media (MFI) dependía de la proporción de lípidos a ARN modificado y/o de la purificación. Se produjeron tres formulaciones de DLin-KC2-DMA y dos formulaciones de 98N12-5 usando una bomba de jeringa según las especificaciones descritas en la Tabla 5. Las muestras purificadas se purificaron con SEPHADEX™ G-25 grado ADN (GE Healthcare, Suecia). Cada formulación antes y después de la purificación (aP) se analizó a una concentración de 250 ng de ARN modificado por pocillo en una placa de 24 pocillos. El porcentaje de células que son positivas para el marcador del canal FL4 (% FL4 positivo) cuando se analizan con el citómetro de flujo para cada formulación y la muestra de fondo y el MFI del marcador para el canal FL4 para cada formulación y la muestra de fondo se muestran en la Tabla 6. Las formulaciones que se habían purificado tenían un MFI ligeramente más alto que aquellas formulaciones ensayadas antes de la purificación.

50

Table 5. Formulaciones

Formulación #	Lípido	Lípido/ARN en peso/en peso	Tamaño medio (nm)
NPA-001-1	DLin-KC2-DMA	10	155 nm
			PDI: 0,08
NPA-001-1 aP	DLin-KC2-DMA	10	141 nm
			PDI: 0,14
NPA-002-1	DLin-KC2-DMA	15	140 nm
			PDI: 0,11
NPA-002-1 aP	DLin-KC2-DMA	15	125 nm
			PDI: 0,12
NPA-003-1	DLin-KC2-DMA	20	114 nm

Formulación #	Lípido	Lípido/ARN en peso/en peso	Tamaño medio (nm)
			PDI: 0,08
NPA-003-1 aP	DLin-KC2-DMA	20	104 nm
			PDI: 0,06
NPA-005-1	98N12-5	15	127 nm
			PDI: 0,12
NPA-005-1 aP	98N12-5	15	134 nm
			PDI: 0,17
NPA-006-1	98N12	20	126 nm
			PDI: 0,08
NPA-006-1 aP	98N12	20	118 nm
			PDI: 0,13

Tabla 6. HEK293 y HepG2, 24 pocillos, 250 ng de ARN modificado/pocillo

Formulación	% FL4-positivo		FL4 MFI	
	HEK293	HepG2	HEK293	HepG2
No tratado	0,33	0,40	0,25	0,30
NPA-001-1	62,42	5,68	1,49	0,41
NPA-001-ap	87,32	9,02	3,23	0,53
NPA-002-1	91,28	9,90	4,43	0,59
NPA-002-ap	92,68	14,02	5,07	0,90
NPA-003-1	87,70	11,76	6,83	0,88
NPA-003-ap	88,88	15,46	8,73	1,06
NPA-005-1	50,60	4,75	1,83	0,46
NPA-005-ap	38,64	5,16	1,32	0,46
NPA-006-1	54,19	13,16	1,30	0,60
NPA-006-ap	49,97	13,74	1,27	0,61

Ejemplo 11. Curva de respuesta de concentración

5 Se probaron formulaciones de nanopartículas de 98N12-5 (NPA-005) y DLin-KC2-DMA (NPA-003) en concentraciones variables para determinar el MFI de FL4 o mCherry (secuencia de ARNm que se muestra en SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) en un intervalo de dosis. Las formulaciones probadas se describen en la Tabla 7. Para

10 determinar la concentración óptima de formulaciones de nanopartículas de 98N12-5, se probaron concentraciones variables de ARN modificado formulado (100 ng, 10 ng, 1,0 ng, 0,1 ng y 0,01 ng por pocillo) en un placa de 24 pocillos de HEK293, y los resultados del FL4 MFI de cada dosis se muestran en la Tabla 8. Asimismo, para determinar la concentración óptima de formulaciones de nanopartículas de DLin-KC2-DMA, variando las concentraciones de ARN modificado formulado (250 ng 100 ng, 10 ng, 1,0 ng, 0,1 ng y 0,01 ng por pocillo) en una placa de 24 pocillos de

15 HEK293, y los resultados del FL4 MFI de cada dosis se muestran en la Tabla 9. Formulaciones de nanopartículas de DLin-KC2-DMA también se probó a concentraciones variables de ARN modificado formulado (250 ng, 100 ng y 30 ng por pocillo) en una placa de 24 pocillos de HEK293, y los resultados del FL4 MFI de cada dosis se muestran en la Tabla 10. Se encontró que una dosis de 1 ng/pocillo para 98N12-5 y una dosis de 10 ng/pocillo para DLin-KC2-DMA se parecían a la FL4 MFI del fondo.

20 Para determinar cuánto se parecían las concentraciones al fondo, utilizamos un citómetro de flujo con conjuntos de filtros optimizados para la detección de la expresión de mCherry y pudimos obtener resultados con una mayor sensibilidad en relación con los niveles de fondo. Se analizaron dosis de 25 ng/pocillo, 0,25 ng/pocillo, 0,025 ng/pocillo y 0,0025 ng/pocillo para 98N12-5 (NPA-005) y DLin-KC2-DMA (NPA-003) para determinar el MFI de mCherry. Como

25 se muestra en la Tabla 11, la concentración de 0,025 ng/pocillo y concentraciones menores son similares al nivel de MFI de fondo de mCherry, que es de aproximadamente 386,125.

Tabla 7. Formulaciones

Formulación #	NPA-003	NPA-005
Lípido	DLin-KC2-DMA	98N12-5
Lípido/ARN en peso/en peso	20	15
Tamaño medio	114 nm PDI: 0,08	106 nm PDI: 0,12

Tabla 8. H EK293, NPA-005, 24 -pocillo, n=4

Formulación	FL4 MFI
Control no tratado	0,246
NPA-005 100 ng	2,2175
NPA-005 10 ng	0,651
NPA-005 1,0 ng	0,28425
NPA-005 0,1 ng	0,27675
NPA-005 0,01 ng	0,2865

Tabla 9. HEK293, NPA-003, 24-pocillo, n=4

Formulación	FL4 MFI
Control no tratado	0,3225
NPA-003 250 ng	2,9575
NPA-003 100 ng	1,255
NPA-003 10 ng	0,40025
NPA-003 1 ng	0,33025
NPA-003 0,1 ng	0,34625
NPA-003 0,01 ng	0,3475

5

Tabla 10. HEK293, NPA-003, 24-pocillo, n=4

Formulación	FL4 MFI
Control no tratado	0,27425
NPA-003 250 ng	5,6075
NPA-003 100 ng	3,7825
NPA-003 30 ng	1,5525

10

Tabla 11. Concentración y MFI

	MFI mCherry	
Formulación	NPA-003	NPA-005
25 ng/pocillo	11963,25	12256,75
0,25 ng/pocillo	1349,75	2572,75
0,025 ng/pocillo	459,50	534,75
0,0025 ng/pocillo	310,75	471,75

Ejemplo 12. Formulaciones de bomba de jeringa e inyección manual

15

Se prepararon dos formulaciones de DLin-KC2-DMA y 98N12-5 mediante inyección manual (MI) e inyección con bomba de jeringa (SP) y se analizaron junto con una muestra de fondo para comparar la MFI de mCherry (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificada con 5'-metilcitosina y pseudouridina) de las diferentes formulaciones. La Tabla 12 muestra que las formulaciones de bomba de jeringa tenían una MFI superior en comparación con las formulaciones de inyección manual de la misma proporción de lípidos y lípidos/ARN.

20

Tabla 12. Formulaciones y MFI

Formulación #	Lípido	Lípido/ARN peso/en peso	Tamaño medio (nm)	Procedimiento de formulación	MFI
Control no tratado	N/A	N/A	N/A	N/A	674,67
NPA-002	DLin-KC2-	15	140 nm	MI	10318,25
	DMA		PDI: 0,11		
NPA-002-2	DLin-KC2-	15	105 nm	SP	37054,75
	DMA		PDI: 0,04		
NPA-003	DLin-KC2-	20	114 nm	MI	22037,5
	DMA		PDI: 0,08		
NPA-003-2	DLin-KC2-	20	95 nm	SP	37868,75
	DMA		PDI: 0,02		
NPA-005	98N12-5	15	127 nm	MI	11504,75
			PDI: 0,12		
NPA-005-2	98N12-5	15	106 nm	SP	9343,75
			PDI: 0,07		
NPA-006	98N12-5	20	126 nm	MI	11182,25
			PDI: 0,08		
NPA-006-2	98N12-5	20	93 nm	SP	5167
			PDI: 0,08		

Ejemplo 13. Formulaciones de LNP

- Las formulaciones de DLin-DMA, DLin-K-DMA, DLin-KC2-DMA, 98N12-5, C12-200 y DLin-MC3-DMA se incubaron a una concentración de 60 ng/pocillo o 62,5 ng/pocillo en una placa de HEK293 y 62,5 ng/pocillo en una placa de células HepG2 durante 24 horas para determinar el MFI de mCherry (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 7; cola polA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) para cada formulación. Las formulaciones probadas se describen en la Tabla 13 a continuación. Como se muestra en la Tabla 14 para 60 ng/pocillo y en las Tablas 15, 16, 17 y 18 para 62,5 ng/pocillo, la formulación de NPA-003 y NPA-018 tiene el mCherry MFI más alto y las formulaciones de NPA-008, NPA-010 y NPA-013 son las más similares al valor de mCherry MFI de muestra de fondo.

Tabla 13. Formulaciones

Formulación #	Lípido	Lípido/ARN en peso/en peso	Tamaño medio (nm)
NPA-001	DLin-KC2-DMA	10	155 nm
			PDI: 0,08
NPA-002	DLin-KC2-DMA	15	140 nm
			PDI: 0,11
NPA-002-2	DLin-KC2-DMA	15	105 nm
			PDI: 0,04
NPA-003	DLin-KC2-DMA	20	114 nm
			PDI: 0,08
NPA-003-2	DLin-KC2-DMA	20	95 nm
			PDI: 0,02
NPA-005	98N12-5	15	127 nm
			PDI: 0,12
NPA-006	98N12-5	20	126 nm
			PDI: 0,08
NPA-007	DLin-DMA	15	148 nm
			PDI: 0,09
NPA-008	DLin-K-DMA	15	121 nm

Formulación #	Lípido	Lípido/ARN en peso/en peso	Tamaño medio (nm)
			PDI: 0,08
NPA-009	C12-200	15	138 nm
			PDI: 0,15
NPA-010	DLin-MC3-DMA	15	126 nm
			PDI: 0,09
NPA-012	DLin-DMA	20	86 nm
			PDI: 0,08
NPA-013	DLin-K-DMA	20	104 nm
			PDI: 0,03
NPA-014	C12-200	20	101 nm
			PDI: 0,06
NPA-015	DLin-MC3-DMA	20	109 nm
			PDI: 0,07

Tabla 14. HEK293, 96-pocillo, 60 ng ARN modificado/pocillo

Formulación	MFI mCherry
No tratado	871,81
NPA-001	6407,25
NPA-002	14995
NPA-003	29499,5
NPA-005	3762
NPA-006	2676
NPA-007	9905,5
NPA-008	1648,75
NPA-009	2348,25
NPA-010	4426,75
NPA-012	11466
NPA-013	2098,25
NPA-014	3194,25
NPA-015	14524

Tabla 15. HEK293, 62,5 ng /pocillo

Formulación	MFI mCherry
No tratado	871,81
NPA-001	6407,25
NPA-002	14995
NPA-003	29499,5
NPA-005	3762
NPA-006	2676
NPA-007	9905,5
NPA-008	1648,75
NPA-009	2348,25
NPA-010	4426,75
NPA-012	11466
NPA-013	2098,25
NPA-014	3194,25

Formulación	MFI mCherry
NPA-015	14524

Tabla 16. HEK293, 62,5 ng /pocillo

Formulación	MFI mCherry
No tratado	295
NPA-007	3504
NPA-012	8286
NPA-017	6128
NPA-003-2	17528
NPA-018	34142
NPA-010	1095
NPA-015	5859
NPA-019	3229

Tabla 17. HepG2, 62,5 ng /pocillo

Formulación	MFI mCherry
No tratado	649,94
NPA-001	6006,25
NPA-002	8705
NPA-002-2	15860,25
NPA-003	15059,25
NPA-003-2	28881
NPA-005	1676
NPA-006	1473
NPA-007	15678
NPA-008	2976,25
NPA-009	961,75
NPA-010	3301,75
NPA-012	18333,25
NPA-013	5853
NPA-014	2257
NPA-015	16225,75

Tabla 18. HepG2, 62,5 ng /pocillo

Formulación	MFI mCherry
Control no tratado	656
NPA-007	16798
NPA-012	21993
NPA-017	20377
NPA-003-2	35651
NPA-018	40154
NPA-010	2496
NPA-015	19741
NPA-019	16373

Ejemplo 14. Estudios de formulación *in vivo*

A los roedores (n=5) se les administra por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular una dosis única de una formulación que contiene al menos un ARNm modificado y un lípido. El ARNm modificado administrado a los roedores se selecciona de G-CSF (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1), eritropoyetina (EPO) (secuencia de ARNm mostrada en la

- 5 SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1), Factor IX (ARNm mostrado en la SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1) o mCherry (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 7; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1). El ADNc de eritropoyetina con el promotor T7, la región no traducida 5' (UTR) y la UTR 3' utilizada en la transcripción *in vitro* (IVT) se proporciona en la
- 10 SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12.

Cada formulación contiene también un lípido que se selecciona de uno de DLin-DMA, DLin-K-DMA, DLin-KC2-DMA, 98N12-5, C12-200, DLin-MC3-DMA, reLNP, ATUPLEX®, DACC y DBTC. A los roedores se les inyectan 100 ug, 10 ug o 1 ug del ARNm modificado formulado y las muestras se recogen a intervalos de tiempo especificados.

- 15 15 El suero de los roedores a los que se administró formulaciones que contenían ARNm modificado con G-CSF humano se midió mediante ELISA de G-CSF específico y el suero de ratones a los que se administró ARN modificado con factor IX humano se analizó mediante ELISA de factor IX específico o ensayo cromogénico. El hígado y el bazo de los ratones a los que se les administró ARNm modificado con mCherry se analizan mediante inmunohistoquímica (IHC) o 20 clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Como control, a un grupo de ratones no se les inyecta ninguna formulación y su suero y tejido se recogen y analizan mediante ELISA, FACS y/o IHC.

A. Transcurso del tiempo

- 25 25 A los roedores se les administran formulaciones que contienen al menos un ARNm modificado para estudiar el curso temporal de la expresión de proteínas para la formulación administrada. Los roedores se sangran a intervalos de tiempo especificados antes y después de la administración de las formulaciones de ARNm modificadas para determinar la expresión de proteínas y el hemograma completo. También se recogen muestras del sitio de administración de roedores a los que se les administran formulaciones de ARNm modificadas por vía subcutánea e 30 intramuscular para determinar la expresión de proteínas en el tejido.

B. Respuesta a la dosis

- 35 35 A los roedores se les administran formulaciones que contienen al menos un ARNm modificado para determinar la respuesta a la dosis de cada formulación. Los roedores se sangran a intervalos de tiempo especificados antes y después de la administración de las formulaciones de ARNm modificadas para determinar la expresión de proteínas y el hemograma completo. Los roedores también se sacrifican para analizar el efecto de la formulación de ARNm modificada en el tejido interno. También se recogen muestras del sitio de administración de roedores a los que se les administran 40 formulaciones de ARNm modificadas por vía subcutánea e intramuscular para determinar la expresión de proteínas en el tejido.

C. Toxicidad

- 45 45 A los roedores se les administran formulaciones que contienen al menos un ARNm modificado para estudiar la toxicidad de cada formulación. Los roedores se sangran a intervalos de tiempo especificados antes y después de la administración de las formulaciones de ARNm modificadas para determinar la expresión de proteínas y el hemograma completo. Los roedores también se sacrifican para analizar el efecto de la formulación de ARNm modificado en el tejido interno. También se recogen muestras del sitio de administración de roedores a los que se les administran 50 formulaciones de ARNm modificadas por vía subcutánea e intramuscular para determinar la expresión de proteínas en el tejido.

Ejemplo 15. Formulaciones de microesferas de PLGA

- 55 55 La optimización de los parámetros utilizados en la formulación de microesferas de PLGA puede permitir tasas de liberación ajustables y altas eficiencias de encapsulación mientras se mantiene la integridad del ARN modificado encapsulado en las microesferas. Los parámetros tales como, entre otros, el tamaño de partícula, las tasas de recuperación y la eficiencia de encapsulación pueden optimizarse para lograr la formulación óptima.

A. Síntesis de microesferas de PLGA

- 60 60 Las microesferas de ácido polilácticoglicólico (PLGA) se sintetizaron usando los procedimientos de emulsificación doble agua/aceite/agua conocidos en la técnica usando PLGA (Lactel, Cat# B6010-2, viscosidad inherente 0,55-0,75,

50:50 LA:GA), alcohol polivinílico (PVA) (Sigma, Cat# 348406-25G, MW 13-23k) diclorometano y agua. Brevemente, se añadieron 0,1 ml de agua (W1) a 2 ml de PLGA disueltos en diclorometano (DCM) (O1) a concentraciones que oscilaban entre 50 y 200 mg/ml de PLGA. La emulsión W1/O1 se homogeneizó (homogeneizador IKA Ultra-Turrax, T18) durante 30 segundos a velocidad 4 (~15.000 rpm). A continuación, se añadió la emulsión W1/O1 a 100 a 200 ml del 0,3 al 1 % de PVA (W2) y se homogeneizó durante 1 minuto a velocidades variadas. Las formulaciones se dejaron en agitación durante 3 horas y, a continuación, se lavaron por centrifugación (20-25 min, 4000 rpm, 4 °C). Se descartó el sobrenadante y los gránulos de PLGA se resuspendieron en 5-10 ml de agua, lo que se repitió 2 veces. El tamaño de partícula promedio (representa 20 -30 partículas) para cada formulación se determinó por microscopía después del lavado. La Tabla 19 muestra que un aumento en la concentración de PLGA condujo a microesferas de mayor tamaño.

5 Una concentración de PLGA de 200 mg/mL dio un tamaño de partícula promedio de 14,8 µm, 100 mg/mL fue de 8,7 µm y 50 mg/mL de PLGA dio un tamaño de partícula promedio de 4,0 µm.

Tabla 19. Concentración de PLGA variada

ID de muestra	Volumen O1 (mL)	Concentración PLGA (mg/mL)	Volumen W2 (mL)	Concentración PVA (%)	Velocidad	Tamaño promedio (µm)
1	2	200	100	0,3	5	14,8
2	2	100	100	0,3	5	8,7
3	2	50	100	0,3	5	4,0

15 La Tabla 20 muestra que la disminución de la velocidad de homogeneización de 5 (~20.000 rpm) a la velocidad 4 (~15.000 rpm) condujo a un aumento en el tamaño de partícula de 14,8 µm a 29,7 µm.

Tabla 20. Velocidad de homogeneización variada

ID de muestra	Volumen O1 (mL)	Concentración PLGA (mg/mL)	Volumen W2 (mL)	Concentración PVA (%)	Velocidad	Tamaño promedio (µm)
1	2	200	100	0,3	5	14,8
4	2	200	100	0,3	4	29,7

20 La Tabla 21 muestra que al aumentar el volumen W2 (es decir, al aumentar la proporción de W2:O1 de 50:1 a 100:1), se redujo ligeramente el tamaño medio de las partículas. La alteración de la concentración de PVA del 0,3 al 1 % en peso tuvo poco impacto en el tamaño de las microesferas de PLGA.

Tabla 21 Concentración y volumen W2 variado

ID de muestra	Volumen O1 (mL)	Concentración PLGA (mg/mL)	Volumen W2 (mL)	Concentración PVA (%)	Velocidad	Tamaño promedio (µm)
1	2	200	100	0,3	5	14,8
5	2	200	200	0,3	5	11,7
6	2	200	190	0,3	5	11,4
7	2	200	190	1,0	5	12,3

25 B. Encapsulación de ARNm modificado

El ARNm de G-CSF modificado (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se disolvió en agua a una concentración de 2 mg/ml. (W3). Se prepararon tres lotes de formulaciones de microesferas de PLGA como se describe anteriormente con los siguientes parámetros: 0,1 ml de W3 a 2 mg/ml, 1,6 ml de O1 a 200 mg/ml, 160 ml de W2 al 1 % y se homogeneizaron a una velocidad de 4 para la primera emulsión (W3/O1) y homogeneizado a velocidad 5 para la segunda emulsión (W3/O1/W2). Después de lavar por centrifugación, las formulaciones se congelaron en nitrógeno líquido y, a continuación, se liofilizaron durante 3 días. Para probar la eficiencia de encapsulación de las formulaciones, el material liofilizado se deformuló en DCM durante 6 horas seguido de una extracción en agua durante la noche. A continuación, se determinó la concentración de ARN modificado en las muestras mediante OD260. La eficiencia de encapsulación se calculó tomando la cantidad real de ARN modificado y dividiéndola por la cantidad inicial de ARN modificado. En los tres lotes probados, hubo una eficiencia de encapsulación de 59,2, 49,8 y 61,3.

40 C. Integridad del ARNm modificado encapsulado en microesferas de PLGA

El ARNm del Factor IX modificado (SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se disolvió en agua a concentraciones variadas (W4) para variar la carga porcentual en peso en la formulación (mg de ARN modificado/mg de PLGA * 100) y para determinar la eficiencia de encapsulación. Los parámetros de la Tabla 22 se usaron para hacer

5 cuatro lotes diferentes de formulaciones de microesferas de PLGA con una velocidad de homogeneización de 4 para la primera emulsión (W4/O1) y una velocidad de homogeneización de 5 para la segunda emulsión (W4/O1/W2).

Tabla 22. Parámetros de formulación de microesferas de factor IX PLGA

ID	Volumen W4 (uL)	Concentración de Factor IX (mg/ml)	Cantidad de Factor IX (ug)	Volumen O1 (ml)	Concentración de PLGA (mg/ml)	Volumen W2 (ml)	Concentración de PVA (%)	% en Carga de peso (% pp)
A	100	2,0	200,0	2,0	200	200	1,0	0,05
B	100	4,0	400,0	2,0	200	200	1,0	0,10
c	400	2,0	800,0	2,0	200	200	1,0	0,20
D	400	4,0	1600,0	2,0	200	200	1,0	0,40

10 Despues de la liofilización, las microesferas de PLGA se pesaron en tubos eppendorf de 2 ml para que correspondieran a ~ 10 ug de ARN modificado. Se encontró que la liofilización no destruía la estructura general de las microesferas de PLGA. Para aumentar la carga porcentual en peso (% en peso) de las microesferas de PLGA, se añadieron a las muestras cantidades crecientes de ARN modificado. Las microesferas de PLGA se deformularon añadiendo 1,0 ml de DCM a cada tubo y, a continuación, se agitaron las muestras durante 6 horas. Para la extracción de ARN modificado, se añadieron 0,5 ml de agua a cada muestra y las muestras se agitaron durante la noche antes de determinar la concentración de ARN modificado en las muestras mediante OD260. Para determinar la recuperación del proceso de extracción, se utilizó ARN modificado con Factor IX no formulado (SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) (control de deformulación) se introdujo en DCM y se sometió al proceso de deformulación. La Tabla 23 muestra la eficiencia de carga y encapsulación de las muestras. Todas las muestras de eficiencia de encapsulación se normalizaron con respecto al control de deformulación.

25 **Tabla 23. Carga porcentual en peso y eficiencia de encapsulación**

ID	Carga teórica modificada de ARN (% en peso)	Carga real de ARN modificado (% en peso)	Eficiencia de encapsulación (%)
A	0,05	0,06	97,1
B	0,10	0,10	85,7
C	0,20	0,18	77,6
D	0,40	0,31	68,1
Control	-	-	100,0

D. Estudio de liberación de ARNm modificado encapsulado en microesferas de PLGA

30 Se deformularon microesferas de PLGA formuladas con ARN modificado con Factor IX (SEQ ID NO: 10) como se describe anteriormente y se determinó la integridad del ARN modificado extraído mediante electroforesis automatizada (Bio-Rad Experion). El ARNm modificado extraído se comparó con el ARNm modificado no formulado y el control de deformulación para probar la integridad del ARNm modificado encapsulado. Como se muestra en la Figura 3, la mayoría del ARN mod estaba intacto para el ID de lote A, B, C y D, para el control deformulado (control Deform) y el control no formulado (control no form.).

35 E. Expresión proteica de ARNm modificado encapsulado en microesferas de PLGA

40 Se deformularon microesferas de PLGA formuladas con ARN modificado con Factor IX (SEQ ID NO: 10; cola de poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) como se describe anteriormente y la expresión de la proteína del ARN modificado extraído se determinó mediante un ensayo de transfección *in vitro*. Las células HEK293 se transfecaron inversamente con 250 ng de ARN modificado con Factor IX complejado con RNAiMAX (Invitrogen) por triplicado.

El ARN modificado con factor IX se diluyó en agua sin nucleasas hasta una concentración de 25 ng/ μ l y ARNiMAX se

diluyó 13,3x en EMEM sin suero. Volúmenes iguales de ARN modificado diluido y ARNiMAX diluido se mezclaron y se dejaron reposar durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 20 µl de la mezcla de transfección que contenía 250 ng de ARN modificado con Factor IX a 80 µl de una suspensión celular que contenía 30.000 células. A continuación, las células se incubaron durante 16 h en un incubador de cultivo celular humidificado

- 5 a 37 °C/CO₂ al 5 % antes de recoger el sobrenadante del cultivo celular. La expresión de la proteína del factor IX en el sobrenadante celular se analizó mediante un kit ELISA específico para el factor IX (Molecular Innovations, Cat # HFIXKT-TOT) y la expresión de la proteína se muestra en la Tabla 24. En todos los lotes de microesferas de PLGA probados, el ARN modificado del factor IX permaneció activo y expresó la proteína Factor IX después de la formulación en microesferas de PLGA y posterior deformulación.

10

Tabla 24. Expresión de proteína

Muestra	Expresión de la proteína del factor IX (ng/ml)
Lote A	0,83
Lote B	1,83
Lote C	1,54
Lote D	2,52
Control deformulado	4,34
Control no formulado	3,35

F. Estudio de liberación de ARNm modificado encapsulado en microesferas de PLGA

- 15 Se resuspendieron en agua microesferas de PLGA formuladas con ARN modificado con factor IX (SEQ ID NO: 10; cola de poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) a una concentración de microesferas de PLGA de 24 mg/ml. Después de la resuspensión, se tomaron alícuotas de 150 µl de la suspensión de microesferas de PLGA en tubos eppendorf. Las muestras se mantuvieron incubando y agitando a 37 °C durante el curso del estudio. Se tomaron muestras por triplicado a los 0,2, 1, 2, 8, 14 y 21 días. Para determinar la cantidad de ARN modificado liberado de las microesferas de PLGA, las muestras se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se determinó la concentración de ARN modificado en el sobrenadante mediante OD 260. El porcentaje de liberación, que se muestra en la Tabla 25, se calculó en función de la cantidad total de ARN modificado en cada muestra. Después de 31 días, el 96 % del ARN modificado con Factor IX se liberó de las formulaciones de microesferas de PLGA.

25

Tabla 25. Liberación porcentual

Tiempo (días)	% de liberación
0	0,0
0,2	27,0
1	37,7
2	45,3
4	50,9
8	57,0
14	61,8
21	75,5
31	96,4

G. Reproducibilidad del tamaño de partículas de microesferas de PLGA

- 30 Se prepararon tres lotes de microesferas de PLGA de ARN modificado con Factor IX (SEQ ID NO: 10 cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) usando las mismas condiciones descritas para el Lote D, que se muestra en la Tabla 22, (0,4 ml de W4 a 4 mg/ml, 2,0 ml de O1 a 200 mg/ml, 200 ml de W2 al 1 % y homogeneizado a una velocidad de 5 para la emulsión W4/O1/W2). Para mejorar la homogeneidad de la suspensión de microesferas de PLGA, se incorporó la filtración antes de la centrifugación. Después de agitar durante 3 horas y antes de centrifugar, todo el material formulado se pasó a través de un filtro de malla de nylon de 100 µm (Fisherbrand Cell Strainer, Cat # 22-363-549) para eliminar los agregados más grandes. Después de lavar y resuspender con agua, se usaron 100-200 µl de una muestra de microesferas de PLGA para medir el tamaño de partícula de las formulaciones por difracción láser (Malvern Mastersizer 2000). El tamaño de partícula de las muestras se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Resumen de tamaño de partícula

ID	D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)	Media ponderada por volumen (um)	Filtración
Control	19,2	62,5	722,4	223,1	No
A	9,8	31,6	65,5	35,2	Sí
B	10,5	32,3	66,9	36,1	Sí
C	10,8	35,7	79,8	41,4	Sí

5 Los resultados de los 3 lotes de microesferas de PLGA usando filtración se compararon con un lote de microesferas de PLGA elaborado en las mismas condiciones sin filtración. La inclusión de una etapa de filtración antes del lavado redujo el tamaño medio de las partículas y demostró una distribución uniforme del tamaño de las partículas entre 3 lotes de microesferas de PLGA.

H. Estabilidad en suero de las microesferas PLGA de Factor IX

10 El ARN de ARNm de factor IX (SEQ ID NO: 10 cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) en tampón (TE) o suero al 90 % (Se), o ARNm del factor IX en PLGA en tampón, suero al 90 % o suero al 1 % se incubó en tampón, suero al 90 % o suero al 1 % a una concentración de ARNm de 50 ng/ul en un volumen total de 70 ul. Las muestras se retiraron a los 0, 30, 60 o 120 minutos. Las RNAsas se inactivaron con digestión con proteinasa K durante 20 minutos a 55 °C mediante la adición de 25 ul de tampón de proteinasa K 4x (0,4 ml de TRIS-HCl 1 M pH 7.5, 0,1 ml de EDTA 0,5 M, 0,12 ml de NaCl 5 M y 0,4 ml de SDS al 10 %) y 8 ul de proteinasa K a 20 mg/ml. Se precipitó el ARNm del Factor IX (agregar 250 ul de etanol al 95% durante 1 hora, centrifugar durante 10 min a 13 k rpm y eliminar el sobrenadante, añadir 200 ul de etanol al 70 % al gránulo, centrifugar de nuevo durante 5 min a 13 k rpm y eliminar el sobrenadante y resuspender el gránulo en 70 ul de agua) o extraído de microesferas de PLGA (centrifugar 5 min a 13k rpm y eliminar el sobrenadante, lavar el gránulo con 1 ml de agua, centrifugar 5 min a 13k rpm y eliminar el sobrenadante, añadir 280 ul de diclorometano al gránulo y agitar durante 15 minutos, añadir 70 ul de agua y, a continuación, agitar durante 2 horas y eliminar la fase acuosa) antes de ser analizado por bioanalizador. Las microesferas de PLGA protegen el ARNm modificado del Factor IX de la degradación en suero al 90 % y al 1 % durante 2 horas. El ARNm modificado con factor IX se degrada completamente en suero al 90 % en el punto de tiempo inicial.

Ejemplo 16. Estudios *in vivo* de nanopartículas lipídicas

30 G-CSF (ADNc con el promotor T7, región 5' no traducida (UTR) y 3'UTR utilizada en la transcripción *in vitro* se proporciona en la SEQ ID NO: 5. La secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa 1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) y Factor IX (ADNc con el promotor T7, 5'UTR y 3'UTR utilizados en la transcripción *in vitro* se proporciona en la SEQ ID NO: 13. Secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa 1; totalmente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) el ARNm modificado se formuló como nanopartículas lipídicas (LNP) utilizando el procedimiento de la bomba de jeringa. Los LNP se formularon en una proporción en peso de lípidos totales a ARNm modificado de 20:1 con una proporción molar de lípidos final de 50:10:38,5:1,5 (DLin-KC2-DMA: DSPC: Colesterol: PEG-c-DOMG). Las formulaciones, enumeradas en la Tabla 27, se caracterizaron por tamaño de partícula, potencial zeta y encapsulación.

40

Tabla 27. Formulaciones

Formulación #	NPA-029-1	NPA-030-1
ARNm modificado	Factor IX	G-CSF
Tamaño medio	91 nm	106 nm
	PDI: 0,04	PDI: 0,06
Zeta a pH 7.4	1,8 mV	0,9 mV
Encaps. (RiboGr)	92 %	100 %

45 Las formulaciones de LNP se administraron a ratones (n = 5) por vía intravenosa a una dosis modificada de ARNm de 100, 10 o 1 ug. Los ratones se sacrificaron 8 horas después de la dosificación. El suero se recogió mediante punción cardíaca de ratones a los que se les administró formulaciones de ARNm modificadas con G-CSF o Factor IX. La expresión de proteínas se determinó por ELISA.

No hubo una pérdida significativa de peso corporal (<5 %) en los grupos de dosis de G-CSF o Factor IX. La expresión de proteínas para los grupos de dosis de G-CSF o Factor IX se determinó mediante ELISA a partir de una curva estándar. Las muestras de suero se diluyeron (alrededor de 20-2500x para G-CSF y alrededor de 10-250x para Factor IX) para asegurar que las muestras estuvieran dentro del intervalo lineal de la curva estándar. Como se muestra en la

- 5 Tabla 28, la expresión de proteína G-CSF determinada por ELISA fue de aproximadamente 17, 1200 y 4700 ng/ml para los grupos de dosis de 1, 10 y 100 ug, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 29, la expresión de la proteína de Factor IX determinada por ELISA fue de aproximadamente 36, 380 y 3000-11000 ng/ml para los grupos de dosis de 1, 10 y 100 ug, respectivamente.

10 **Tabla 28. Expresión de proteína G-CSF**

Dosis (ug)	Conc (ng/ml)	Factor de dilución	Volumen de muestra
1	17,73	20x	5 ul
10	1204,82	2500x	0,04 ul
100	4722,20	2500x	0,04 ul

Tabla 29. Expresión de proteína de Factor IX

Dosis (ug)	Conc (ng/ml)	Factor de dilución	Volumen de muestra
1	36,05	10x	5 ul
10	383,04	10x	5 ul
100*	3247,75	50x	1 ul
100*	11177,20	250x	0,2 ul

- 15 Como se muestra en la Tabla 30, las formulaciones de LNP descritas anteriormente tienen un aumento de aproximadamente 10.000 a 100.000 veces en la producción de proteínas en comparación con la administración de una formulación de lipoplex intravenoso (IV) para la misma dosis de ARNm modificado y administración intramuscular (IM) o subcutánea (SC) de la misma dosis de ARNm modificado en solución salina. Como se usa en la Tabla 30, el símbolo " ~ " significa aproximadamente.

20

Tabla 30. Producción de proteína

G-CSF	Dosis (ug)	Concentración de suero (pg/ml) 8-12 horas después de la administración
IM	100	~20-80
SC	100	~10-40
IV (Lipoplex)	100	~30
IV (LNP)	100	~5.000.000
IV (LNP)	10	~1.000.000
IV (LNP)	1	~20.000
Factor IX	Dosis (ug)	Concentración de suero (ng/ml) 8-12 horas después de la administración
IM	2 x 100	~1,6 ng/ml
IV (LNP)	100	~3.000-10.000 ng/ml
IV (LNP)	10	~400 ng/ml
IV (LNP)	1	~40 ng/ml

Materiales y procedimientos para los ejemplos 17-22

- 25 G-CSF (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa 1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) y EPO (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa 1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se formuló 30 ARNm modificado como nanopartículas lipídicas (LNP) utilizando el procedimiento de bomba de jeringa. Los LNP se formularon en una proporción en peso de lípidos totales a ARNm modificado de 20:1 con una proporción molar de lípidos final de 50:10:38,5:1,5 (DLin-KC2-DMA: DSPC: Colesterol: PEG-c-DOMG). Las formulaciones, enumeradas en la Tabla 31, se caracterizaron por tamaño de partícula, potencial zeta y encapsulación.

Tabla 31. Formulaciones

Formulación #	NPA-030-2	NPA-060-1
ARNm modificado	G-CSF	EPO
Tamaño medio	84 nm	85 nm
	PDI: 0.04	PDI: 0.03
Zeta a pH 7.4	0,8 mV	1,5 mV
Encapsulación (RiboGreen)	95 %	98 %

Ejemplo 17. Estudios *in vivo* de nanopartículas lipídicas con ARNm modificado

5 Las formulaciones de LNP, que se muestran en la Tabla 31 (anterior), se administraron a ratas ($n = 5$) por vía intravenosa (IV), intramuscular (IM) o subcutánea (SC) en una dosis única modificada de ARNm de 0,05 mg/kg. Un grupo de control de ratas ($n=4$) no se trató. Se extrajo sangre de las ratas a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas y 96 horas y después se les administraron formulaciones de ARNm modificadas con G-CSF o EPO para determinar la expresión de proteína usando ELISA. A las ratas a las que se administró ARNm modificado con EPO por vía intravenosa también se les extrajo sangre a los 7 días.

10 15 Como se muestra en la Tabla 32, la expresión de la proteína EPO en las ratas a las que se administró por vía intravenosa el ARNm de EPO modificado fue detectable hasta los 5 días. G-CSF en las ratas administradas por vía intravenosa ARNm de G-CSF modificado fue detectable a los 7 días. La administración subcutánea e intramuscular de ARNm modificado con EPO fue detectable durante al menos 24 horas y el ARNm modificado con G-CSF fue detectable durante al menos 8 horas. En la Tabla 32, "OSC" se refiere a valores que estaban fuera de la curva estándar y "NT" significa que no se probaron.

20 Tabla 32. Expresión de proteína EPO y G-CSF

Vía	Tiempo	Concentración de suero EPO (pg/ml)	Concentración de suero G-CSF (pg/ml)
IV	2 horas	36.981,0	31.331,9
IV	8 horas	62.053,3	70.532,4
IV	24 horas	42.077,0	5.738,6
IV	48 horas	5.561,5	233,8
IV	5 días	0,0	60,4
IV	7 días	0,0	NT
IM	2 horas	1395,4	1620,4
IM	8 horas	8974,6	7910,4
IM	24 horas	4678,3	893,3
IM	48 horas	NT	OSC
IM	5 días	NT	OSC
SC	2 horas	386,2	80,3
SC	8 horas	985,6	164,2
SC	24 horas	544,2	OSC
SC	48 horas	NT	OSC
SC	5 días	NT	OSC
No tratado	Todos los sangrados	0	0

Ejemplo 18. Estudio *in vivo* del transcurso del tiempo

25 Las formulaciones de LNP, que se muestran en la Tabla 31 (anterior), se administraron a ratones ($n = 5$) por vía intravenosa (IV) en una única dosis modificada de ARNm de 0,5, 0,05 o 0,005 mg/kg. Se extrajo sangre de los ratones a las 8 horas, 24 horas, 72 horas y 6 días después de que se les administraran formulaciones de ARNm modificadas con G-CSF o EPO para determinar la expresión de proteínas usando ELISA.

Como se muestra en la Tabla 33, la expresión de la proteína EPO y G-CSF en los ratones a los que se les administró el ARNm modificado por vía intravenosa fue detectable hasta las 72 horas para los ratones que recibieron dosis de 0,005 mg/kg y 0,05 mg/kg de ARNm modificado y hasta los 6 días para los ratones a los que se administró el ARNm modificado con EPO. En la Tabla 33, ">" significa mayor que y "ND" significa no detectado.

5

Tabla 33. Expresión de proteína

Dosis (mg/kg)	Tiempo	Concentración de suero EPO (pg/ml)	Concentración de suero G-CSF (pg/ml)
0,005	8 horas	12.508,3	11.550,6
0,005	24 horas	6.803,0	5.068,9
0,005	72 horas	ND	ND
0,005	6 días	ND	ND
0,05	8 horas	92.139,9	462.312,5
0,05	24 horas	54.389,4	80.903,8
0,05	72 horas	ND	ND
0,05	6 días	ND	ND
0,5	8 horas	498.515,3	>1.250.000
0,5	24 horas	160.566,3	495.812,5
0,5	72 horas	3.492,5	1.325,6
0,5	6 días	21,2	ND

Ejemplo 19. Estudio *in vivo* de formulaciones de LNP en roedores

10 A. Formulaciones de LNP en ratones

Las formulaciones de LNP, que se muestran en la Tabla 31 (anterior), se administraron a ratones ($n = 4$) por vía intravenosa (IV) en una única dosis modificada de ARNm de 0,05 mg/kg o 0,005 mg/kg. También hubo 3 grupos de control de ratones ($n=4$) que no se trataron. Se extrajo sangre de los ratones a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas después de que se les administraran formulaciones de ARNm modificadas con G-CSF o EPO para determinar la expresión de la proteína. La expresión de proteínas de G-CSF y EPO se determinó usando ELISA.

15 Como se muestra en la Tabla 34, la expresión de la proteína EPO y G-CSF en los ratones fue detectable al menos hasta las 48 horas para los ratones que recibieron una dosis de 0,005 mg/kg de ARN modificado y 72 horas para los ratones que recibieron una dosis de ARN modificado de 0,05 mg/kg. En la Tabla 34, "OSC" se refiere a valores que estaban fuera de la curva estándar y "NT" significa que no se probaron.

20 B. Formulaciones de LNP en ratas

Dosis (mg/kg)	Tiempo	Concentración de suero EPO (pg/ml)	Concentración de suero G-CSF (pg/ml)
0,005	2 horas	OSC	3.447,8
0,005	8 horas	1.632,8	11.454,0
0,005	24 horas	1.141,0	4.960,2
0,005	48 horas	137,4	686,4
0,005	72 horas	0	NT
0,05	2 horas	10.027,3	20.951,4
0,05	8 horas	56.547,2	70.012,8
0,05	24 horas	25.027,3	19.356,2
0,05	48 horas	1.432,3	1.963,0
0,05	72 horas	82,2	47,3

25 C. Formulaciones de LNP en ratas

Las formulaciones de LNP, que se muestran en la Tabla 31 (anterior), se administraron a ratas ($n=4$) por vía intravenosa (IV) en una única dosis modificada de ARNm de 0,05 mg/kg. También hay un grupo de control de ratas ($n=4$) que no reciben tratamiento. Se extrajo sangre a las ratas a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 días y 14 días después de que se les administraran formulaciones de ARNm modificadas con G-CSF o EPO para

determinar la expresión de proteína. La expresión de proteínas de G-CSF y EPO se determinó usando ELISA.

Ejemplo 20. Estudio de curso de tiempo temprano de LNP

- 5 Las formulaciones de LNP, que se muestran en la Tabla 31 (más arriba), se administraron a los mamíferos por vía intravenosa (IV), intramuscular (IM) o subcutánea (SC) en una dosis única modificada de ARNm de 0,5 mg/kg, 0,05 mg/kg o 0,005 mg/kg. Un grupo de control de mamíferos no recibió tratamiento. Se extrajo sangre de los mamíferos a los 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1,5 horas y/o 2 horas después de administrarles las formulaciones de ARNm LNP modificadas para determinar la expresión de proteínas usando ELISA. A los 10 mamíferos también se les extrajo sangre para determinar el hemograma completo tal como los niveles de granulocitos y el recuento de glóbulos rojos.

Ejemplo 21. Estudio *in vivo* en primates no humanos

- 15 Las formulaciones de LNP, que se muestran en la Tabla 31 (más arriba), se administraron a primates no humanos (NHP) (mono cynomolgus) (n=2) como una inyección intravenosa en bolo (IV) durante aproximadamente 30 segundos usando una aguja hipodérmica, que puede ser unido a una jeringa/abbocath o mariposa si es necesario. A los NHP se les administró una única dosis IV de ARNm modificado de 0,05 mg/kg de EPO o G-CSF o 0,005 mg/kg de EPO en un volumen de dosis de 0,5 ml/kg. A los NHP se les extrajo sangre 5-6 días antes de la dosificación con las 20 formulaciones de LNP de ARNm modificadas para determinar la expresión de proteínas en el suero y un hemograma completo de línea de base. Después de la administración con la formulación de ARNm modificado, se extrajo sangre de los NHP a las 8, 24, 48 y 72 horas para determinar la expresión de proteínas. A las 24 y 72 horas después de la 25 administración también se determinó el hemograma completo del NHP. La expresión proteica de G-CSF y EPO se determinó mediante ELISA. La orina de los NHP se recolectó durante todo el experimento y se analizó para evaluar la seguridad clínica. Se recogieron muestras de los NHP después de administrarles formulaciones de ARNm modificadas con G-CSF o EPO para determinar la expresión de proteínas mediante ELISA. También se analizaron la química clínica, la hematología, el análisis de orina y las citoquinas de los primates no humanos.
- 30 Como se muestra en la Tabla 35, la expresión de la proteína EPO en los NHP administrados 0,05 mg/kg es detectable hasta las 72 horas y la dosificación de 0,005 mg/kg de la formulación de EPO es detectable hasta las 48 horas. En la Tabla 35, "<" significa menos de un valor dado. La expresión de la proteína G-CSF se observó hasta 24 horas después de la administración con la formulación de ARNm modificada. Preliminarmente, se observó un aumento en los niveles de granulocitos y reticulocitos en el NHP después de la administración con las formulaciones de ARNm modificadas.

35 **Tabla 35. Expresión de proteínas en primates no humanos**

ARNm modificado	Dosis (mg/kg)	Tiempo	Concentración sérica femenina de NHP (pg/ml)	Concentración sérica masculina de NHP (pg/ml)	Concentración sérica promedio (pg/ml)
G-CSF	0.05	Pre-extracción de sangre	0	0	0
		8 horas	3289	1722	2.506
		24 horas	722	307	515
		48 horas	0	0	0
		72 horas	0	0	0
EPO	0,05	Pre-extracción de sangre	0	0	0
		8 horas	19.858	7.072	13.465
		24 horas	18.178	4.913	11.546
		48 horas	5.291	498	2.895
		72 horas	744	60	402
EPO	0,005	Pre-extracción de sangre	0	0	0

ARNm modificado	Dosis (mg/kg)	Tiempo	Concentración sérica femenina de NHP (pg/ml)	Concentración sérica masculina de NHP (pg/ml)	Concentración sérica promedio (pg/ml)
		8 horas	523	250	387
		24 horas	302	113	208
		48 horas	<7,8	<7,8	<7,8
		72 horas	0	0	0

Ejemplo 22. Estudio *in vivo* en primates no humanos para G-CSF y EPO

Las formulaciones de LNP, mostradas en la Tabla 31 (más arriba), se administraron a primates no humanos (NHP) (mono cynomolgus) (n=2) como inyección intravenosa (IV). A los NHP se les administró una única dosis IV de ARNm modificado de 0,5 mg/kg, 0,05 mg/kg o 0,005 mg/kg de G-CSF o EPO en un volumen de dosis de 0,5 ml/kg. Se extrajo sangre a los NHP antes de la dosificación con las formulaciones de LNP de ARNm modificadas para determinar la expresión de proteínas en el suero y un hemograma completo de referencia. Después de la administración con la formulación de ARNm modificado con G-CSF, se extrajo sangre de los NHP a las 8, 24, 48 y 72 horas para determinar la expresión de proteína. Después de la administración con la formulación de ARNm modificado con EPO, se extrajo sangre de los NHP a las 8, 24, 48, 72 horas y 7 días para determinar la expresión de proteína.

Las muestras recolectadas de los NHP después de administrarles formulaciones de ARNm modificadas con G-CSF o EPO se analizaron mediante ELISA para determinar la expresión de proteínas. También se determinó el recuento de neutrófilos y reticulocitos antes de la dosis, 24 horas, 3 días, 7 días, 14 días y 18 días después de la administración de la formulación modificada de G-CSF o EPO.

Como se muestra en la Tabla 36, la expresión de la proteína G-CSF no se detectó más allá de las 72 horas. En la Tabla 36, "<39" se refiere a un valor por debajo del límite inferior de detección de 39 pg/ml.

20

Table 36. Expresión de proteína G-CSF

ARNm modificado	Dosis (mg/kg)	Tiempo	Concentración de G-CSF en suero NHP femenino (pg/ml)	Concentración de G-CSF en suero de NHP masculino (pg/ml)
G-CSF	0,5	Pre-extracción de sangre	<39	<39
		8 horas	43.525	43.594
		24 horas	11.374	3.628
		48 horas	1.100	833
G-CSF	0,05	72 horas	<39	306
		Pre-extracción de sangre	<39	<39
		8 horas	3.289	1.722
		24 horas	722	307
		48 horas	<39	<39
		72 horas	<39	<39
		Pre-extracción de sangre	<39	<39
G-CSF	0,005	8 horas	559	700
		24 horas	155	<39
		48 horas	<39	<39
		72 horas	<39	<39

Como se muestra en la Tabla 37, la expresión de la proteína EPO no se detectó más allá de los 7 días. En la Tabla 37, "<7,8" se refiere a un valor por debajo del límite inferior de detección de 7,8 pg/ml.

Tabla 37. Expresión de proteína EPO

ARNm modificado	Dosis (mg/kg)	Tiempo	Concentración de EPO en suero NHP femenino (pg/ml)	Concentración de EPO en suero NHP masculino (pg/ml)
EPO	0,5	Pre-extracción de sangre	<7,8	<7,8
		8 horas	158.771	119.086
		24 horas	133.978	85.825
		48 horas	45.250	64.793
		72 horas	15.097	20.407
		7 días	<7,8	<7,8
EPO	0,05	Pre-extracción de sangre	<7,8	<7,8
		8 horas	19.858	7.072
		24 horas	18.187	4.913
		48 horas	5.291	498
		72 horas	744	60
		7 días	<7,8	<7,8
EPO	0,005	Pre-extracción de sangre	<7,8	<7,8
		8 horas	523	250
		24 horas	302	113
		48 horas	11	29
		72 horas	<7,8	<7,8
		7 días	<7,8	<7,8

Como se muestra en la Tabla 38, hubo un aumento de neutrófilos en todos los grupos de G-CSF en relación con los niveles previos a la dosis.

Tabla 38. Efecto farmacológico del ARNm de G-CSF en NHP

Dosis (mg/kg)	Tiempo	Neutrófilos de NHP masculino (G-CSF) ($10^9/L$)	Neutrófilos de NHP femenino (G-CSF) ($10^9/L$)	Neutrófilos de NHP masculino (EPO) ($10^9/L$)	Neutrófilos de NHP femenino (EPO) ($10^9/L$)
0,5	Pre-dosis	1,53	1,27	9,72	1,82
	24 horas	14,92	13,96	7,5	11,85
	3 días	9,76	13,7	11,07	5,22
	7 días	2,74	3,81	11,8	2,85
	14/18 días	2,58	1,98	7,16	2,36
0,05	Pre-dosis	13,74	3,05	0,97	2,15
	24 horas	19,92	29,91	2,51	2,63
	3 días	7,49	10,77	1,73	4,08
	7 días	4,13	3,8	1,23	2,77
	14/18 días	3,59	1,82	1,53	1,27

Dosis (mg/kg)	Tiempo	Neutrófilos de NHP masculino (G-CSF) ($10^9/L$)	Neutrófilos de NHP femenino (G-CSF) ($10^9/L$)	Neutrófilos de NHP masculino (EPO) ($10^9/L$)	Neutrófilos de NHP femenino (EPO) ($10^9/L$)
0,005	Pre-dosis	1,52	2,54	5,46	5,96
	24 horas	16,44	8,6	5,37	2,59
	3 días	3,74	1,78	6,08	2,83
	7 días	7,28	2,27	3,51	2,23
	14/18 días	4,31	2,28	1,52	2,54

Como se muestra en la Tabla 39, hubo un aumento de reticulocitos en todos los grupos de EPO de 3 días a 14/18 días después de la dosificación en relación con los niveles de reticulocitos 24 horas después de la dosificación.

Tabla 39. Efecto farmacológico del ARNm de EPO sobre el recuento de neutrófilos

Dosis (mg/kg)	Tiempo	Neutrófilos de NHP masculino (G-CSF) ($10^{12}/L$)	Neutrófilos de NHP femenino (G-CSF) ($10^{12}/L$)	Neutrófilos de NHP masculino (EPO) ($10^{12}/L$)	Neutrófilos de (EPO) femenino ($10^{12}/L$)
0,5	Pre-dosis	0,067	0,055	0,107	0,06
	24 horas	0,032	0,046	0,049	0,045
	3 días	0,041	0,017	0,09	0,064
	7 días	0,009	0,021	0,35	0,367
	14/18 días	0,029	0,071	0,066	0,071
0,05	Pre-dosis	0,055	0,049	0,054	0,032
	24 horas	0,048	0,046	0,071	0,04
	3 días	0,101	0,061	0,102	0,105
	7 días	0,157	0,094	0,15	0,241
	14/18 días	0,107	0,06	0,067	0,055
0,005	Pre-dosis	0,037	0,06	0,036	0,052
	24 horas	0,037	0,07	0,034	0,061
	3 días	0,037	0,054	0,079	0,118
	7 días	0,046	0,066	0,049	0,087
	14/18 días	0,069	0,057	0,037	0,06

Como se muestra en las Tablas 40-42, la administración de ARN modificado con EPO tuvo un efecto sobre otros parámetros eritropoyéticos que incluyen la hemoglobina (HGB), el hematocrito (HCT) y el recuento de glóbulos rojos (RBC).

Tabla 40. Efecto farmacológico del ARNm de EPO sobre la hemoglobina

Dosis (mg/kg)	Tiempo	NHP masculino (G-CSF) HGB (g/L)	NHP femenino (G-CSF) HGB (g/L)	NHP masculino (EPO) HGB (g/L)	NHP femenino (EPO) HGB (g/L)
0,5	Pre-dosis	133	129	134	123
	24 horas	113	112	127	108
	3 días	118	114	126	120
	7 días	115	116	140	134
	14/18 días	98	113	146	133

Dosis (mg/kg)	Tiempo	NHP masculino (G-CSF) HGB (g/L)	NHP femenino (G-CSF) HGB (g/L)	NHP masculino (EPO) HGB (g/L)	NHP femenino (EPO) HGB (g/L)
0,05	Pre-dosis	137	129	133	133
	24 horas	122	117	123	116
	3 días	126	115	116	120
	7 días	126	116	126	121
	14/18 días	134	123	133	129
0,005	Pre-dosis	128	129	132	136
	24 horas	117	127	122	128
	3 días	116	127	125	130
	7 días	116	129	119	127
	14/18 días	118	129	128	129

Tabla 41. Efecto farmacológico del ARNm de EPO sobre el hematocrito

Dosis (mg/kg)	Tiempo	NHP masculino(G-CSF) HCT (L/L)	NHP femenino (G-CSF) HCT (L/L)	NHP masculino (EPO) HCT (L/L)	NHP femenino (EPO) HCT (L/L)
0,5	Pre-dosis	0,46	0,43	0,44	0,4
	24 horas	0,37	0,38	0,4	0,36
	3 días	0,39	0,38	0,41	0,39
	7 días	0,39	0,38	0,45	0,45
	14/18 días	0,34	0,37	0,48	0,46
0,05	Pre-dosis	0,44	0,44	0,45	0,43
	24 horas	0,39	0,4	0,43	0,39
	3 días	0,41	0,39	0,38	0,4
	7 días	0,42	0,4	0,45	0,41
	14/18 días	0,44	0,4	0,46	0,43
0,005	Pre-dosis	0,42	0,42	0,48	0,45
	24 horas	0,4	0,42	0,42	0,43
	3 días	0,4	0,41	0,44	0,42
	7 días	0,39	0,42	0,41	0,42
	14/18 días	0,41	0,42	0,42	0,42

Tabla 42. Efecto farmacológico del ARNm de EPO en los glóbulos rojos

Dosis (mg/kg)	Tiempo	NHP masculino (G-CSF) RBC ($10^{12}/L$)	NHP femenino (G-CSF) RBC ($10^{12}/L$)	NHP masculino (EPO) RBC ($10^{12}/L$)	NHP femenino (EPO) RBC ($10^{12}/L$)
0,5	Pre-dosis	5,57	5,57	5,43	5,26
	24 horas	4,66	4,96	5,12	4,69
	3 días	4,91	4,97	5,13	5,15
	7 días	4,8	5,04	5,55	5,68
	14/18 días	4,21	4,92	5,83	5,72
0,05	Pre-dosis	5,68	5,64	5,57	5,84
	24 horas	4,96	5,08	5,25	5,18
	3 días	5,13	5,04	4,81	5,16
	7 días	5,17	5,05	5,37	5,31
	14/18 días	5,43	5,26	5,57	5,57
0,005	Pre-dosis	5,67	5,36	6,15	5,72
	24 horas	5,34	5,35	5,63	5,35
	3 días	5,32	5,24	5,77	5,42

Dosis (mg/kg)	Tiempo	NHP masculino (G-CSF) RBC ($10^{12}/L$)	NHP femenino (G-CSF) RBC ($10^{12}/L$)	NHP masculino (EPO) RBC ($10^{12}/L$)	NHP femenino (EPO) RBC ($10^{12}/L$)
7 días	5,25	5,34	5,49	5,35	
	14/18 días	5,37	5,34	5,67	5,36

Como se muestra en las Tablas 43 y 44, la administración de ARN modificado tuvo un efecto sobre los parámetros químicos del suero, incluidas la alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST).

Tabla 43. Efecto farmacológico del ARNm de EPO sobre la alanina transaminasa

Dosis (mg/kg)	Tiempo	NHP masculino (G-CSF) ALT (U/L)	NHP femenino (G-CSF) ALT (U/L)	NHP masculino (EPO) ALT (U/L)	NHP femenino (EPO) ALT (U/L)
0,5	Pre-dosis	29	216	50	31
	2 días	63	209	98	77
	4 días	70	98	94	87
	7 días	41	149	60	59
	14días	43	145	88	44
0,05	Pre-dosis	58	53	56	160
	2 días	82	39	95	254
	4 días	88	56	70	200
	7 días	73	73	64	187
	14días	50	31	29	216
0,005	Pre-dosis	43	51	45	45
	2 días	39	32	62	48
	4 días	48	58	48	50
	7 días	29	55	21	48
	14días	44	46	43	51

Table 44. Efecto farmacológico del ARNm de EPO sobre aspartato transaminasa;

Dosis (mg/kg)	Tiempo	NHP masculino (G-CSF) AST (U/L)	NHP femenino (G-CSF) AST (U/L)	NHP masculino (EPO) AST (U/L)	NHP femenino (EPO) AST (U/L)
0,5	Pre-dosis	32	47	59	20
	2 días	196	294	125	141
	4 días	67	63	71	60
	7 días	53	68	56	47
	14días	47	67	82	44
0,05	Pre-dosis	99	33	74	58
	2 días	95	34	61	80
	4 días	69	42	48	94
	7 días	62	52	53	78
	14días	59	20	32	47
0,005	Pre-dosis	35	54	39	40
	2 días	70	34	29	25
	4 días	39	36	43	55
	7 días	28	31	55	31
	14días	39	20	35	54

Como se muestra en la Tabla 45, la administración de ARN modificado provoca un aumento de citoquinas, interferón-alfa (IFN-alfa) después de la administración de ARNm modificado.

Tabla 45. Efecto farmacológico del ARNm de EPO sobre la alanina transaminasa

Dosis (mg/kg)	Tiempo	NHP masculino (G-CSF) IFN-alfa (pg/mL)	NHP femenino (G-CSF) IFN-alfa (pg/mL)	NHP masculino (EPO) fpg/mL	NHP femenino (EPO) pg/mL
0,5	Pre-dosis	0	0	0	0
	Día 1 + 8 h	503,8	529,2	16,79	217,5
	4 días	0	0	0	0
0,05	Pre-dosis	0	0	0	0
	Día 1 + 8 h	0	0	0	0
	4 días	0	0	0	0
0,005	Pre-dosis	0	0	0	0
	Día 1 + 8 h	0	0	0	0
	4 días	0	0	0	0

Ejemplo 23. Estudio de administración intramuscular y/o subcutánea en primates no humanos

- Formulaciones que contienen ARNm de EPO modificado (SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) o ARNm de G-CSF (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) en solución salina a primates no humanos (mono Cynomolgus) (NHP) por vía intramuscular (IM) o subcutánea (SC). La dosis única modificada de ARNm de 0,05 mg/kg o 0,005 mg/kg estaba en un volumen de dosis de 0,5 ml/kg. A los primates no humanos se les extrae sangre 5-6 días antes de la dosificación para determinar la concentración de proteína sérica y un hemograma completo de referencia. Después de la administración con la formulación de ARNm modificada, se extrae sangre a los NHP a las 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 días y 14 días para determinar la expresión de proteína. La expresión proteica de G-CSF y EPO se determina por ELISA. A las 24 horas, 72 horas, 7 días y 14 días después de la administración también se determina el hemograma completo del NHP. La orina de los NHP se recolecta en el transcurso de todo el experimento y se analiza para evaluar la seguridad clínica. El tejido cerca del sitio de inyección también se recolecta y analiza para determinar la expresión de proteínas.

Ejemplo 24. Tráfico de ARNm modificado

- Para determinar la localización y/o el tráfico del ARNm modificado, se pueden realizar estudios como sigue.

- Las formulaciones LNP de siARN y ARNm modificado se formulan según procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en esta invención. Las formulaciones de LNP pueden incluir al menos un ARNm modificado que puede codificar una proteína tal como G-CSF, EPO, Factor VII y/o cualquier proteína descrita en esta invención. Las formulaciones pueden administrarse localmente en el músculo de los mamíferos mediante inyección intramuscular o subcutánea. La dosis de ARNm modificado y el tamaño del LNP pueden variar para determinar el efecto sobre el tráfico en el cuerpo del mamífero y/o para evaluar el impacto sobre una reacción biológica tal como, pero sin limitarse a, inflamación. Se puede extraer sangre al mamífero en diferentes momentos para determinar la expresión de la proteína codificada por el ARNm modificado presente en el suero y/o para determinar el hemograma completo en el mamífero.

- Por ejemplo, el ARNm modificado que codifica el Factor VII, expresado en el hígado y secretado en el suero, puede administrarse por vía intramuscular y/o subcutánea. Coincidentemente o antes de la administración de ARNm modificado, se administra siARN para eliminar el Factor VII endógeno. El factor VII que surge de la inyección intramuscular y/o subcutánea de ARNm modificado se administra y se mide en la sangre. Además, los niveles de Factor VII se miden en los tejidos cercanos al lugar de la inyección. Si el Factor VII se expresa en sangre, entonces hay tráfico del ARNm modificado. Si el Factor VII se expresa en el tejido y no en la sangre, entonces solo hay expresión local del Factor VII.

Ejemplo 25. Formulaciones de ARNm Modificado Múltiple

- Las formulaciones de LNP de ARNm modificado se formulan según procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en esta invención. Las formulaciones de LNP pueden incluir al menos un ARNm modificado que puede codificar una proteína tal como G-CSF, EPO, trombopoyetina y/o cualquier proteína descrita en esta invención o conocida en la técnica. El al menos un ARNm modificado puede incluir 1, 2, 3, 4 o 5 moléculas de ARNm modificadas. Las formulaciones que contienen al menos un ARNm modificado pueden administrarse por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea en regímenes de dosificación única o múltiple. Las muestras biológicas tales como, entre

5 otras, sangre y/o suero pueden recogerse y analizarse en diferentes momentos antes y/o después de la administración de al menos una formulación de ARNm modificada. Una expresión de una proteína en una muestra biológica de 50-200 pg/ml después de haber administrado al mamífero una formulación que contiene al menos un ARNm modificado que codifica dicha proteína se consideraría biológicamente eficaz.

Ejemplo 26. Estudios de relación de polietilenglicol

A. Formulación y caracterización de PEG LNP

10 Las nanopartículas de lípidos (LNP) se formularon utilizando el procedimiento de bomba de jeringa. Los LNP se formularon en una proporción en peso de 20:1 de lípido total a ARNm de G-CSF modificado (SEQ ID NO: 6; la cola polA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina). Los intervalos de relación molar de las formulaciones se muestran en la Tabla 46.

15 **Tabla 46. Relaciones molares**

	DLin-KC2-DMA	DSPC	Colesterol	PEG-c-DOMG
Porcentaje en moles (mol%)	50,0	10,0	37-38,5	1,5-3

20 Dos tipos de lípidos PEG, 1,2-dimiristoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (PEG-DMG, NOF Cat # SUNBRIGHT® GM-020) y 1,2-distearoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (PEG-DSG, NOF Cat # SUNBRIGHT® GS-020), se probaron a 1,5 o 3,0 % en moles. Después de la formación de los LNP y la encapsulación del ARNm de G-CSF modificado, las formulaciones de LNP se caracterizaron por tamaño de partícula, potencial zeta y porcentaje de encapsulación y los resultados se muestran en la Tabla 47.

Tabla 47. Caracterización de formulaciones de LNP

Formulación n.º	NPA-071-1	NPA-072-1	NPA-073-1	NPA-074-1
Lípido	PEG-DMG 1,5 %	PEG-DMG 3 %	PEG-DSA 1,5 %	PEG-DSA 3 %
Tamaño medio	95 nm PDI: 0,01	85 nm PDI: 0,06	95 nm PDI: 0,08	75 nm PDI: 0,08
Zeta a pH 7.4	-1,1 mV	-2,6 mV	1,7 mV	0,7 mV
Encapsulación (RiboGreen)	88 %	89 %	98 %	95 %

25 B. Cribado *in vivo* de PEG LNP

30 Se administraron formulaciones de PEG LNP descritas en la Tabla 40 a ratones (n=5) por vía intravenosa a una dosis de 0,5 mg/kg. Se recogió suero de los ratones a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 8 días después de la administración de la formulación. El suero se analizó mediante ELISA para determinar la expresión de proteína de G-CSF y los niveles de expresión se muestran en la Tabla 48. Las formulaciones de LNP que usaban PEG-DMG dieron niveles sustancialmente más altos de expresión de proteína que las formulaciones de LNP con PEG-DSA.

Tabla 48. Expresión de proteína

Lípido	Formulación n.º	Tiempo	Expresión de proteína (pg/ml)
PEG-DMG, 1,5 %	NPA-071-1	2 horas	114.102
		8 horas	357.944
		24 horas	104.832
		48 horas	6.697
		72 horas	980
		8 días	0
PEG-DMG, 3 %	NPA-072-1	2 horas	154.079
		8 horas	354.994
		24 horas	164.311
		48 horas	13.048
		72 horas	1.182
		8 días	13
PEG-DSA, 1,5 %	NPA-073-1	2 horas	3.193
		8 horas	6.162

Lípido	Formulación n.º	Tiempo	Expresión de proteína (pg/ml)
		24 horas	446
		48 horas	197
		72 horas	124
		8 días	5
PEG-DSA, 3 %	NPA-074-1	2 horas	259
		8 horas	567
		24 horas	258
		48 horas	160
		72 horas	328
		8 días	33

Ejemplo 27. Estudios de formulación de lípidos catiónicos

A. Formulación y caracterización de nanopartículas lipídicas catiónicas

Las nanopartículas de lípidos (LNP) se formularon utilizando el procedimiento de bomba de jeringa. Los LNP se formularon en una proporción en peso de lípido total a ARNm modificado de 20:1. Los intervalos finales de relación molar de lípidos de lípidos catiónicos, DSPC, colesterol y PEG-c-DOMG se describen en la Tabla 49.

Tabla 49. Relaciones molares

	Lípido catiónico	DSPC	Colesterol	PEG-c-DOMG
Porcentaje molar (% en moles)	50,0	10,0	38,5	1,5

Se mezclaron una solución de lípidos 25 mM en etanol y ARN modificado en citrato 50 mM a un pH de 3 para crear la formación espontánea de vesículas. Las vesículas se estabilizaron en etanol antes de extraer el etanol y hubo un intercambio de tampón por diálisis. A continuación, los LNP se caracterizaron por tamaño de partícula, potencial zeta y porcentaje de encapsulación. La Tabla 50 describe la caracterización de los LNP que encapsulan el ARNm modificado con EPO (SEQ ID NO: cola poliA 9 de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) o ARNm modificado con G-CSF (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) usando DLin-MC3-DMA, DLin-DMA o C12-200 como lípido catiónico.

Tabla 50. Caracterización de formulaciones de lípidos catiónicos

Formulación n.º	NPA-071-1	NPA-072-1	NPA-073-1	NPA-074-1	NPA-075-1	NPA-076-1
Lípido	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-DMA	DLin-DMA	C12-200	C12-200
ARN modificado	EPO	G-CSF	EPO	G-CSF	EPO	G-CSF
Tamaño medio	89 nm PDI: 0,07	96 nm PDI: 0,08	70 nm PDI: 0,04	73 nm PDI: 0,06	97 nm PDI: 0,05	103 nm PDI: 0,09
Zeta a pH 7.4	-1,1 mV	-1,4 mV	-1,6 mV	-0,4 mV	1,4 mV	0,9 mV
Encapsulación (RiboGreen)	100 %	100 %	99 %	100 %	88 %	98 %

B. Cribado *in vivo* de formulaciones catiónicas de LNP

Se administraron formulaciones de lípidos catiónicos descritas en la Tabla 42 a ratones (n=5) por vía intravenosa a una dosis de 0,5 mg/kg. Se recogió suero de los ratones a las 2 horas, 24 horas, 72 horas y/o 7 días después de la administración de la formulación. El suero se analizó mediante ELISA para determinar la expresión proteica de EPO o G-CSF y los niveles de expresión se muestran en la Tabla 51.

Tabla 51. Expresión de proteína

ARNm modificado	Formulación n.º	Tiempo	Expresión de proteína (pg/ml)
EPO	NPA-071-1	2 horas	304.190,0
		24 horas	166.811,5

ARNm modificado	Formulación n.º	Tiempo	Expresión de proteína (pg/ml)
		72 horas	1.356,1
		7 días	20,3
EPO	NPA-073-1	2 horas	73.852,0
		24 horas	75.559,7
		72 horas	130,8
EPO	NPA-075-1	2 horas	413.010,2
		24 horas	56.463,8
G-CSF	NPA-072-1	2 horas	62.113,1
		24 horas	53.206,6
G-CSF	NPA-074-1	24 horas	25.059,3
G-CSF	NPA-076-1	2 horas	219.198,1
		24 horas	8.470,0

Se observó toxicidad en los ratones a los que se les administraron las formulaciones de LNP con el lípido catiónico C12-200 (NPA-075-1 y NPA-076-1) y se sacrificaron a las 24 horas porque presentaban síntomas tales como pelaje áspero, acobardamiento y pérdida de peso superior al 10 %. Se esperaba que C12-200 fuera más tóxico, pero también

5 tuvo un alto nivel de expresión durante un período corto. El lípido catiónico DLin-DMA (NPA-073-1 y NPA-074-1) tuvo la expresión más baja de los tres lípidos catiónicos probados. DLin-MC3-DMA (NPA-071-1 y NPA-072-1) mostró una buena expresión hasta el día tres y estuvo por encima de la muestra de fondo hasta el día 7 para las formulaciones de EPO.

10 **Ejemplo 28. Procedimiento de cribado de la expresión de proteínas**

A. Ionización por electropulverización

15 Se prepara y analiza una muestra biológica que puede contener proteínas codificadas por ARN modificado administrado al sujeto según el protocolo del fabricante para la ionización por electropulverización (ESI) utilizando 1, 2, 3 o 4 analizadores de masas. Una muestra biológica también se puede analizar usando un sistema de espectrometría de masas ESI en tandem.

20 Los patrones de fragmentos de proteína, o proteínas enteras, se comparan con controles conocidos para una proteína dada y la identidad se determina por comparación.

B. Desorción/ionización láser asistida por matriz

25 Se prepara y analiza una muestra biológica que puede contener proteínas codificadas por ARN modificado administrado al sujeto según el protocolo del fabricante para la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI).

Los patrones de fragmentos de proteína, o proteínas enteras, se comparan con controles conocidos para una proteína dada y la identidad se determina por comparación.

30 **C. Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas-Espectrometría de masas**

Una muestra biológica, que puede contener proteínas codificadas por ARN modificado, se puede tratar con una enzima tripsina para digerir las proteínas contenidas dentro. Los péptidos resultantes se analizan mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas-espectrometría de masas (LC/MS/MS). Los péptidos se fragmentan en el espectrómetro de masas para proporcionar patrones de diagnóstico que se pueden emparejar con bases de datos de secuencias de proteínas mediante algoritmos informáticos. La muestra digerida puede diluirse para lograr 1 ng o menos de material de partida para una proteína dada. Las muestras biológicas que contienen un fondo tampón simple (por ejemplo, agua o sales volátiles) son susceptibles de digerirse directamente en solución; los fondos más complejos (por ejemplo, detergente, sales no volátiles, glicerol) requieren una etapa de limpieza adicional para facilitar el análisis de la muestra.

Los patrones de fragmentos de proteína, o proteínas enteras, se comparan con controles conocidos para una proteína dada y la identidad se determina por comparación.

45 **Ejemplo 29. Estudios *in vivo* de LNP**

El ARNm de mCherry (SEQ ID NO: 14; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la

secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se formuló como una nanopartícula lipídica (LNP) utilizando el procedimiento de bomba de jeringa. El LNP se formuló en una relación en peso de lípido total a ARNm modificado de 20:1 con una relación molar de lípido final de 50:10:38,5:1,5 (DLin-KC2-DMA: DSPC: Colesterol: PEG-c-DOMG). La formulación de mCherry, enumerada en la Tabla 52, se caracterizó por tamaño de partícula, potencial zeta y encapsulación.

Tabla 52. Formulación mCherry

Formulación #	NPA-003-5
ARNm modificado	mCherry
Tamaño medio	105 nm PDI: 0,09
Zeta a pH 7.4	
Encaps. (RiboGr)	100 %

La formulación de LNP se administró a ratones (n=5) por vía intravenosa a una dosis modificada de ARNm de 100 ug. Los ratones se sacrificaron a las 24 horas después de la dosificación. El hígado y el bazo de los ratones a los que se les administró formulaciones de ARNm modificado con mCherry se analizaron mediante inmunohistoquímica (IHC), transferencia Western o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

La histología del hígado mostró una expresión uniforme de mCherry en toda la sección, mientras que los animales no tratados no expresaron mCherry. También se usaron transferencias Western para confirmar la expresión de mCherry en los animales tratados, mientras que no se detectó mCherry en los animales no tratados. La tubulina se utilizó como marcador de control y se detectó tanto en los ratones tratados como en los no tratados, lo que indica que la expresión normal de proteínas en los hepatocitos no se vio afectada.

FACS e IHC también se realizaron en los bazos de ratones mCherry y no tratados. Todas las poblaciones de células leucocitarias fueron negativas para la expresión de mCherry mediante análisis FACS. Por IHC, tampoco hubo diferencias observables en el bazo entre los ratones tratados con mCherry y los no tratados.

Ejemplo 30. Estudios *in vivo* de bomba de jeringa

El ARNm modificado de mCherry se formula como una nanopartícula lipídica (LNP) utilizando el procedimiento de bomba de jeringa. El LNP se formula en una proporción en peso de lípido total a ARNm modificado de 20:1 con una relación molar de lípido final de 50:10:38,5:1,5 (DLin-KC2-DMA: DSPC: Colesterol: PEG-c-DOMG). La formulación de mCherry se caracteriza por el tamaño de las partículas, el potencial zeta y la encapsulación.

La formulación de LNP se administra a ratones (n=5) por vía intravenosa a una dosis de ARNm modificado de 10 ó 100 ug. Los ratones se sacrifican a las 24 horas después de la dosificación. El hígado y el bazo de los ratones a los que se les administraron formulaciones de ARNm modificadas con mCherry se analizan mediante inmunohistoquímica (IHC), transferencia Western o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Ejemplo 31. Expresión *in vitro* e *in vivo*

A. Expresión *in vitro* en células humanas usando formulaciones de lipidoides

La relación de ARNm a lipidóide utilizada para probar la transfección *in vitro* se prueba empíricamente en diferentes relaciones de lipidóide:ARNm. Trabajos previos con siARN y lipidoides han utilizado relaciones de peso:peso de lípido:siARN de 2,5:1, 5:1, 10:1 y 15:1. Dada la longitud más larga del ARNm en relación con el siARN, puede ser eficaz una relación peso:peso más baja de lipidóide a ARNm. Además, para la comparación, el ARNm también se formuló utilizando vehículos de suministro de lípidos catiónicos RNAIMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) o TRANSIT-ARNm (Mirus Bio, Madison, WI). La capacidad de la luciferasa formulada con lipidoides (secuencia de ADNc IVT mostrada en SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16, la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia, tapa 5', Tapa 1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) proteína verde fluorescente (GFP) (la secuencia de tipo salvaje de ADNc de IVT se muestra en la SEQ ID NO: 17; la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 18, la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia, tapa 5', Tapa1), G-CSF (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1), y ARNm EPO (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa1) para expresar el producto proteico deseado puede confirmarse mediante luminiscencia para la expresión de luciferasa, citometría de flujo para la expresión de GFP y mediante ELISA para la secreción de G-CSF y eritropoyetina (EPO).

B. Expresión *in vivo* después de la inyección intravenosa

La administración intravenosa sistémica de las formulaciones se crea utilizando varios lipidoides diferentes que incluyen, entre otros, 98N12-5, C12-200 y MD1.

- 5 Las formulaciones de lipidoides que contienen ARNm se inyectan por vía intravenosa en animales. La expresión de las proteínas codificadas por ARNm modificado (ARNmm) se evalúa en muestras de sangre y/o de otros órganos tales como, entre otros, el hígado y el bazo recogidos del animal. La realización de estudios intravenosos de dosis única también permitirá una evaluación de la magnitud, la respuesta a la dosis y la longevidad de la expresión del producto deseado.
- 10 En un aspecto, las formulaciones basadas en lipidoides de 98N12-5, C12-200, MD1 y otros lipidoides se utilizan para administrar luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente mCherry, fosfatasa alcalina secretada (sAP), G-CSF humano, factor IX humano o ARNm de eritropoyetina humana (EPO) en el animal. Después de formular ARNm con un lípido, como se describió anteriormente, los animales se dividen en grupos para recibir una formulación salina o una formulación de lípido que contiene uno de los ARNm diferentes seleccionados de luciferasa, GFP, mCherry, sAP, G-CSF humano, factor IX humano y EPO humana. Antes de la inyección en el animal, las formulaciones de lipidoides que contienen ARNm se diluyen en PBS. A continuación, a los animales se les administra una dosis única de ARNm formulado que varía desde una dosis de 10 mg/kg hasta dosis tan bajas como 1 ng/kg, con un intervalo preferido de 10 mg/kg a 100 ng/kg, donde la dosis de ARNm depende del peso corporal
- 15 del animal tal como un ratón de 20 gramos que recibe una formulación máxima de 0,2 ml (la dosificación no se basa en ARNm por kg de peso corporal). Después de la administración de la formulación de lípido de ARNm, se obtienen suero, tejidos y/o lisados de tejidos y se determina el nivel del producto codificado por ARNm en un intervalo de tiempo único y/o en un intervalo de tiempo. La capacidad de luciferasa, GFP, mCherry, sAP, G-CSF, factor IX y ARNm de EPO formulados con lipidoides para expresar el producto proteico deseado se confirma mediante luminiscencia para la expresión de luciferasa, citometría de flujo para la expresión de GFP y expresión de mCherry , por actividad enzimática para sAP, o por ELISA para la sección de G-CSF, Factor IX y/o EPO.
- 20
- 25

También se realizan estudios adicionales para un régimen de dosis múltiples para determinar la expresión máxima de ARNm, para evaluar la saturabilidad de la expresión impulsada por ARNm (al proporcionar una formulación de ARNm activo y de control en paralelo o en secuencia) y para determinar la viabilidad de la administración repetida del fármaco (administrando ARNm en dosis separadas por semanas o meses y, a continuación, determinando si el nivel de expresión se ve afectado por factores tales como la inmunogenicidad). También se determina una evaluación de la función fisiológica de proteínas tal como G-CSF y EPO mediante el análisis de muestras del animal analizado y la detección de aumentos en los recuentos de granulocitos y glóbulos rojos, respectivamente. La actividad de un producto proteico expresado tal como el Factor IX, en animales también puede evaluarse mediante el análisis de la actividad enzimática del Factor IX (tal como un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada) y el efecto de los tiempos de coagulación.

C. Expresión *in vitro* después de inyección intramuscular y/o subcutánea

40 El uso de formulaciones de lipidoides para administrar oligonucleótidos, incluido el ARNm, a través de una vía intramuscular o una vía de inyección subcutánea debe evaluarse, ya que no se ha informado anteriormente. Se evalúan las inyecciones intramusculares y/o subcutáneas de ARNm para determinar si las formulaciones lipidoides que contienen ARNm son capaces de producir la expresión tanto localizada como sistémica de una parte deseada.

45 Las formulaciones de lipidoides de 98N12-5, C12-200 y MD1 que contienen ARNm seleccionado de luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente mCherry, fosfatasa alcalina secretada (sAP), G-CSF humano, factor IX humano o eritropoyetina humana (EPO) se inyecta ARNm por vía intramuscular y/o subcutánea en animales. La expresión de proteínas codificadas por ARNm se evalúa tanto dentro del tejido muscular o subcutáneo como sistémicamente en la sangre y otros órganos tales como el hígado y el bazo. Los estudios de dosis única permiten una evaluación de la magnitud, la respuesta a la dosis y la duración de la expresión del producto deseado.

55 Los animales se dividen en grupos para recibir una formulación salina o una formulación que contiene ARNm modificado. Antes de la inyección, las formulaciones de lípidos que contienen ARNm se diluyen en PBS. A los animales se les administra una dosis intramuscular única de ARNm formulado que varía desde 50 mg/kg hasta dosis tan bajas como 1 ng/kg con un intervalo preferido de 10 mg/kg a 100 ng/kg. Una dosis máxima para la administración intramuscular, para un ratón, es de aproximadamente 1 mg de ARNm o tan baja como 0,02 ng de ARNm para una inyección intramuscular en la extremidad trasera del ratón. Para la administración subcutánea, a los animales se les administra una dosis subcutánea única de ARNm formulado que varía desde 400 mg/kg hasta dosis tan bajas como 1 ng/kg con un intervalo preferido de 80 mg/kg a 100 ng/kg. Una dosis máxima para la administración subcutánea, para un ratón, es de aproximadamente 8 mg de ARNm o tan baja como 0,02 ng de ARNm.

60

65

Para un ratón de 20 gramos, el volumen de una inyección intramuscular única es como máximo de 0,025 ml y una inyección subcutánea única es de 0,2 ml como máximo. La dosis óptima de ARNm administrada se calcula a partir del peso corporal del animal. En varios puntos en el tiempo después de la administración del ARNm-lípidoide, se

obtiene suero, tejidos y lisados de tejido y se determina el nivel del producto codificado por ARNm. Se confirma la capacidad de la luciferasa formulada con lipidoides, la proteína fluorescente verde (GFP), la proteína fluorescente mCherry, la fosfatasa alcalina secretada (sAP), el G-CSF humano, el factor IX humano o el ARNm de la eritropoyetina humana (EPO) para expresar el producto proteico deseado por luminiscencia para expresión de luciferasa, citometría de flujo para expresión de GFP y mCherry, por actividad enzimática para sAP, y por ELISA para G-CSF, factor IX y secreción de eritropoyetina (EPO).

También se realizan estudios adicionales para un régimen de dosis múltiples para determinar la expresión máxima usando ARNm, para evaluar la saturabilidad de la expresión impulsada por ARNm (logrado al dar una formulación de ARNm activa y de control en paralelo o en secuencia), y para determinar la factibilidad de la administración repetida del fármaco (administrando ARNm en dosis separadas por semanas o meses y, a continuación, determinando si el nivel de expresión se ve afectado por factores tales como la inmunogenicidad). Los estudios que utilizan múltiples sitios de inyección subcutánea o intramuscular en un punto de tiempo también se utilizan para aumentar aún más la exposición al fármaco de ARNm y mejorar la producción de proteínas. Se determina una evaluación de la función fisiológica de las proteínas, tales como GFP, mCherry, sAP, G-CSF humano, factor IX humano y EPO humana, mediante el análisis de muestras de los animales analizados y la detección de un cambio en el recuento de granulocitos y/o los recuentos de glóbulos rojos. La actividad de un producto proteico expresado, tal como el Factor IX, en animales también puede evaluarse mediante el análisis de la actividad enzimática del Factor IX (tal como un ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada) y el efecto de los tiempos de coagulación.

20 Ejemplo 32: administración *in vivo* utilizando Lipoplexes (lipoplejos)

A. Lipoplex de ARN modificado con EPO humana

Una formulación que contiene 100 µg de ARNm de eritropoyetina humana (EPO) modificada (secuencia de ARNm mostrada en SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1) (EPO; 5-metilcitosina totalmente modificada; N1-metilpseudouridina) se lipoplegó con 30 % en volumen de RNAIMAX™ (Lipoplex-h-Epo-46; Generación 2 o Gen2) en 50-70 µl administrados por vía intramuscular a cuatro ratones C57/BL6. Otros grupos consistieron en ratones que recibieron una inyección de ARNm de luciferasa modificado lipoplegado (Lipoplex-luc) (secuencia de ADNc de IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia, tapa 5', Tapa 1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) que sirvió como control que contenía 100 µg de ARNm de luciferasa modificada que se lipoplegó con 30 % en volumen de RNAIMAX™ o ratones que recibieron una inyección del tampón de formulación como control negativo a un volumen de dosis de 65 µl. 13 horas después de la inyección intramuscular, se recogió suero de cada ratón para medir la cantidad de proteína EPO humana en el suero del ratón mediante ELISA de EPO humana y los resultados se muestran en la Tabla 53.

Tabla 53. Producción humana de EPO (ruta de inyección IM)

Formulación	Ratón #1	Ratón #2	Ratón #3	Ratón #4	Media
Lipoplex-h-Epo-46	189,8	92,55	409,5	315,95	251,95
Lipoplex-Luc	0	0	0	0	0
Tampón de formulación	0	0	0	0	0

40 B. Lipoplex de ARN modificado con G-CSF humano

Una formulación que contiene 100 µg de una de dos versiones de ARNm de G-CSF humano modificado (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; Tapa 5', Tapa 1) (G-CSF completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina (G-CSF) o G-CSF completamente modificada con 5-metilcitosina y N1-metil-pseudouridina (G-CSF-N1) lipoplexada con 30 % en volumen de RNAIMAX™ y administrada en 150 µL por vía intramuscular (I.M.), en 150µL por vía subcutánea (S.C.) y en 225µL por vía intravenosa (I.V.) a ratones C57/BL6.

50 A tres grupos de control se les administraron 100 µg de ARNm de luciferasa modificada (secuencia de ADNc IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia, tapa 5', Tapa 1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) por vía intramuscular (Luc-unsp I.M.) o 150 µg de ARNm de luciferasa modificado por vía intravenosa (Luc-unsp I.V.) o 150 µL del tampón de formulación por vía intramuscular (Buffer I.M.). 6 horas después de la administración de una formulación, se recolectó suero de cada ratón para medir la cantidad de proteína G-CSF humana en el suero de ratón mediante ELISA de G-CSF humano y los resultados se muestran en la Tabla 54.

60 Estos resultados demuestran que tanto el ARNm de 5-metilcitosina/pseudouridina como el ARNm de G-CSF humano modificado con 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina pueden dar como resultado una expresión de proteína G-CSF

humana específica en suero cuando se administra mediante vía I.V. o I.M. de administración en una formulación de lipoplex.

Tabla 54. G-CSF humano en suero (Vía de inyección I.M., I.V., S.C.)

Formulación	Vía	G-CSF (pg/ml)
G-CSF	I.M.	85,6
G-CSF-N1	I.M.	40,1
G-CSF	S.C.	3,9
G-CSF N1	S.C.	0,0
G-CSF	I.V.	31,0
G-CSF-N1	I.V.	6,1
Luc-unsp	I.M.	0,0
Luc-unsp	I.V.	0,0
Tampón	I.M.	0,0

5 C. Comparación de Lipoplex de ARN modificado con G-CSF humano

Se administró una formulación que contenía 100 µg de ARNm de G-CSF humano modificado lipoplexado con 30 % en volumen de RNAIMAX™ con una modificación de 5-metilcitosina (5mc) y una modificación de pseudouridina (ψ) (G-CSF-Gen1-Lipoplex), ARNm de G-CSF humano modificado con una modificación de 5mc y ψ en solución salina (G-CSF-Gen1-Salina), ARNm de G-CSF humano modificado con una modificación de N1-5-metilcitosina (N1-5mc) y una modificación ψ lipoplexada con 30 % en volumen de RNAIMAX™ (G-CSF-Gen2-Lipoplex), ARNm de G-CSF humano modificado con una modificación de N1-5mc y ψ en solución salina (G-CSF-Gen2-Salina), luciferasa modificada con una modificación de 5mc y ψ lipoplexada con un 30 % en volumen de RNAIMAX™ (Luc-Lipoplex), o ARNm de luciferasa modificada con una modificación 5 mc y ψ de salina (Luc-Salina) por vía intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) y un grupo de control para cada procedimiento de administración se le proporcionó una dosis de 80 uL del tampón de formulación (F. Buffer) a ratones C57/BL6. 13 horas después de la inyección, se recolectaron suero y tejido del sitio de inyección de cada ratón y se analizaron mediante ELISA G-CSF para comparar los niveles de proteína G-CSF humana. Los resultados de la proteína G-CSF humana en suero de ratón de la administración intramuscular y los resultados de la administración subcutánea se muestran en la Tabla 55.

Estos resultados demuestran que el ARNm de G-CSF humano modificado con 5-metilcitosina/pseudouridina y 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina puede dar como resultado la expresión de proteína G-CSF humana específica en suero cuando se administra a través de una vía de administración de I.M. o S.C. ya sea en una formulación salina o en una formulación de lipoplex. Como se muestra en la Tabla 55, el ARNm de G-CSF humano modificado con 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina generalmente demuestra una mayor producción de proteína G-CSF humana con respecto al ARNm de G-CSF humano modificado con 5-metilcitosina/pseudouridina.

Tabla 55. Proteína G-CSF humana en suero de ratón

Formulación	G-CSF (pg/ml)	
	I.M. Vía de inyección	S.C. Vía de inyección
G-CSF-Gen1-Lipoplex	13,988	42,855
GCSF -Gen1-salina	9,375	4,614
GCSF-Gen2-lipoplex	75,572	32,107
GCSF-Gen2-salina	20,190	45,024
Luc lipoplex	0	3,754
Solución salina Luc	0,0748	0
Tampón de formulación (F. Buffer)	4,977	2,156

30 D. Comparación de lipoplex de ARN modificado de mCherry

Administración intramuscular y subcutánea

35 Una formulación que contiene 100 µg de ARNm de mCherry modificado (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1)

lipoplexado con 30 % en volumen de RNAIMAX™ o ARNm de mCherry modificado en solución salina se administra por vía intramuscular y subcutánea a los ratones. También se administra un tampón de formulación a un grupo de control de ratones por vía intramuscular o subcutánea. El sitio de inyección en los ratones se puede recolectar 17 horas después de la inyección para seccionarlos y determinar el tipo o tipos de células responsables de producir proteína.

5

Administración intravítreas

Una formulación que contiene 10 µg de ARNm de mCherry modificado lipoplexado con RNAIMAX™, ARNm de mCherry modificado en un tampón de formulación, ARNm de luciferasa modificado lipoplexado con RNAIMAX™, ARNm de luciferasa modificado en un tampón de formulación puede administrarse mediante inyección intravítreas (IVT) en ratas en un volumen de dosis de 5 µl/ovo. También se administra un tampón de formulación mediante IVT a un grupo de control de ratas en un volumen de dosis de 5 µl/ovo. Los ojos de las ratas tratadas se pueden recolectar después de 18 horas después de la inyección para seccionarlos y lisarlos para determinar si el ARNm se puede administrar de manera efectiva *in vivo* al ojo y resultar en la producción de proteínas, y también para determinar los tipos de células responsables de producir proteínas *in vivo*.

10

Intranasal

20 **Administración**

Se administra por vía intranasal una formulación que contiene 100 µg de ARNm de mCherry modificado lipoplexado con un 30 % en volumen de RNAIMAX™, ARNm de mCherry modificado en solución salina, ARNm de luciferasa modificado lipoplexado con un 30 % en volumen de RNAIMAX™ o ARNm de luciferasa modificado en solución salina. 25 También se administra un tampón de formulación a un grupo de control por vía intranasal. Los pulmones se pueden recolectar aproximadamente 13 horas después de la instilación para seccionarlos (para aquellos que reciben ARNm de mCherry) u homogeneización (para aquellos que reciben ARNm de luciferasa). Estas muestras se utilizarán para determinar si el ARNm se puede administrar *in vivo* de manera efectiva a los pulmones y dar como resultado la producción de proteínas, y también para determinar los tipos de células responsables de producir proteínas *in vivo*.

30

Ejemplo 33: Administración *in vivo* utilizando relaciones de lípidos variables

Se administró ARNm modificado a ratones C57/BL6 para evaluar las relaciones lipídicas variables y la expresión de proteína resultante. Formulaciones de ARNm de EPO humano modificado de 100 µg (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en la secuencia; tapa 5', Tapa 1; completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) lipoplexada con 10 %, 30 % o 50 % de RNAIMAX™, ARNm de luciferasa modificado de 100 µg (secuencia de ADNc IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16, la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia, tapa 5', Tapa 1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) lipoplexada con 10 %, 30 % o 50 % de RNAIMAX™ o un tampón de formulación se administraron por vía intramuscular a ratones en una dosis única de 70 µl. Se recogió el suero 13 horas después de la inyección para someterse a un ELISA de EPO humano para determinar el nivel de proteína EPO humana en cada ratón. Los resultados del ELISA de EPO humano, mostrados en la Tabla 56, muestran que la EPO humana modificada expresada en el músculo se segregó en el suero para cada uno de los diferentes porcentajes de RNAIMAX™.

45

Tabla 56. Proteína EPO humana en suero de ratón (vía inyectable IM)

Formulación	EPO (pg/ml)
Epo + 10 % RNAiMAX	11,4
Luc + 10 % RNAiMAX	0
Epo + 30% RNAiMAX	27,1
Luc + 30% RNAiMAX	0
Epo + 50% RNAiMAX	19,7
Luc + 50% RNAiMAX	0
Tampón de formulación (F. Buffer)	0

Ejemplo 34: administración intramuscular y subcutánea *in vivo* en mamíferos

50

ARNm de EPO modificado humano (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 9; cola poliA de

aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa 1) completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina formulada en tampón de formulación se administró a ratones C57/BL6 o ratas Sprague-Dawley para evaluar la dependencia de la dosis en la producción de EPO humana. A las ratas se les inyectaron por vía intramuscular 50 µl de ARNm de EPO humana modificada (h-EPO), ARNm de luciferasa modificada (Luc) (secuencia de ADNc de IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia, tapa 5', Tapa1, completamente modificado con 5-metilcitosina en cada citosina y reemplazo de pseudouridina en cada sitio de uridina) o el tampón de formulación (F.Buffer) como se describe en la tabla de dosificación Tabla 57.

10 A los ratones se les inyectaron por vía intramuscular o subcutánea 50 µl de ARNm de EPO humana modificada (h-EPO), ARNm de luciferasa modificada (Luc) o el tampón de formulación (F.Buffer) como se describe en la tabla de dosificación de la Tabla 58. 13 horas después de la inyección de sangre se recogió y se analizó el suero para determinar la cantidad de EPO humana para cada ratón o rata. El promedio y la media geométrica en pg/ml para el estudio con ratas también se muestran en la Tabla 57.

15

Tabla 57. Estudio de ratas

	Grupo	Dosis	Prom. pg/ml	Medio-geométrico pg/ml
h-EPO	G#1	150 µg	67,7	67,1
h-EPO	G#2	100 µg	79,4	66,9
h-EPO	G#3	50 µg	101,5	85,4
h-EPO	G#4	10 µg	46,3	31,2
h-EPO	G#5	1 up	28,7	25,4
Luc	G#6	100 µg	24,5	22,4
F.Buffer (tampón de formulación)	G#7	-	18,7	18,5

Tabla 58. Estudio de ratones

Vía	Tratamiento	Grupo	Dosis	Nivel medio en suero pg/ml
IM	h-EPO	1	100 µg	96,2
IM	h-EPO	2	50 µg	63,5
IM	h-EPO	3	25 µg	18,7
IM	h-EPO	4	10 µg	25,9
IM	h-EPO	5	1 µg	2,6
IM	Luc	6	100 µg	0
IM	F .Buffer (tampón de formulación)	7	-	1,0
SC	h-EPO	1	100 µg	72,0
SC	Luc	2	100 µg	26,7
SC	F.Buffer (tampón de formulación)	3	--	17,4

Ejemplo 35: Duración de la actividad después de la administración intramuscular *in vivo*

20 Se administró a ratas Sprague-Dawley ARNm de EPO humano modificado (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) formulado en tampón de formulación para determinar la duración de la respuesta a la dosis. A las ratas se les inyectaron por vía intramuscular 50 µl de ARNm de EPO humana modificado (h-EPO), ARNm de luciferasa modificada (secuencia de ADNc IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia, tapa 5', Tapa1, completamente modificado con 5-metilcitosina en cada citosina y reemplazo de pseudouridina en cada sitio de uridina) (Luc) o el tampón de formulación (F.Buffer) como se describe en la tabla de dosificación Tabla 59. Se extrajo sangre de las ratas 2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas después de la inyección intramuscular para determinar la concentración de EPO humana en suero en un momento dado. El promedio y la media geométrica en pg/ml para este estudio también se muestran en la Tabla 59.

Tabla 59. Gráfico de dosificación

	Grupo	Dosis	Prom. pg/ ml	Medio-geométrico pg/ml
h-EPO	2 horas	100 µg	59,6	58,2
h-EPO	6 horas	100 µg	68,6	55,8
h-EPO	12 horas	100 µg	87,4	84,5
h-EPO	24 horas	100 µg	108, 6	95,3
h-EPO	48 horas	100 µg	77,9	77,0
h-EPO	72 horas	100 µg	80,1	75,8
Luc	24,48 y 72 horas	100 µg	37,2	29,2
F.Buffer (tampón de formulación)	24,48 y 72 horas	-	48,9	10,4

Ejemplo 36: Vías de Administración

- Se realizaron estudios para investigar la dosificación dividida usando diferentes vías de administración. Se diseñaron y realizaron estudios que utilizaron múltiples sitios de inyección subcutánea o intramuscular en un punto de tiempo para investigar formas de aumentar la exposición al fármaco de ARNm y mejorar la producción de proteínas. Además de la detección del producto proteico expresado, también se determinó una evaluación de la función fisiológica de las proteínas mediante el análisis de muestras del animal analizado.
- 5 Sorprendentemente, se ha determinado que la dosificación dividida de ARNm produce una mayor producción de proteínas y respuestas fenotípicas que las producidas por esquemas de dosificación de una sola unidad o de dosificación múltiple.
- 10 El diseño de un experimento de dosis dividida involucró el uso de ARNm de eritropoyetina humana (EPO) (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 9; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) o ARNm de luciferasa (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1) administrado en tampón solo o formulado con lipoplex al 30 % (RNAIMAX™). El vehículo de dosificación (tampón de formulación) constaba de NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, Na⁺-fosfato 2 mM (fosfato sódico monobásico 1,4 mM; fosfato sódico dibásico 0,6 mM) y EDTA 0,5 mM, pH 6.5. El pH se ajustó usando hidróxido de sodio y la solución final se esterilizó por filtración. El ARNm se modificó con 5meC en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina.
- 15 4 ratones por grupo fueron dosificados por vía intramuscular (I.M.), intravenosa (I.V.) o subcutánea (S.C.) según el cuadro de dosificación descrito en la Tabla 60. Se recogió suero 13 horas después de la inyección de todos los ratones, se recogió tejido del sitio de inyección del grupo intramuscular y subcutáneo y el bazo, el hígado y los riñones se recogieron del grupo intravenoso. Los resultados del grupo intramuscular y los resultados del grupo subcutáneo se muestran en la Tabla 61.
- 20

Tabla 60. Cuadro de dosificación

Grupo	Tratamiento	Vía	Dosis de ARNm	Dosis total	Vehículo de dosificación
1	ARNm de EPO humana Lipoplex	I.M.	4 x 100 ug + 30 % Lipoplex	4x70 ul	Lipoplex
2	ARNm de EPO humana Lipoplex	I.M.	4 x 100 ug	4x70 ul	Tampón
3	ARNm de EPO humana Lipoplex	S.C.	4 x 100 ug + 30 % Lipoplex	4x70 ul	Lipoplex
4	ARNm de EPO humana Lipoplex	S.C.	4 x 100 ug	4x70 ul	Tampón
5	ARNm de EPO humana Lipoplex	I.V.	200 ug + 30 % Lipoplex	140 ul	Lipoplex
6	ARNm lipoplexado-luciferasa	I.M.	100 ug + 30 % Lipoplex	4x70 ul	Lipoplex
7	ARNm lipoplexado-luciferasa	I.M.	100 ug	4x70 ul	Tampón
8	ARNm lipoplexado-luciferasa	S.C.	100 ug + 30 % Lipoplex	4x70 ul	Lipoplex
9	ARNm lipoplexado-luciferasa	S.C.	100 ug	4x70 ul	Tampón
10	ARNm de EPO humana	I.V.	200 ug + 30 % Lipoplex	140 ul	Lipoplex

Grupo	Tratamiento	Vía	Dosis de ARNm	Dosis total	Vehículo de dosificación
	lipoplexado				
11	Tampón de formulación	I.M.	4x multi-dosificación	4x70 ul	Tampón

Tabla 61. Proteína EPO humana en suero de ratón (vía de inyección I.M.)

Formulación	EPO (pg/ml)	
	Vía de inyección I.M.	Vía de inyección S.C.
Epo-Lipoplex	67,115	2,154
Luc-Lipoplex	0	0
Epo-Salina	100,891	11,37
Luc-Salina	0	0
Tampón de formulación	0	0

Ejemplo 37. Estudios de nanopartículas lipídicas eliminadas rápidamente (reLNP)

5 A. Formulación de reLNP de ARN modificado

Soluciones de lípidos sintetizados, 1,2-diestearoil-3-fosfatidilcolina (DSPC) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), colesterol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) y α -[3'-(1,2- dimiristoil-3-propanoxi)-carboxamida-propil]- ω -metoxipolioxietileno (PEG-c-DOMG) (NOF, Bouwelven, Bélgica) se preparan y almacenan a -20 °C. El lípido sintetizado se selecciona de DLin-DMA con un éster interno, DLin-DMA con un éster terminal, DLin-MC3-DMA-éster interno y DLin-MC3-DMA con un éster terminal. Los reLNP se combinan para producir una relación molar de 50:10:38,5:1,5 (reLNP: DSPC: Colesterol: PEG-c-DOMG). Las formulaciones de reLNP y ARNm modificado se preparan combinando la solución de lípidos con la solución de ARNm modificado en una relación en peso de lípidos totales a ARNm modificado de 10:1, 15:1, 20:1 y 30:1.

15 B. Caracterización de formulaciones

Se utiliza un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para determinar el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial zeta de las nanopartículas de ARNm modificadas en PBS 1X para determinar el tamaño de partícula y PBS 15 mM en determinación del potencial zeta.

La espectroscopia ultravioleta-visible se utiliza para determinar la concentración de la formulación de nanopartículas de ARNm modificado. Después de mezclar, se registra el espectro de absorbancia de la solución entre 230 nm y 330 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). La concentración de ARN modificado en la formulación de nanopartículas se calcula en función del coeficiente de extinción del ARN modificado utilizado en la formulación y de la diferencia entre la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y el valor de referencia a una longitud de onda de 330 nm.

30 El ensayo de ARN QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA) se utiliza para evaluar la encapsulación de ARN modificado por la nanopartícula. Las muestras se diluyen, se transfieren a una placa de poliestireno de 96 pocillos y, a continuación, se añade un tampón TE o una solución Triton X-100 al 2 %. Se incuba la placa y se diluye el reactivo RIBOGREEN® en tampón TE, y de esta solución se añade a cada pocillo. La intensidad de la fluorescencia se mide usando un lector de placa de fluorescencia (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA). Los valores de fluorescencia del blanco de reactivo se restan de cada una de las muestras y el porcentaje de ARN modificado libre se determina dividiendo la intensidad de fluorescencia de la muestra intacta por el valor de fluorescencia de la muestra alterada.

C. Incubación *in vitro*

40 Se siembran células epiteliales de riñón embrionario humano (HEK293) y células epiteliales de carcinoma hepatocelular (HepG2) (LGC Standards GmbH, Wesel, Alemania) en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Alemania) y las placas para células HEK293 se recubren previamente con colágeno tipo 1. Se siembran HEK293 a una densidad de aproximadamente 30.000 y HepG2 a una densidad de aproximadamente 35.000 células por pocillo en 100 μ l de medio de cultivo celular. Las formulaciones que contienen ARNm de mCherry (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) se añaden directamente después de sembrar las células y se incuban. El ADNc de mCherry con el promotor T7, la región no traducida 5' (UTR) y la UTR 3' utilizada en la transcripción *in vitro* (IVT) se proporciona en la SEQ ID NO: 8.

45 50 Las células se recogen transfiriendo los sobrenadantes del medio de cultivo a una placa de fondo en U Pro-Bind de

96 pocillos (Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania). Las células se tripsinizan con ½ volumen de tripsina/EDTA (Biochrom AG, Berlín, Alemania), se agrupan con los sobrenadantes respectivos y se fijan añadiendo un volumen de PBS/FCS al 2 % (ambos Biochrom AG, Berlín, Alemania)/formaldehído al 0,5 % (Merck, Darmstadt, Alemania). A continuación, las muestras se someten a una medición de citómetro de flujo con un láser de excitación y un filtro para PE-Texas Red en un citómetro LSRII (Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania). La intensidad de fluorescencia media (MFI) de todos los eventos y la desviación estándar de cuatro pocillos independientes se presentan para las muestras analizadas.

5 D. Estudios de formulación *in vivo*

10 A los ratones se les administra por vía intravenosa una dosis única de una formulación que contiene un ARNm modificado y un reLNP. El ARNm modificado administrado a los ratones se selecciona de G-CSF (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1), Factor IX (ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa 1) o mCherry (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1).

15 A los ratones se les inyectan 100 ug, 10 ug o 1 ug del ARNm modificado formulado y se sacrifican 8 horas después de que se les haya administrado la formulación. El suero de los ratones a los que se administró formulaciones que contenían ARNm modificado con G-CSF humano se midió mediante ELISA de G-CSF específico y el suero de los ratones a los que se administró ARN modificado con factor IX humano se analizó mediante ELISA de factor IX específico o ensayo cromogénico. El hígado y el bazo de los ratones a los que se les administró ARNm modificado con mCherry se analizan mediante inmunohistoquímica (IHC) o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Como control, a un grupo de ratones no se les inyecta ninguna formulación y su suero y tejido se recogen y 20 analizan mediante ELISA, FACS y/o IHC.

25 Ejemplo 38. Transfección *in vitro* de VEGF-A

30 Se transfeció ARNm modificado con isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF-A) (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 19; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) se transfeció mediante transfección inversa en células de queratinocitos humanas en placas de 24 pocillos múltiples. El ADNc de VEGF-A con el promotor T7, la región no traducida 5' (UTR) y la UTR 3' utilizada en la transcripción *in vitro* (IVT) se proporciona en la SEQ ID NO: 20. Se cultivaron células de queratinocitos humanas en medio EPILIFE® con Suplemento S7 de Invitrogen (Carlsbad, CA) hasta alcanzar una 35 confluencia del 50-70 %. Las células se transfecaron con 0, 46,875, 93,75, 187,5, 375, 750 y 1500 ng de ARNm modificado (ARNmm) que codificaba VEGF-A que se había complejado con RNAIMAX™ de Invitrogen (Carlsbad, CA). El complejo RNA:RNAIMAX™ se formó incubando primero el ARN con medios EPILIFE® sin suplementos en una dilución volumétrica 5X durante 10 minutos a temperatura ambiente. En un segundo vial, el reactivo RNAIMAX™ se 40 incubó con medio EPILIFE® libre de suplementos en una dilución volumétrica 10X durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el vial de ARN se mezcló con el vial de RNAIMAX™ y se incubó durante 20-30 minutos a temperatura ambiente antes de añadirlo a las células gota a gota.

45 El ARNm completamente optimizado que codifica VEGF-A (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 19; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) transfecido con las células de queratinocitos humanas incluyeron modificaciones durante la traducción tales como nucleósido trifosfato natural (NTP), pseudouridina en cada sitio de uridina y 5-metilcitosina en cada sitio de citosina (pseudo-U/5mC), y N1-metil-pseudouridina en cada sitio de uridina y 5-metilcitosina en cada sitio de citosina (N1-metil-Pseudo-U/5mC). Las células se transfecaron con el ARNmm que codifica VEGF-A y se midió la concentración de VEGF-A secretada (pg/ml) en el medio de cultivo a las 6, 12, 24 y 48 horas después de la transfección para cada una de las 50 concentraciones usando un kit ELISA de Invitrogen (Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. Estos datos, que se muestran en la Tabla 62, muestran que el ARNm modificado que codifica VEGF-A es capaz de traducirse en células de queratinocitos humanas y que VEGF-A se transporta fuera de las células y se libera en el entorno extracelular.

55 **Tabla 62. Dosisificación de VEGF-A y secreción de proteínas**

Dosis de VEGF-A que contiene NTP naturales				
Dosis (ng)	6 horas (pg/ml)	12 horas (pg/ml)	24 horas (pg/ml)	48 horas (pg/ml)
46,875	10,37	18,07	33,90	67,02
93,75	9,79	20,54	41,95	65,75
187,5	14,07	24,56	45,25	64,39
375	19,16	37,53	53,61	88,28
750	21,51	38,90	51,44	61,79

Dosis de VEGF-A que contiene NTP naturales				
Dosis (ng)	6 horas (pg/ml)	12 horas (pg/ml)	24 horas (pg/ml)	48 horas (pg/ml)
1500	36,11	61,90	76,70	86,54
Dosis de VEGF-A que contiene pseudo-U/5mC				
Dosis (ng)	6 horas (pg/ml)	12 horas (pg/ml)	24 horas (pg/ml)	48 horas (pg/ml)
46,875	10,13	16,67	33,99	72,88
93,75	11,00	20,00	46,47	145,61
187,5	16,04	34,07	83,00	120,77
375	69,15	188,10	448,50	392,44
750	133,95	304,30	524,02	526,58
1500	198,96	345,65	426,97	505,41

Dosis de VEGF-A que contiene N1-metil-Pseudo-U/5 mC				
Dosis (ng)	6 horas (pg/ml)	12 horas (pg/ml)	24 horas (pg/ml)	48 horas (pg/ml)
46,875	0,03	6,02	27,65	100,42
93,75	12,37	46,38	121,23	167,56
187,5	104,55	365,71	1025,41	1056,91
375	605,89	1201,23	1653,63	1889,23
750	445,41	1036,45	1522,86	1954,81
1500	261,61	714,68	1053,12	1513,39

Ejemplo 39. Estudios *in vivo* del Factor IX

- 5 El ARNm del factor IX humano (Gen1; 5-metocitosina y pseudouridina totalmente modificadas) formulado en tampón de formulación se administró a ratones mediante inyección intramuscular. Los resultados demuestran que la proteína Factor IX se elevó en el suero medido 13 horas después de la administración.
- 10 En este estudio, a los ratones (N=5 para el Factor IX, N=3 para los controles de luciferasa o tampón) se les inyectaron por vía intramuscular 50 µl del ARNm del Factor IX (la secuencia del ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1), luciferasa (secuencia de ADNc para IVT mostrada en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia, tapa 5', Tapa1, completamente modificado con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) o el tampón de formulación (F.Buffer) a 2x 100 ug/ratón. Se extrajo sangre a los ratones 13 horas después de la inyección intramuscular para determinar la concentración del polipéptido humano en suero en pg/ml. Los resultados revelaron que la administración de ARNm de Factor IX dio como resultado niveles de 1600 pg/mL a las 13 horas en comparación con menos de 100 pg/mL de Factor IX para la administración de control de luciferasa o tampón.

20 Ejemplo 40. Administración multi-sitio: intramuscular y subcutánea

- ARNm modificado con G-CSF humano (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) modificado como Gen1 o Gen2 (5-metilcitosina (5mc) y una pseudouridina (ψ), G-CSF-Gen1; o N1-5-metilcitosina (N1-5mc) y una modificación ψ , G-CSF-Gen2) y formulados en tampón de formulación se administraron a ratones vía inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC). Se realizó la inyección de cuatro dosis o 2x 50 ug (dos sitios) diariamente durante tres días (intervalo de 24 horas). La cuarta dosis se administró 6 horas antes de la extracción de sangre y el análisis CBC. Los controles incluían luciferasa (secuencia de ADNc para IVT mostrada en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia, tapa 5', Tapa1, totalmente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) o el tampón de formulación (F.Buffer). Se extrajo sangre a los ratones 72 horas después de la primera inyección de ARNm (6 horas después de la última dosis de ARNm) para determinar el efecto del G-CSF humano codificado por ARNm en el recuento de neutrófilos. El régimen de dosificación se muestra en la Tabla 63, al igual que los recuentos de neutrófilos resultantes (miles/ μ l). En la Tabla 63, los asteriscos (*) indican significación estadística en $p<0,05$.
- 35 Para la administración intramuscular, los datos revelan un aumento de cuatro veces en el recuento de neutrófilos por encima del control en el día 3 para el ARNm de Gen1 G-CSF y un aumento de dos veces para el ARNm de Gen2 G-CSF. Para la administración subcutánea, los datos revelan un aumento del doble en el recuento de neutrófilos por encima del control en el día 3 para el ARNm de Gen2 G-CSF.

Estos datos demuestran que tanto el ARNm modificado con 5-metilcitidina/pseudouridina como con 5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina pueden ser biológicamente activos, como lo demuestran los aumentos específicos en los recuentos de neutrófilos en sangre.

5

Tabla 63. Régimen de dosificación

Gr.	Tratamiento	Vía	N=	Dosis (µg/mouse)	Vol. de dosis (µl/mouse)	Vehículo de dosificación	Neutrófilo Mil/uL
1	G-CSF (Gen1)	I.M	5	2×50ug dosis)	(cuatro 50	Tampón de formulación	840*
2	G-CSF (Gen1)	S.C	5	2×50ug dosis)	(cuatro 50	Tampón de formulación	430
3	G-CSF (Gen2)	I.M	5	2×50ug dosis)	(cuatro 50	Tampón de formulación	746*
4	G-CSF (Gen2)	S.C	5	2×50ug dosis)	(cuatro 50	Tampón de formulación	683
5	Luc (Gen1)	I.M.	5	2×50ug dosis)	(cuatro 50	Tampón de formulación	201
6	Luc (Gen1)	S.C.	5	2×50ug dosis)	(cuatro 50	Tampón de formulación	307
7	Luc (Gen2)	I.M	5	2×50ug dosis)	(cuatro 50	Tampón de formulación	336
8	Luc (Gen2)	S.C	5	2×50ug dosis)	(cuatro 50	Tampón de formulación	357
9	Tampón de formulación	I.M	4	0 (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación	245
10	Tampón de formulación	S.C.	4	0 (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación	509
11	No tratado	-	4			-	312

Ejemplo 41. Administración intravenosa

- 10 ARNm modificado con G-CSF humano (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) modificado con 5-metilcitosina (5mc) y una modificación de pseudouridina (ψ) (Gen1); o sin modificaciones y formulados en lipoplex al 10 % (RNAiMax) se administraron a ratones a una dosis de 50 ug de ARN y en un volumen de 100 uL por inyección intravenosa (IV) los días 0, 2 y 4. Los neutrófilos se midieron los días 1, 5 y 8. Los controles incluían ARN de mamífero no específico o el tampón de formulación solo (F.Buffer). Se extrajo sangre de los ratones los días 1, 5 y 8 para determinar el efecto del G-CSF humano codificado por ARNm para aumentar el recuento de neutrófilos. El régimen de dosificación se muestra en la Tabla 64, al igual que los recuentos de neutrófilos resultantes (miles/uL; K/uL).
- 15 20 Para la administración intravenosa, los datos revelan un aumento de cuatro a cinco veces en el recuento de neutrófilos por encima del control en el día 5 con ARNm de G-CSF modificado pero no con ARNm de G-CSF no modificado o controles no específicos. El hemograma volvió a la línea de base cuatro días después de la última inyección. No se observaron otros cambios en las poblaciones de leucocitos.
- 25 En la Tabla 64, un asterisco(*) indica significación estadística a p<0,001 en comparación con el tampón.

30 Estos datos demuestran que el ARNm modificado con 5-metilcitidina/pseudouridina formulado con lipoplex puede ser biológicamente activo, cuando se administra a través de una vía de administración I.V. como lo demuestran los aumentos específicos en los recuentos de neutrófilos en sangre. Ningún otro subconjunto de células se alteró significativamente. El ARNm de G-CSF no modificado administrado de manera similar no mostró ningún efecto farmacológico en los recuentos de neutrófilos.

Tabla 64. Régimen de dosificación

Gr.	Tratamiento	N=	Vol. de dosis (µl/mouse)	Vehículo de dosificación	Neutrófilo K/uL
1	G-CSF (Gen1) Día 1	5	100	10 % lipoplex	2,91

Gr.	Tratamiento	N=	Vol. de dosis (μ l/mouse)	Vehículo de dosificación	Neutrófilo K/uL
2	G-CSF (Gen1) Día 5	5	100	10 % lipoplex	5,32*
3	G-CSF (Gen1) Día 8	5	100	10 % lipoplex	2,06
4	G-CSF (sin modificación) Día 1	5	100	10 % lipoplex	1,88
5	G-CSF (sin modificación) Día 5	5	100	10 % lipoplex	1,95
6	G-CSF (sin modificación) Día 8	5	100	10 % lipoplex	2,09
7	Control de ARN Día 1	5	100	10 % lipoplex	2,90
8	Control de ARN Día 5	5	100	10 % lipoplex	1,68
9	Control de ARN Día 8	4	100	10 % lipoplex	1,72
10	Tampón de formulación Día 1	4	100	10 % lipoplex	2,51
11	Tampón de formulación Día 5	4	100	10 % lipoplex	1,31
12	Tampón de formulación Día 8	4	100	10 % lipoplex	1,92

Ejemplo 42. Formulación salina: administración intramuscular

5 A. Expresión de proteínas

- ARNm modificado con G-CSF humano (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1) y ARNmm de EPO humana (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 9; poliA cola de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia, tapa 5', Tapa1); se formularon ARNm modificado con G-CSF (modificado con 5-metilcitosina (5mc) y pseudouridina (ψ)) y ARNm modificado con EPO (modificado con N1-5-metilcitosina (N1-5mc) y modificación ψ) en tampón de formulación (cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 2 mM, fosfato 2 mM, EDTA 0,5 mM a un pH de 6.5) y administrado a ratones mediante inyección intramuscular (IM) a una dosis de 100 ug.
- 15 Los controles incluían luciferasa (secuencia de ADNc para IVT, SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia, tapa 5', Tapa1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) o el tampón de formulación (F.Buffer). Se extrajo sangre a los ratones 13 horas después de la inyección para determinar la concentración del polipéptido humano en suero en pg/ml (los grupos G-CSF midieron G-CSF humano en suero de ratón y los grupos EPO midieron EPO humana en suero de ratón). Los datos se muestran en la Tabla 65.
- 20

Tabla 65. Régimen de dosificación

Grupo	Tratamiento	N=	Vol. de dosis (μ l/ratón)	Vehículo de dosificación	Promedio de producto proteico Pg/mL, suero
G-CSF	G-CSF	5	50	Salina	19,8
G-CSF	Luciferasa	5	50	Salina	0,5
G-CSF	Tampón de formulación	5	50	Tampón de formulación	0,5
EPO	EPO	5	50	Salina	191,5
EPO	Luciferasa	5	50	Salina	15,0
EPO	Tampón de formulación			Tampón de formulación	4,8

B. Respuesta a la dosis

- 25 Se formuló ARNm modificado con EPO humana (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) en tampón de formulación y administrado a ratones mediante inyección intramuscular (IM).
- 30 Los controles incluían luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia, tapa 5', Tapa1, totalmente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) o el tampón de formulación (F.Buffer). Se extrajo sangre de los ratones 13 horas después de la inyección para determinar la concentración del polipéptido humano en suero en pg/ml. La dosis y la expresión se muestran en la Tabla 66.
- 35

Tabla 66. Régimen de dosificación y expresión

Tratamiento	Vol. de dosis (μ l/ratón)	Promedio de producto proteico pg/mL, suero
EPO	100	96,2
EPO	50	63,5
EPO	25	18,7
EPO	10	25,9
EPO	1	2,6
Luciferasa	100	0,0
Tampón de formulación	100	1,0

Ejemplo 43. Multi-dosis/Multi-administración

- 5 Se diseñaron y realizaron estudios que utilizaron múltiples sitios de inyección intramuscular en un punto de tiempo.
- 10 El diseño de un único experimento multi-dosis involucró el uso de ARNm de eritropoyetina humana (EPO) (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 9; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) o G-CSF (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1) administrado en tampón de formulación. El vehículo de dosificación (tampón de formulación) se utilizó como control. El ARNm de EPO y G-CSF se modificó con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina.
- 15 A los animales (n=5), ratas Sprague-Dawley, se les inyectó por vía IM (intramuscular) la dosis unitaria única de 100 ug (administrada en un muslo). Para las dosis múltiples, se usaron 6 dosis de 100 ug (administradas en dos muslos) para ARNm de EPO y G-CSF. La dosificación de control implicó el uso de tampón en una sola dosis. Los niveles en sangre de EPO humana se evaluaron 13 horas después de la inyección.
- 20 La proteína EPO humana se midió en suero de rata 13 horas después de la I.M. Se trataron y evaluaron cinco grupos de ratas. Los resultados se muestran en la Tabla 67.

Tabla 67. Estudio de multi-dosis

Grupo	Tratamiento	Dosis de ARNm	Dosis total	EPO humana en pg/mL promedio
1	ARNm de EPO humana	1 x 100 ug	100 ug	143
2	ARNm de EPO humana	6 x 100 ug	600 ug	256
3	ARNm G-CSF	1 x 100 ug	100 ug	43
4	ARNm G-CSF	6 x 100 ug	600 ug	58
5	Tampón solo	--	--	20

25 Ejemplo 44. Estudio de intercambio de secuencias de señales

- Se sintetizaron varias variantes de ARNm que codifican factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1) usando pseudouridina de nucleótidos modificados y 5-metilcitosina (pseudo-U/5mC).
- 30 Estas variantes incluyeron las construcciones de G-CSF que codifican la secuencia del péptido de señal secretora N terminal de tipo salvaje (MAGPATQSPMVKLMALQLLLWHSALWTVQEA; SEQ ID NO: 21), sin secuencia peptídica de señal secretora, o secuencias peptídicas de señal secretora tomadas de otros ARNm. Estas incluyeron secuencias en las que la secuencia del péptido de señal de G-CSF de tipo salvaje se reemplazó con la secuencia del péptido de señal de: α -1-antitripsina humana (AAT) (MMSSVSWGILLLAGLCLVPVSLA; SEQ ID NO: 22), Factor IX humano (FIX) (MQRVNIMIMAESPSSLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKR; SEQ ID NO: 23), prolactina humana (Prolac) (MKGSLLLLVSNLCCQSVAP; SEQ ID NO: 24) o albúmina humana (Alb) (MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR; SEQ ID NO: 25).

35 40 Se transfectaron 250 ng de ARNm modificado que codifica cada variante de G-CSF en HEK293A (293A en la tabla), mioblasto de ratón (MM en la tabla) (C2C12, CRL-1772, ATCC) y mioblasto de rata (RM en la tabla) (línea L6, CRL-1458, ATCC) en una placa de 24 pocillos usando 1 μ l de Lipofectamine 2000 (Life Technologies), contenido cada pocillo 300.000 células. Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas y la proteína G-CSF secretada se

analizó mediante ELISA usando el kit ELISA para G-CSF humano (Life Technologies). Los datos que se muestran en la Tabla 68 revelan que las células transfectadas con ARNm de G-CSF que codifica el péptido de señal de albúmina secretan al menos 12 veces más proteína G-CSF que su homólogo de tipo salvaje.

5 **Tabla 68. Intercambio de péptidos de señal**

Péptidos de señal	293A (pg/ml)	MM (pg/ml)	RM (pg/ml)
G-CSF Natural	9650	3450	6050
α-1-anti tripsina	9950	5000	8475
Factor IX	11675	6175	11675
Prolactina	7875	1525	9800
Albúmina	122050	81050	173300
Péptido sin señal	0	0	0

Ejemplo 45. Estudio de citoquinas: PBMC

10 Aislamiento y cultivo de PBMC: se recibieron 50 ml de sangre humana de dos donantes de Research Blood Components (lotes KP30928 y KP30931) en tubos de heparina sódica. Para cada donante, la sangre se reunió y diluyó a 70 ml con DPBS (SAFC Bioscience 59331C, lote 071M8408) y se dividió uniformemente entre dos tubos cónicos de 50 ml. Se dispensaron suavemente 10 ml de Ficoll Paque (GE Healthcare 17-5442-03, lote 10074400) debajo de la capa de sangre. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 30 minutos con baja aceleración y frenado. Se retiraron los tubos y las capas de PBMC de la capa leucocitaria se transfirieron suavemente a un recipiente cónico nuevo de 50 ml y se lavaron con DPBS. Los tubos se centrifugaron a 1450 rpm durante 10 minutos.

15 Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos de PBMC y se lavaron en 50 ml de DPBS. Los tubos se centrifugaron a 1250 rpm durante 10 minutos. Esta etapa de lavado se repitió y los gránulos de PBMC se resuspendieron en 19 ml de Optimem I (Gibco 11058, lote 1072088) y se contaron. Las suspensiones celulares se 20 ajustaron a una concentración de $3,0 \times 10^6$ células/ml de células vivas.

25 A continuación, estas células se sembraron en cinco placas de fondo redondo tratadas con cultivo de tejidos de 96 pocillos (Costar 3799) por donante a 50 μ L por pocillo. En 30 minutos, se añadieron mezclas de transfección a cada pocillo en un volumen de 50 μ L por pocillo. Después de 4 horas tras la transfección, el medio se complementó con 10 μ l de suero bovino fetal (Gibco 10082, lote 1012368).

30 Preparación de transfección: ARNm que codifica G-CSF humano (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) (que contiene (1) NTP naturales, (2) 100 % de sustitución con 5-metilcitolina y pseudouridina, o (3) 100 % de sustitución 35 con 5-metilcitolina y N1-metil pseudouridina; ARNm que codifica luciferasa (secuencia de ADNc de IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia, tapa 5', Tapa1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada citosina y reemplazo de pseudouridina en cada sitio de uridina) (que contiene (1) NTP naturales o (2) 100 % de sustitución con 5-metilcitolina y pseudouridina) y el agonista de TLR R848 (Invivogen tirl-r848) se diluyeron a 38,4 ng/ μ L en un volumen final de 2500 μ L Optimem I.

40 Por separado, se diluyeron 432 μ l de Lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668-027, lote 1070962) con 13,1 ml de Optimem I. En una placa de 96 pocillos, nueve aliquotas de 135 μ l de cada ARNm, control positivo (R-848) o control negativo (Optimem I) se añadió a 135 μ L de Lipofectamine 2000 diluida. La placa que contenía el material que se va a transfectar se incubó durante 20 minutos. A continuación, las mezclas de transfección se transfirieron a cada una de las placas de PBMC humanas a razón de 50 μ L por pocillo. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C. A las 2, 4, 8, 20 y 44 horas, cada placa se retiró de la incubadora y los sobrenadantes se congelaron.

45 Despues de retirar la última placa, los sobrenadantes se analizaron utilizando un kit ELISA de G-CSF humano (Invitrogen KHC2032) y un kit ELISA de IFN-alfa humano (Thermo Scientific 41105-2). Cada condición se realizó por duplicado.

50 Resultados: se evaluó la capacidad del ARNm no modificado y modificado (ARNmm) para producir la proteína codificada (producción de G-CSF) a lo largo del tiempo, así como la capacidad del ARNm para desencadenar el reconocimiento inmunitario innato medido por la producción de interferón-alfa. El uso de cultivos de PBMC *in vitro* es una forma aceptada de medir el potencial inmunoestimulador de los oligonucleótidos (Robbins y col., Oligonucleótidos 2009 19:89-102).

55 Los resultados se interpolaron frente a la curva estándar de cada placa ELISA utilizando un ajuste de curva logística de cuatro parámetros. En las Tablas 69 y 70 se muestra el promedio de 2 donantes de PBMC separados de la producción de G-CSF e IFN-alfa a lo largo del tiempo medido por ELISA específico.

En ELISA de G-CSF, se restó la señal de fondo de la condición no tratada con Lipofectamine 2000 en cada punto de tiempo. Los datos demostraron la producción específica de proteína G-CSF humana por mononuclear de sangre periférica humana con ARNm de G-CSF que contiene NTP naturales, 100 % de sustitución con 5-metilcitidina y pseudouridina, o 100 % de sustitución con 5-metilcitidina y N1-metil pseudouridina. La producción de G-CSF aumentó significativamente mediante el uso de ARNm modificado en relación con el ARNm no modificado, y el ARNmm de G-CSF que contenía 5-metilcitidina y N1-metil pseudouridina mostró el nivel más alto de producción de G-CSF. Con respecto al reconocimiento inmunitario innato, el ARNm no modificado resultó en una producción sustancial de IFN-alfa, mientras que el ARNm modificado impidió en gran medida la producción de interferón-alfa. El ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitidina y N1-metil pseudouridina no aumentó significativamente las citocinas, mientras que el ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitidina y pseudouridina indujo IFN-alfa, TNF-alfa e IP10. Muchas otras citocinas no se vieron afectadas por ninguna de las dos modificaciones.

Tabla 69. Señal G-CSF

Señal G-CSF - Promedio de 2 donantes					
pg / mL	2 H	4 H	8 H	20 H	44 H
G-CSF (5mC/pseudouridina)	120,3	136,8	421,0	346,1	431,8
G-CSF (5mC/N1-metil pseudouridina)	256,3	273,7	919,3	1603,3	1843,3
GCSF(Natural-sin modificación)	63,5	92,6	129,6	258,3	242,4
Luciferasa (5mC/pseudouridina)	4,5	153,7	33,0	186,5	58,0

Tabla 70. IFN-señal alfa

IFN-señal alfa - Promedio de 2 donantes					
pg / mL	2 H	4 H	8 H	20 H	44 H
G-CSF (5mC/pseudouridina)	21,1	2,9	3,7	22,7	4,3
G-CSF (5mc/N1-metil pseudouridina)	0,5	0,4	3,0	2,3	2,1
G-CSF(Natural)	0,0	2,1	23,3	74,9	119,7
Luciferasa (5mC/pseudouridina)	0,4	0,4	4,7	1,0	2,4
R-848	39,1	151,3	278,4	362,2	208,1
Lpf. 2000 control	0,8	17,2	16,5	0,7	3,1

Ejemplo 46. Intervalos de modificación química de ARNm modificado

Se ha demostrado que los nucleótidos modificados tales como, entre otros, las modificaciones químicas 5-metilcitosina y pseudouridina reducen la respuesta inmunitaria innata y aumentan la expresión de ARN en células de mamífero. Sorprendentemente, y no conocido previamente, los efectos manifestados por las modificaciones químicas se pueden valorar cuando la cantidad de modificación química es inferior al 100 %. Anteriormente, se creía que la modificación completa era necesaria y suficiente para provocar los efectos beneficiosos de las modificaciones químicas y que menos del 100 % de modificación de un ARNm tenía poco efecto. Sin embargo, ahora se ha demostrado que los beneficios de la modificación química pueden derivarse utilizando una modificación menos completa y que los efectos dependen del objetivo, la concentración y la modificación.

A. ARN modificado transfectado en PBMC

Se transfecaron 960 ng de ARNm de G-CSF modificado con 5-metilcitosina (5mC) y pseudouridina (pseudoU) o ARNm de G-CSF no modificado con 0,8 μ L de Lipofectamine 2000 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres donantes de sangre normales (D1, D2, D3). El ARNm de G-CSF (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) se modificó completamente con 5mC y pseudoU (100 % de modificación), no se modificó con 5mC y pseudoU (0 % de modificación) o se modificó parcialmente con 5mC y pseudoU, por lo que el ARNm contendría 50 % de modificación, 25 % de modificación, 10 % de modificación, 5 % de modificación, 1 % de modificación o 0,1 % de modificación. También se analizó una muestra de control de Luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; 5meC y pseudoU completamente modificados) para determinar la expresión de G-CSF. Para muestras de control de TNF-alfa e IFN-alfa de Lipofectamine2000, LPS, R-848, Luciferasa (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 16; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5'cap, Tapa 1; completamente modificado 5mC y pseudo), y P(I)P(C) también se analizaron. El sobrenadante se recogió y se analizó mediante ELISA 22 horas después de la transfección para determinar la expresión de la proteína. La expresión de G-CSF se muestra en la Tabla 71 y la expresión de IFN-alfa y TNF-alfa se muestra en la Tabla 72. La expresión de IFN-alfa y TNF-alfa puede ser un efecto secundario de la

transfección del ARNm de G-CSF. Las tablas muestran que la cantidad de modificación química de G-CSF, IFN-alfa y TNF-alfa es valorable cuando el ARNm no está completamente modificado y la tendencia valorable no es la misma para cada objetivo.

5 **Tabla 71. Expresión de G-CSF**

	Expresión de G-CSF (pg/ml)		
	D1	D2	D3
100 % de modificación	270,3	151,6	162,2
50 % de modificación	45,6	19,8	26,3
25 % de modificación	23,6	10,8	8,9
10 % de modificación	39,4	12,9	12,9
5 % de modificación	70,9	26,8	26,3
1 % de modificación	70,3	26,9	66,9
0,1 % de modificación	67,5	25,2	28,7
Luciferasa	14,5	3,1	10,0

Tabla 72. Expresión IFN-alfa y TNF-alfa

	Expresión IFN-alfa (pg/ml)			Expresión TNF-alfa (pg/ml)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100 % de modificación	76,8	6,8	15,1	5,6	1,4	21,4
50 % de modificación	22,0	5,5	257,3	4,7	1,7	12,1
25 % de modificación	64,1	14,9	549,7	3,9	0,7	10,1
10 % de modificación	150,2	18,8	787,8	6,6	0,9	13,4
5 % de modificación	143,9	41,3	1009,6	2,5	1,8	12,0
1 % de modificación	189,1	40,5	375,2	9,1	1,2	25,7
0,1% de modificación	261,2	37,8	392,8	9,0	2	13,7
0 % de modificación	230,3	45,1	558,3	10,9	1,4	10,9
LF 200	0	0	1,5	45,8	2,8	53,6
LPS	0	0	1,0	114,5	70,0	227,0
R-848	39,5	11,9	183,5	389,3	256,6	410,6
Luciferasa	9,1	0	3,9	4,5	2,7	13,6
P(I)P(C)	1498,1	216,8	238,8	61,2	4,4	69,1

B. ARN modificado transfectado en HEK293

- 10 Se sembraron células epiteliales de riñón embrionario humano (HEK293) en placas de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células por pocillo en 100 ul de medio de cultivo celular. Se añadieron a un pocillo 250 ng de ARNm de G-CSF modificado (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) formulado con RNAiMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). El G-CSF se modificó completamente con 5 mC y pseudoU (100 % de modificación), no se modificó con 5 mC y pseudoU (0 % de modificación) o se modificó parcialmente con 5 mC y pseudoU, por lo que el ARNm contendría 75 % de modificación, 50 % de modificación o 25 % de modificación. También se analizaron muestras de control (AK 5/2, mCherry (SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; 5mC completamente modificada y pseudoU) y sin tratar). La vida media del ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina es de aproximadamente 8 a 10 horas. Los sobrenadantes se recogieron después de 16 horas y la proteína G-CSF secretada se analizó mediante ELISA. La Tabla 73 muestra que la cantidad de modificación química de G-CSF es valorable cuando el ARNm no está completamente modificado.
- 15
- 20

Tabla 73. Expresión de G-CSF

	Expresión de G-CSF (ng/ml)
100 % de modificación	118,4
75 % de modificación	101,9
50 % de modificación	105,7

25 % de modificación	231,1
0 % de modificación	270,9
AK 5/2	166,8
mCherry	0
No tratado	0

Ejemplo 47: Administración *in vivo* de ARNm modificado (ARNmm)

El ARN modificado se administró a ratones C57/BL6 por vía intramuscular, subcutánea o intravenosa para evaluar la biodistribución del ARN modificado usando luciferasa. Un tampón de formulación utilizado con todos los procedimientos de administración contenía cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 2 mM, fosfato de sodio 2 mM que incluía fosfato de sodio monobásico 1,4 mM y fosfato de sodio dibásico 0,6 mM, y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 mM se ajustó usando hidróxido de sodio alcanzar un pH final de 6.5 antes de ser filtrado y esterilizado. Se utilizó una concentración 1X como tampón de suministro. Para crear la solución lipoplexada administrada a los ratones, en un vial se equilibraron 50 µg de ARN durante 10 minutos a temperatura ambiente en el tampón de administración y en un segundo vial se equilibraron 10 µl de RNAiMAX™ durante 10 minutos a temperatura ambiente en el tampón de administración. Después del equilibrio, los viales se combinaron y se añadió tampón de administración para alcanzar un volumen final de 100 µl que se incubó después durante 20 minutos a temperatura ambiente. La luciferina se administró mediante inyección intraperitoneal (IP) a 150 mg/kg a cada ratón antes de la obtención de imágenes durante la fase de meseta de la curva de exposición a la luciferina, que estuvo entre 15 y 30 minutos. Para crear luciferina, se disolvió 1 g de sal potásica o sódica de D-luciferina en 66,6 ml de solución de tampón de fosfato destilada (DPBS), que no contenía Mg²⁺ ni Ca²⁺, para obtener una solución de 15 mg/ml. La solución se mezcló suavemente y se pasó a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm, antes de purgarse con nitrógeno, dividirse en alícuotas y congelarse a -80°C mientras se protegía de la luz tanto como fuese posible. La solución se descongeló usando un baño de agua si la luciferina no se disolvió, se mezcló suavemente y se mantuvo en hielo el día de la dosificación.

Se tomaron imágenes de todo el cuerpo de cada ratón 2, 8 y 24 horas después de la dosificación. Se recogieron imágenes de tejido y suero de cada ratón 24 horas después de la dosificación. A los ratones a los que se administraron dosis por vía intravenosa se les tomaron imágenes del hígado, el bazo, los riñones, los pulmones, el corazón, el tejido adiposo peri-renal y el timo. Los ratones a los que se les administró dosis por vía intramuscular o subcutánea tenían el hígado, el bazo, los riñones, los pulmones, el tejido adiposo peri-renal y el músculo en el lugar de la inyección. A partir de las imágenes de todo el cuerpo, se midió la bioluminiscencia en fotones por segundo para cada vía de administración y régimen de dosificación.

30 A. Administración intramuscular

A los ratones se les administró por vía intramuscular (I.M.) ARNm de luciferasa modificado completamente modificado con 5-metilicitosina y pseudouridina (Naked-Luc), ARNm de luciferasa modificado lipoplexado completamente modificado con 5-metilicitosina y pseudouridina (Lipoplex-luc) (secuencia de ADNc IVT mostrada en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16, cola de poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia, tapa 5', Tapa1, totalmente modificada con 5-metilicitosina en cada citosina y reemplazo de pseudouridina en cada sitio de uridina), ARNm del factor estimulante de colonias de granulocitos modificado lipoplexado (G-CSF) (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 6; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilicitosina y pseudouridina) (Lipoplex-Citoquina) o el tampón de formación en una dosis única de 50 µg de ARN modificado en un volumen de inyección de 50 µl para cada formulación en la extremidad trasera derecha y una dosis única de 5 µg de ARN modificado en un volumen de inyección de 50 µl en la extremidad trasera izquierda. El promedio de bioluminiscencia para las señales de expresión de luciferasa para cada grupo a las 2, 8 y 24 horas después de la dosificación se muestra en la Tabla 74. La bioluminiscencia mostró una señal positiva en el sitio de inyección de las formulaciones de ARN modificado de 5 µg y 50 µg que contenían y no contenían lipoplex.

Tabla 74. Imágenes biofotónicas *in vivo* (vía de inyección I.M.)

Formulación	Dosis (ug)	Bioluminiscencia (fotón/s)		
		2 horas	8 horas	24 horas
Naked-Luc	5	224.000	683.000	927.000
Lipoplex-Luc	5	579.000	639.000	186.000
Lipoplex-G-CSF	5	64.600	85.600	75.100
Tampón de formulación	5	102.000	86.000	90.700
Naked-Luc	50	446.000	766.000	509.000
Lipoplex-Luc	50	374.000	501.000	332.000

Formulación	Dosis (ug)	Bioluminiscencia (fotón/s)		
		2 horas	8 horas	24 horas
Lipoplex -G-CSF	50	49.400	74.800	74.200
Tampón de formulación	50	59.300	69.200	63.600

B. Administración subcutánea

5 A los ratones se les administró por vía subcutánea (S.C.) ARNm de luciferasa modificada (Naked-Luc), ARNm de luciferasa modificada lipoplexada (Lipoplex-luc), ARNm de G-CSF modificada lipoplexada (Lipoplex-G-CSF) o el tampón de formación en una dosis única de 50 µg de ARNm modificado en un volumen de inyección de 100 µl para cada formulación. El promedio de bioluminiscencia para las señales de expresión de luciferasa para cada grupo a las 2, 8 y 24 horas después de la dosificación se muestra en la Tabla 75. La bioluminiscencia mostró una señal positiva en el sitio de inyección de las formulaciones de ARNm modificado de 50 µg que contenían y no lipoplex.

10

Tabla 75. Imágenes biofotoicas *in vivo* (vía de inyección S.C.)

Formulación	Bioluminiscencia (fotón/s)		
	2 horas	8 horas	24 horas
Naked-Luc	3.700.000	8.060.000	2.080.000
Lipoplex-Luc	3.960.000	1.700.000	1.290.000
Lipoplex-G-CSF	123.000	121.000	117.000
Tampón de formulación	116.000	127.000	123.000

C. Administración intravenosa

15 A los ratones se les administró por vía intravenosa (I.V.) ARNm de luciferasa modificada (Naked-Luc), ARNm de luciferasa modificada lipoplexada (Lipoplex-luc), ARNm de G-CSF modificada lipoplexada (Lipoplex-G-CSF) o el tampón de formación en una dosis única de 50 µg de ARNm modificado en un volumen de inyección de 100 µl para cada formulación. El promedio de bioluminiscencia para la señal de expresión de luciferasa en el bazo de cada grupo 2 horas después de la dosificación se muestra en la Tabla 76. La bioluminiscencia mostró una señal positiva en el bazo de las formulaciones de ARNm modificadas de 50 µg que contenían lipoplex.

20

Tabla 76 Imágenes biotoicas *in vivo* (vía de inyección I.V.)

Formulación	Bioluminiscencia (fotón/s) del bazo
Naked-Luc	58.400
Lipoplex - Luc	65.000
Lipoplex-G-CSF	57.100
Tampón de formulación	58.300

Ejemplo 48. Estudios de dosis dividida

25 Se diseñaron y realizaron estudios que utilizaron múltiples sitios de inyección subcutánea o intramuscular en un punto de tiempo para investigar formas de aumentar la exposición al fármaco de ARNm y mejorar la producción de proteínas. Además de la detección del producto proteico expreso, también se determinó una evaluación de la función fisiológica de las proteínas mediante el análisis de muestras del animal analizado.

30

Sorprendentemente, se ha determinado que la dosificación dividida de ARNm produce una mayor producción de proteínas y respuestas fenotípicas que las producidas por esquemas de dosificación de una sola unidad o de dosificación múltiple.

35 El diseño de un experimento de dosis unitaria única, multidosis y dosis fraccionada implicó el uso de ARNm modificado con eritropoyetina humana (EPO) (ARNm mostrado en la SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1) administrado en tampón solo. El vehículo de dosificación (tampón de formulación) consistía en NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, Na⁺-fosfato 2 mM (fosfato sódico monobásico 1,4 mM; fosfato sódico dibásico 0,6 mM) y EDTA 0,5 mM, pH 6.5. El pH se ajustó usando hidróxido de sodio y la solución final se esterilizó por filtración. El ARNm se modificó con 5meC en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina.

40

A los animales (n=5) se les injectó por vía IM (intramuscular) la dosis unitaria única de 100 ug. Para la multidosificación se utilizaron dos esquemas, 3 dosis de 100 ug y 6 dosis de 100 ug. Para el esquema de dosificación

dividida, se usaron dos esquemas, 3 dosis de 33,3 ug y 6 dosis de 16,5 ug de ARNm. La dosificación de control implicó el uso de tampón solo en 6 dosis. El ARNm de control implicó el uso de ARNm de luciferasa (secuencia de ADNc de IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 15; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola polA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; 5meC completamente modificada en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) dosificado 6 veces a 100 ug. La sangre y el tejido muscular se evaluaron 13 horas después de la inyección.

La proteína EPO humana se midió en suero de ratón 13 horas después de la dosificación I.M. única, múltiple o fraccionada del ARNm de EPO en tampón. Se trataron y evaluaron siete grupos de ratones (n=5 ratones por grupo). Los resultados se muestran en la Tabla 77.

Tabla 77. Estudio de dosis dividida

Grupo	Tratamiento	Dosis ARNm	Dosis total	EPO humana pmol/mL promedio	Polipéptido unidad de fármaco (pmol/ug)	Factor división de dosis
1	ARNm de EPO humana	1 × 100 ug	100 ug	14,3	0,14	1
2	ARNm de EPO humana	3 × 100 ug	300 ug	82,5	0,28	2
3	ARNm de EPO humana	6 × 100 ug	600 ug	273,0	0,46	3,3
4	ARNm de EPO humana	3 × 33,3 ug	100 ug	104,7	1,1	7,9
5	ARNm de EPO humana	6 × 16,5 ug	100 ug	127,9	1,3	9,3
6	ARNm luciferasa	6 × 100 ug	600 ug	0	--	--
7	Tampón solo	--	--	0	--	--

El factor de división se define como el producto por unidad de fármaco dividido por el producto de dosis única por unidad de fármaco (PUD). Por ejemplo, para el grupo de tratamiento 2, el valor 0,28 o producto (EPO) por unidad de fármaco (ARNm) se divide por el producto de dosis única por unidad de fármaco de 0,14. El resultado es 2. Asimismo, para el grupo de tratamiento 4, el valor 1,1 o producto (EPO) por unidad de fármaco (ARNm) se divide por la dosis única de producto por unidad de fármaco de 0,14. El resultado es 7,9. En consecuencia, el factor de división de dosis (DSF) puede utilizarse como indicador de la eficacia de un régimen de dosis dividida. Para cualquier administración única de una dosis diaria total, el DSF debe ser igual a 1. Por lo tanto, cualquier DSF superior a este valor en un régimen de dosis dividida es una indicación de mayor eficacia.

Se realizan estudios para determinar las tendencias de la respuesta a la dosis, el impacto del lugar de la inyección y el impacto del momento de la inyección. En estos estudios, se utilizan dosis variadas de 1 ug, 5 ug, 10 ug, 25 ug, 50 ug y valores intermedios para determinar los resultados de respuesta a la dosis. La dosificación dividida para una dosis total de 100 ug incluye tres o seis dosis de 1,6 ug, 4,2 ug, 8,3 ug, 16,6 ug, o valores y dosis totales iguales a la administración de la dosis total seleccionada.

Los sitios de inyección se eligen entre las extremidades o cualquier superficie del cuerpo que presente suficiente área adecuada para la inyección. Esto también puede incluir una selección de profundidad de inyección para apuntar a la dermis (intradérmica), la epidermis (epidérmica), el tejido subcutáneo (SC) o el músculo (IM). El ángulo de inyección variará en función del sitio de administración objetivo con inyecciones dirigidas al sitio intradérmico en ángulos de 10 a 15 grados desde el plano de la superficie de la piel, entre 20 a 45 grados desde el plano de la superficie de la piel para inyecciones subcutáneas y ángulos de entre 60 y 90 grados para inyecciones sustancialmente en el músculo.

35 Ejemplo 49. Cuantificación en exosomas

La cantidad y localización del ARNm se puede determinar midiendo las cantidades (inicial, en el tiempo o residual) en exosomas aislados. En este estudio, dado que el ARNm suele tener codones optimizados y una secuencia distinta del ARNm endógeno, los niveles de ARNm se cuantifican en comparación con los niveles endógenos de ARNm nativo o de tipo salvaje mediante los procedimientos de Gibbons, PCT/IB2009/005878.

En estos estudios, el procedimiento se realiza aislando primero exosomas o vesículas preferiblemente de un fluido corporal de un paciente tratado previamente con un ARNm modificado y, a continuación, midiendo, en dichos exosomas, los niveles de ARNm modificado mediante una micromatriz de ARNm, qRT-PCR u otros medios para medir el ARN en la técnica que incluyen anticuerpos adecuados o procedimientos inmunohistoquímicos.

Ejemplo 50. Transfección de ARNm modificado

A. Transfección inversa

- 5 Para los experimentos realizados en una placa de cultivo de tejidos recubierta de colágeno de 24 pocillos, los queratinocitos se siembran a una densidad celular de 1×10^5 . Para los experimentos realizados en una placa de cultivo de tejidos recubierta de colágeno de 96 pocillos, los queratinocitos se siembran a una densidad celular de $0,5 \times 10^5$.
- 10 Para cada ARNm modificado (ARNmm) que se va a transfectar, el ARNm modificado: RNAIMAX™ se prepara como se describe y se mezcla con las células en la placa multipocillo dentro de un período de tiempo, p. ej., 6 horas, de la siembra celular antes de que las células se adhirieran a la placa de cultivo de tejidos.

B. Transfección directa

- 15 En una placa de cultivo de tejidos recubierta de colágeno de 24 pocillos, los queratinocitos se siembran a una densidad celular de $0,7 \times 10^5$. Para los experimentos realizados en una placa de cultivo de tejidos recubierta de colágeno de 96 pocillos, los queratinocitos se siembran a una densidad celular de $0,3 \times 10^5$. Los queratinocitos se cultivan hasta una confluencia de >70 % durante más de 24 horas. Para cada ARNm modificado (ARNmm) que se va a transfectar, se prepara el ARNm modificado: RNAIMAX™ como se describe y se transfecta en las células en la placa multipocillo durante 24 horas después de la siembra celular y la adherencia a la placa de cultivo tisular.

C. Pantalla de traducción de ARNm modificado: G-CSF ELISA

- 25 Los queratinocitos se cultivan en medio EPILIFE con Suplemento S7 de Invitrogen (Carlsbad, CA) a una confluencia de >70 %. Un conjunto de queratinocitos se sometió a transfección inversa con 300 ng de ARNm modificado químicamente (ARNm) complejado con RNAIMAX™ de Invitrogen. Otro conjunto de queratinocitos se transfectan directamente con 300 ng de ARNm modificado complejado con RNAIMAX™ de Invitrogen. El complejo ARNm:RNAIMAX™ modificado se forma incubando primero el ARN con medio EPILIFE® sin suplementos en una dilución volumétrica 5X durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 30 En un segundo vial, el reactivo RNAIMAX™ se incubó con medio EPILIFE® libre de suplementos en una dilución volumétrica 10X durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el vial de ARN se mezcló con el vial de RNAIMAX™ y se incubó durante 20-30 minutos a temperatura ambiente antes de agregarlo a las células gota a gota. La concentración del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) humano secretado en el medio de cultivo se mide 18 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente por triplicado.

La secreción de G-CSF humano de queratinocitos humanos transfectados se cuantifica usando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems (Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes.

40 D. Dosis y duración de ARNm modificado: G-CSF ELISA

- Los queratinocitos se cultivan en medio EPILIFE® con Suplemento S7 de Invitrogen a una confluencia de >70 %. Los queratinocitos se transfecan inversamente con 0 ng, 46,875 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng o 1500 ng de ARNm modificado en complejo con RNAIMAX™ de Invitrogen (Carlsbad, CA). El complejo ARNm:RNAIMAX™ modificado se forma como se describe. La concentración de G-CSF humano secretado en el medio de cultivo se mide a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas después de la transfección para cada concentración de cada ARNm modificado por triplicado. La secreción de G-CSF humano de queratinocitos humanos transfectados se cuantifica utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes.

50 Ejemplo 51. Detección de una respuesta inmunitaria innata celular a ARNm modificado usando un ensayo ELISA

- Un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para el factor de necrosis tumoral humano- α (TNF- α), el interferón- β humano (IFN- β) y el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) secretados a partir de células de queratinocitos humanas transfectadas *in vitro* se analiza para la detección de una respuesta inmunitaria innata celular. Los queratinocitos se cultivan en medio EPILIFE® con suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos en ausencia de hidrocortisona de Invitrogen (Carlsbad, CA) a una confluencia de >70 %. Los queratinocitos TNF- α secretados se transfecan inversamente con 0 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng, 1500 ng o 3000 ng del ARNm modificado químicamente (ARNmm) complejado con RNAIMAX™ de Invitrogen como se describe por triplicado. El TNF- α secretado en el medio de cultivo se mide 24 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente usando un kit ELISA de Invitrogen según los protocolos del fabricante.

- 65 El IFN- β secretado en el mismo medio de cultivo se mide 24 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente usando un kit ELISA de Invitrogen según los protocolos del fabricante. La concentración de G-CSF humano secretado en el mismo medio de cultivo se mide 24 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente. La secreción de G-CSF humano de queratinocitos humanos transfectados se cuantifica usando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems (Minneapolis, MN) siguiendo las

instrucciones recomendadas por los fabricantes. Estos datos indican qué ARNm modificado (ARNmm) es capaz de provocar una respuesta inmunitaria innata celular reducida en comparación con polinucleótidos naturales y otros modificados químicamente o compuestos de referencia mediante la medición de citoquinas de tipo 1 ejemplares TNF- α e IFN- β .

5 Ejemplo 52. Ensayo de proliferación celular inducida por ARNm modificado con factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF)

10 Los queratinocitos humanos se cultivan en medio EPILIFE® con el Suplemento S7 de Invitrogen a una confluencia de >70 % en una placa de cultivo de tejido de cocultivo TRANSWFLL® (Coming, Lowell, MA) recubierta de colágeno de 24 pocillos. Los queratinocitos se transfectan inversamente con 750 ng del ARNm modificado químicamente (ARNmm) indicado complejado con RNAIMAX de Invitrogen como se describe por triplicado. El complejo ARNm:RNAIMAX modificado se forma como se describe. El medio de queratinocitos se intercambia 6-8 horas después de la transfección. 42 horas después de la transfección, el inserto de placa TRANSWELL® de 24 pocillos con una membrana de poliéster semipermeable de poro de 0,4 μ m se coloca en la placa de cultivo que contiene queratinocitos transfectados con ARNm modificado con GCSF humano.

15 Se siembran células de mieloblastos humanos, células Kasumi-1 o KG-1 ($0,2 \times 10^5$ células), en el pocillo del inserto y se cuantifica la proliferación celular 42 horas después del inicio del co-cultivo utilizando el ensayo de proliferación celular CyQuant Direct (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un volumen de 100-120 μ l en una placa de 96 pocillos. La proliferación de células de mieloblastos inducida por G-CSF humano que codifica el ARNm modificado se expresa como un porcentaje de proliferación celular normalizado a pocillos de control de co-cultivo de queratinocitos/mieloblastos no transfectados. La concentración de G-CSF humano secretado en los pocillos de co-cultivo del inserto de queratinocitos y mieloblastos se mide 42 horas después del inicio del co-cultivo para cada ARNm modificado por duplicado. La secreción de G-CSF humano se cuantifica utilizando un kit ELISA de Invitrogen siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

20 El ARNm modificado con G-CSF humano transfectado en células alimentadoras de queratinocitos humanos y células mieloblásticas humanas no transfectadas se detectan mediante RT-PCR. El ARN total de las células de muestra se extrae y se lisa con el kit RNEASY® (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. El ARN total extraído se envía a RT-PCR para la amplificación específica de ARNm-G-CSF modificado usando el kit PROTOSCRIPT® M-MuLV Taq RT-PCR (New England BioLabs, Ipswich, MA) según las instrucciones del fabricante con cebadores específicos de G-CSF humano. Los productos de RT-PCR se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 %.

25 35 Ejemplo 53. Estudios de formulación de tampones

30 ARNm modificado con G-CSF (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con N1-pseudouridina y 5-metilcitosina) o ARNm modificado con Factor IX (SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificado con N1-pseudouridina y 5-metilcitosina) en una solución tampón se administra por vía intramuscular a ratas en un volumen de inyección de 50 μ l (n=5) a una dosis modificada de ARNm de 200 ug por rata como se describe en la Tabla 78. El ARNm modificado se liofiliza en agua durante 1-2 días. A continuación, se reconstituye en los tampones enumerados a continuación hasta una concentración diana de 6 mg/ml. La concentración se determina por OD 260. Las muestras se diluyen a 4 mg/ml en el tampón apropiado antes de la dosificación.

35 45 Para precipitar el ARNm modificado, se añaden acetato de sodio 3 M, pH 5.5 y etanol puro a 1/10 del volumen total y 4 veces el volumen total de ARNm modificado, respectivamente. El material se coloca a -80 °C durante un mínimo de 1 hora. A continuación, el material se centrifuga durante 30 minutos a 4000 rpm, 4 °C. Se elimina el sobrenadante y el sedimento se centrifuga y se lava 3x con etanol al 75 %. Finalmente, el sedimento se reconstituye con tampón hasta una concentración diana de 6 mg/ml. La concentración se determina por OD 260. Las muestras se diluyen a 4 mg/ml en el tampón apropiado antes de la dosificación. Todas las muestras se preparan mediante liofilización a menos que se indique a continuación.

55 **Tabla 78. Grupos de dosificación de tampón**

Grupo	Tratamiento	Tampón	Dosis (ug/rata)
1	G-CSF	0,9 % de salina	200
	Factor IX	0,9 % de salina	200
2	G-CSF	0,9 % de salina + 2mM de calcio	200
	Factor IX	0,9 % de salina + 2mM de calcio	200
3	G-CSF	Ringer lactato	200
	Factor IX	Ringer lactato	200

Grupo	Tratamiento	Tampón	Dosis (ug/rata)
4	G-CSF	5 % de sacarosa	200
	Factor IX	5 % de sacarosa	200
5	G-CSF	5 % de sacarosa + 2mM de calcio	200
	Factor IX	5 % de sacarosa + 2mM de calcio	200
6	G-CSF	5 % de manitol	200
	Factor IX	5 % de manitol	200
7	G-CSF	5 % de manitol + 2mM de calcio	200
	Factor IX	5 % de manitol + 2mM de calcio	200
8	G-CSF	0,9 % de salina (precipitación)	200
	Factor IX	0,9 % de salina (precipitación)	200

Las muestras de suero se recogen de las ratas en varios intervalos de tiempo y se analizan para la expresión de la proteína G-CSF o Factor IX utilizando G-CSF o Factor IX ELISA.

5 Ejemplo 54. Estudio de dosis múltiples

A ratas Sprague-Dawley (n=8; 4 hembras, 4 machos) se les inyecta por vía intravenosa ocho veces (dos veces por semana) durante 28 días. A las ratas se les inyectan 0,5 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,005 mg/kg o 0,0005 mg/kg de ARNm modificado con G-CSF humano de ARNm modificado con luciferasa formulado en una nanopartícula lipídica, 0,5 mg/kg de ARNm modificado de G-CSF humano en solución salina, 0,2 mg/kg de la proteína G-CSF humana Neupogen o ARNm modificado de G-CSF humano no traducible formulado en una nanopartícula lipídica. El suero se recolecta durante intervalos de tiempo predeterminados para evaluar la expresión de proteína G-CSF (8, 24 y 72 horas después de la primera dosis de la semana), hemograma completo y recuento de glóbulos blancos (24 y 72 horas después de la primera dosis de la semana) y química clínica (24 y 72 horas después de la primera dosis de la semana). Las ratas 10 se sacrifican el día 29, 4 días después de la dosificación final, para determinar el recuento sanguíneo completo, el recuento de glóbulos blancos, la química clínica, la expresión de proteínas y evaluar el efecto sobre los órganos principales mediante histopatología y necropsia. Además, se realiza un ensayo de anticuerpos en las ratas el día 29.

15

Ejemplo 55. Estudio *in vivo* de luciferasa LNP

20 Se formuló ARNm modificado con luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia, tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina como una nanopartícula lipídica (LNP) utilizando el procedimiento de bomba de jeringa. El LNP se formuló con una proporción en peso de lípido total a ARNm modificado de 20:1 con una proporción molar final de lípidos de 50:10:38,5:1,5 (DLin-KC2-DMA: DSPC: Colesterol: PEG-DMG). Como se muestra en la Tabla 79, la formulación de luciferasa LNP se caracterizó por tamaño de partícula, potencial zeta y encapsulación.

25

Tabla 79. Formulación de luciferasa

Formulación	NPA-098-1
ARNm modificado	Luciferasa
Tamaño medio	135 nm
	PDI: 0,08
Zeta a pH 7,4	-0,6 mV
Encaps. (RiboGr)	91 %

30 Como se describe en la Tabla 80, la formulación de LNP de luciferasa se administró a ratones Balb-C (n=3) por vía intramuscular, intravenosa y subcutánea y un ARN modificado con luciferasa formulado en PBS se administró a ratones por vía intravenosa.

Tabla 80. Formulaciones de luciferasa

Formulación	Vehículo	Vía	Concentración (mg/ml)	Volumen de inyección (ul)	Cantidad de ARN modificado (ug)	Dosis (mg/kg)
Luc-LNP	PBS	IV	0,20	50	10	0,50
Luc-LNP	PBS	IM	0,20	50	10	0,50
Luc-LNP	PBS	SC	0,20	50	10	0,50

Formulación	Vehículo	Vía	Concentración (mg/ml)	Volumen de inyección (ul)	Cantidad de ARN modificado (ug)	Dosis (mg/kg)
Luc-PBS	PBS	IV	0,20	50	10	0,50

Se tomaron imágenes de los ratones a los que se les administró la formulación de luciferasa LNP por vía intravenosa e intramuscular a las 2, 8, 24, 48, 120 y 192 horas y se tomaron imágenes de los ratones a los que se les administró la formulación de luciferasa LNP por vía subcutánea a las 2, 8, 24, 48 y 120 horas para determinar la expresión de luciferasa como se muestra en la Tabla 81. En la Tabla 81, "NT" significa no probado. Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón.

10 **Tabla 81. Expresión de luciferasa**

Formulación	Vía de administración	Expresión promedio (fotón/segundo)					
		2 horas	8 horas	24 horas	48 horas	120 horas	192 horas
Luc-LNP	IV	1,62E+08	3,00E+09	7,77E+08	4,98E+08	1,89E+08	6,08E+07
Luc-LNP	IM	4,85E+07	4,92E+08	9,02E+07	3,17E+07	1,22E+07	2,38E+06
Luc-LNP	SC	1,85E+07	9,79E+08	3,09E+08	4,94E+07	1,98E+06	NT
Luc-PBS	IV	3,61E+05	5,64E+05	3,19E+05	NT	NT	NT

Un ratón al que se le administró la formulación de LNP por vía intravenosa se sacrificó a las 8 horas para determinar la expresión de luciferasa en el hígado y el bazo. Además, se sacrificó un ratón al que se administró la formulación de LNP por vía intramuscular a las 8 horas para determinar la expresión de luciferasa del músculo alrededor del sitio de inyección y en el hígado y el bazo. Como se muestra en la Tabla 82, se observó expresión tanto en el hígado como en el bazo después de la administración intravenosa e intramuscular y en el músculo alrededor del sitio de la inyección intramuscular.

15 **Tabla 82. Expresión de luciferasa en tejido**

Luciferasa LNP: Administración IV	Expresión (fotón/segundo)
Hígado	7,984E+08
Bazo	3,951E+08
Luciferasa LNP: IM	Expresión
Administración	(fotón/segundo)
Músculo alrededor del sitio de la inyección	3,688E+07
Hígado	1,507E+08
Bazo	1,096E+07

20 Ejemplo 56. Estudios de PBMC *in vitro*: modificación porcentual

Se transfecaron 480 ng de ARNm de G-CSF modificado con 5-metilcitosina (5mC) y pseudouridina (pseudoU) o ARNm de G-CSF no modificado con 0,4 μ L de Lipofectamine 2000 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres donantes de sangre normales (D1, D2 y D3). El ARNm de G-CSF (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) se modificó completamente con 5mC y pseudoU (100 % de modificación), no se modificó con 5mC y pseudoU (0 % de modificación) o se modificó parcialmente con 5 mC y pseudoU, por lo que el ARNm contendría un 75 % de modificación, un 50 % de modificación o un 25 % de modificación. También se analizó para la expresión de G-CSF una muestra de control de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; 5meC y pseudoU completamente modificados). Para muestras de control de TNF-alfa e IFN-alfa de Lipofectamine2000, LPS, R-848, Luciferasa (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 16; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado 5mC y pseudo), y P(I)P(C) también se analizaron. El sobrenadante se recogió y se analizó mediante ELISA 22 horas después de la transfección para determinar la expresión de la proteína. La expresión de G-CSF se muestra en la Tabla 83 y la expresión de IFN-alfa y TNF-alfa se muestra en la Tabla 84. La expresión de IFN-alfa y TNF-alfa puede ser un efecto secundario de la transfección del ARNm de G-CSF. Las tablas 83 y 84 muestran que la cantidad de modificación química de G-CSF, interferón alfa (IFN-alfa) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) es valorable cuando el ARNm no está completamente modificado y la tendencia valorable no es la misma para

cada objetivo.

- Como se mencionó anteriormente, usando PBMC como un sistema de ensayo *in vitro* es posible establecer una correlación entre la traducción (en este caso, la producción de proteína G-CSF) y la producción de citoquinas (en este caso, exemplificada por la producción de proteína IFN-alfa). Una mejor producción de proteínas se correlaciona con una menor inducción de la vía de activación inmunitaria innata, y el porcentaje de modificación de una química puede juzgarse favorablemente en función de esta relación (Tabla 85). Tal como se calcula a partir de las Tablas 83 y 84 y se muestra en la Tabla 85, la modificación completa con 5-metilcitidina y pseudouridina muestra una proporción mucho mejor de producción de proteína/citocina que sin ninguna modificación (ARNm de G-CSF natural) (100 veces para IFN-alfa y 27 veces para TNF-alfa). La modificación parcial muestra una relación lineal con una modificación cada vez menor que da como resultado una relación proteína/citoquina más baja.

Tabla 83. Expresión de G-CSF

	Expresión de G-CSF (pg/ml)		
	D1	D2	D3
100 % de modificación	1968,9	2595,6	2835,7
75 % de modificación	566,7	631,4	659,5
50 % de modificación	188,9	187,2	191,9
25 % de modificación	139,3	126,9	102,0
0 % de modificación	194,8	182,0	183,3
Luciferasa	90,2	0,0	22,1

Table 84. Expresión de IFN-alfa y TNF-alfa

	Expresión de IFN-alfa (pg/ml)			Expresión de TNF-alfa (pg/ml)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100 % de modificación	336,5	78,0	46,4	115,0	15,0	11,1
75 % de modificación	339,6	107,6	160,9	107,4	21,7	11,8
50 % de modificación	478,9	261,1	389,7	49,6	24,1	10,4
25 % de modificación	564,3	400,4	670,7	85,6	26,6	19,8
0 % de modificación	1421,6	810,5	1260,5	154,6	96,8	45,9
LPS	0,0	0,6	0,0	0,0	12,6	4,3
R-848	0,5	3,0	14,1	655,2	989,9	420,4
P(I)P(C)	130,8	297,1	585,2	765,8	2362,7	1874,4
Lípido solo	1952,2	866,6	855,8	248,5	82,0	60,7

Tabla 85. Relación de PC y efecto del porcentaje de modificación

% de modificación	G-CSF promedio (pg/ml)	IFN-a promedio (pg/ml)	TNF- α promedio (pg/ml)	G-CSF/IFN-alfa (relación de PC)	G-CSF/TNF-alfa (relación de PC)
100	2466	153	47	16	52
75	619	202	47	3,1	13
50	189	376	28	0,5	6,8
25	122	545	44	0,2	2,8
0	186	1164	99	0,16	1,9

Ejemplo 57. ARN modificado transfectado en PBMC

- Se transfecaron 500 ng de ARNm de G-CSF modificado con 5-metilcitosina (5mC) y pseudouridina (pseudoU) o ARNm de G-CSF sin modificar con 0,4 uL de Lipofectamine 2000 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres donantes de sangre normales (D1, D2 y D3). El ARNm de G-CSF (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) se modificó completamente con 5mC y pseudoU (100 % de modificación), no se modificó con 5mC y pseudoU (0 % de modificación) o se modificó parcialmente con 5mC y pseudoU, por lo que el ARNm contendría 50 % de modificación, 25 % de modificación, 10 % de modificación, 5 % de modificación, 1 % de modificación o 0,1 % de modificación. Una muestra de control de mCherry (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; 5meC completamente modificado y pseudouridina) y G-CSF completamente

- modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (Control G-CSF) también se analizó para determinar la expresión de G-CSF. Para muestras de control de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) e interferón-alfa (IFN-alfa) de Lipofectamine2000, LPS, R-848, Luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa1; 5mC completamente modificado y pseudo) y P(I)P(C) se analizaron también. El sobrenadante se recogió 6 horas y 18 horas después de la transfección y se analizó mediante ELISA para determinar la expresión de la proteína. La expresión de G-CSF, IFN-alfa y TNF-alfa para el Donante 1 se muestra en la Tabla 86, el Donante 2 se muestra en la Tabla 87 y el Donante 3 se muestra en la Tabla 88.
- La modificación completa del 100 % con 5-metilcitosina y pseudouridina dio como resultado la mayor traducción de proteínas (G-CSF) y la menor cantidad de citoquinas producidas en los tres donantes humanos de PBMC. Las cantidades decrecientes de modificación dan como resultado una mayor producción de citoquinas (IFN-alfa y TNF-alfa), lo que resalta aún más la importancia de la modificación completa para reducir las citoquinas y mejorar la traducción de proteínas (como lo demuestra aquí la producción de G-CSF).
- 15

Tabla 86. Donante 1

	G-CSF (pg/mL)		IFN-alfa (pg/mL)		TNF-alfa (pg/mL)	
	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas
100 % de mod.	1815	2224	1	13	0	0
75 % de mod.	591	614	0	89	0	0
50 % de mod.	172	147	0	193	0	0
25 % de mod.	111	92	2	219	0	0
10 % de mod.	138	138	7	536	18	0
1 % de mod.	199	214	9	660	18	3
0,1 % de mod.	222	208	10	597	0	6
0 % de mod.	273	299	10	501	10	0
Control G-CSF	957	1274	3	123	18633	1620
mCherry	0	0	0	10	0	0
Sin tratar	N/A	N/A	0	0	1	1

Tabla 87. Donante 2

	G-CSF (pg/mL)		IFN-alfa (pg/mL)		TNF-alfa (pg/mL)	
	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas
100 % de mod.	2184	2432	0	7	0	11
75 % de mod.	935	958	3	130	0	0
50 % de mod.	192	253	2	625	7	23
25 % de mod.	153	158	7	464	6	6
10 % de mod.	203	223	25	700	22	39
1 % de mod.	288	275	27	962	51	66
0,1 % de mod.	318	288	33	635	28	5
0 % de mod.	389	413	26	748	1	253
Control G-CSF	1461	1634	1	59	481	814
mCherry	0	7	0	1	0	0
Sin tratar	N/A	N/A	1	0	0	0

Tabla 88. Donante 3

	G-CSF (pg/mL)		IFN-alfa (pg/mL)		TNF-alfa (pg/mL)	
	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas
100 % de mod.	6086	7549	7	658	11	11
75 % de mod.	2479	2378	23	752	4	35
50 % de mod.	667	774	24	896	22	18
25 % de mod.	480	541	57	1557	43	115
10 % de mod.	838	956	159	2755	144	123

	G-CSF (pg/mL)		IFN-alfa (pg/mL)		TNF-alfa (pg/mL)	
	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas
1 % de mod.	1108	1197	235	3415	88	270
0,1 % de mod.	1338	1177	191	2873	37	363
0 % de mod.	1463	1666	215	3793	74	429
Control G-CSF	3272	3603	16	1557	731	9066
mCherry	0	0	2	645	0	0
Sin tratar	N/A	N/A	1	1	0	8

Ejemplo 58. Estudio de respuesta inmune innata en fibroblastos BJ

A. Transfección única

5 Se obtuvieron fibroblastos primarios de prepucio humano (fibroblastos BJ) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (n.º de catálogo CRL-2522) y se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Eagle (ATCC, n.º de catálogo 30-2003) suplementados con suero bovino fetal al 10 % a 37 °C, por debajo del 5 % de CO₂. Se sembraron fibroblastos BJ en una placa de 24 pocillos a una densidad de 300.000 células por pocillo en 0,5 ml de medio de cultivo. 250 ng de ARNm de G-CSF modificado (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (Gen1) o completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (Gen2) con Tapa0, Tapa1 o sin tapa se transfeció usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, n.º de catálogo 11668-019), siguiendo el protocolo del fabricante. Muestras de control de poli I:C (PIC), Lipofectamine 2000 (Lipo), ARNm de luciferasa natural (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1) y natural También se transfeció ARNm de G-CSF. Las células se recogieron después de 18 horas, se aisló el ARN total y se trató con DNASE® utilizando el microkit RNeasy (n.º de catálogo 74004) siguiendo el protocolo del fabricante. Se usaron 100 ng de ARN total para la síntesis de ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (n.º de catálogo 4368814) siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, se analizó el ADNc para determinar la expresión de genes de respuesta inmunitaria innata mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando SybrGreen en un instrumento Biorad CFX 384 siguiendo el protocolo del fabricante. La Tabla 89 muestra el nivel de expresión de los transcriptos de la respuesta inmunitaria innata en relación con el gen de mantenimiento HPRT (hipoxantina fosforribosiltransferasa) y se expresa como el número de veces de inducción en relación con HPRT. En la tabla, el panel de métricas estándar incluye: RIG-I es el gen 1 inducible por ácido retinoico, IL6 es interleucina-6, OAS-1 es oligoadenilato sintetasa 1, IFNb es interferón-beta, AIM2 está ausente en melanoma-2, IFIT -1 es proteína inducida por interferón con tetratricopéptido repite 1, PKR es proteína quinasa R, TNFa es factor de necrosis tumoral alfa e IFNa es interferón alfa.

10

15

20

25

Tabla 89. Niveles de transcripción de respuesta inmune innata

Formulación	RIG-I	IL6	OAS-1	IFNb	AIM2	IFIT-1	PKR	TNFa	IFNa
Luciferasa natural	71,5	20,6	20,778	11,404	0,251	151,218	16,001	0,526	0,067
G-CSF natural	73,3	47,1	19,359	13,615	0,264	142,011	11,667	1,185	0,153
PIC	30,0	2,8	8,628	1,523	0,100	71,914	10,326	0,264	0,063
G-CSF Gen1-UC	0,81	0,22	0,080	0,009	0,008	2,220	1,592	0,090	0,027
G-CSF Gen1-Tapa0	0,54	0,26	0,042	0,005	0,008	1,314	1,568	0,088	0,038
G-CSF Gen1-Tapa1	0,58	0,30	0,035	0,007	0,006	1,510	1,371	0,090	0,040
G-CSF Gen2-UC	0,21	0,20	0,002	0,007	0,007	0,603	0,969	0,129	0,005
G-CSF Gen2-Tapa0	0,23	0,21	0,002	0,0014	0,007	0,648	1,547	0,121	0,035
G-CSF Gen2-Tapa 1	0,27	0,26	0,011	0,004	0,005	0,678	1,557	0,099	0,037
Lipo	0,27	0,53	0,001	0	0,007	0,954	1,536	0,158	0,064

30 B. Transfección repetida

Se obtuvieron fibroblastos primarios de prepucio humano (fibroblastos BJ) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (n.º de catálogo CRL-2522) y se cultivaron en Medio Esencial Mínimo de Eagle (ATCC, n.º de catálogo 30-2003) suplementados con suero bovino fetal al 10 % a 37 °C, por debajo del 5 % de CO₂. Se sembraron fibroblastos BJ en una placa de 24 pocillos a una densidad de 300.000 células por pocillo en 0,5 ml de medio de cultivo. 250 ng de ARNm de G-CSF modificado (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) sin modificar, completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (Gen1) o completamente modificada con 5-metilcitosina y N1-

35

metilpseudouridina (Gen2) se transfeció diariamente durante 5 días siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de control de Lipofectamine 2000 (L2000) y ARNm de mCherry (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) también se transfecieron diariamente durante 5 días. Los resultados se muestran en la Tabla 90.

El ARNm no modificado mostró una respuesta de citoquinas en interferón-beta (IFN-beta) e interleuquina-6 (IL-6) después de un día. El ARNm modificado con al menos pseudouridina mostró una respuesta de citoquinas después de 2-3 días, mientras que el ARNm modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina mostró una respuesta reducida después de 3-5 días.

Tabla 90. Respuesta de citoquina

Formulación	Transfección	IFN-beta (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
G-CSF no modificado	6 horas	0	3596
	Día 1	1363	15207
	Día 2	238	12415
	Día 3	225	5017
	Día 4	363	4267
	Día 5	225	3094
G-CSF Gen 1	6 horas	0	3396
	Día 1	38	3870
	Día 2	1125	16341
	Día 3	100	25983
	Día 4	75	18922
	Día 5	213	15928
G-CSF Gen 2	6 horas	0	3337
	Día 1	0	3733
	Día 2	150	974
	Día 3	213	4972
	Día 4	1400	4122
	Día 5	350	2906
mCherry	6 horas	0	3278
	Día 1	238	3893
	Día 2	113	1833
	Día 3	413	25539
	Día 4	413	29233
	Día 5	213	20178
L2000	6 horas	0	3270
	Día 1	13	3933
	Día 2	388	567
	Día 3	338	1517
	Día 4	475	1594
	Día 5	263	1561

Ejemplo 59. Estudio de detección *in vivo* de la respuesta inmune innata

A ratones hembra BALB/C (n=5) se les inyectó por vía intramuscular ARNm de G-CSF (ARNm de GCSF no modificado) (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 6; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia) con una tapa 5' de Tapa1, ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (ARNm de GCSF 5 mc/pU), ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina con (ARNm de GCSF 5 mc/N1pU) o sin tapa 5' (ARNm GCSF 5mc/N1 pU sin tapa) o un control de R848 o 5 % de sacarosa como se describe en la Tabla 91. Se recolecta sangre 8 horas después de la dosificación y usando ELISA los niveles de proteína de G-CSF e interferón-alfa (IFN-alfa) se determina mediante ELISA y se

muestran en la Tabla 81.

Como se muestra en la Tabla 91, el ARNm de G-CSF no modificado, 5mc/pU y 5mc/N1pU modificado dio como resultado la expresión de G-CSF humano en suero de ratón. El ARNm de G-CSF modificado con 5mC/N1pU no recubierto no mostró expresión de G-CSF humano en suero, lo que destaca la importancia de tener una estructura de tapa 5' para la traducción de proteínas.

Como se esperaba, no se expresó proteína G-CSF humana en los grupos R848, de 5 % de sacarosa solamente y no tratados. Es importante destacar que se observaron diferencias significativas en la producción de citoquinas medida por IFN-alfa de ratón en el suero. Como se esperaba, el ARNm de G-CSF no modificado demostró una respuesta sólida de citoquinas *in vivo* (mayor que el control positivo R848). El ARNm de G-CSF modificado con 5mc/pU mostró una respuesta de citoquinas baja pero detectable *in vivo*, mientras que el ARNm modificado con 5mc/N1pU no mostró IFN-alfa detectable en el suero (y lo mismo que el vehículo o los animales no tratados).

Además, la respuesta del ARNm modificado con 5mc/N1pU fue la misma independientemente de si estaba recubierto o no. Estos resultados *in vivo* refuerzan la conclusión de que 1) que el ARNm no modificado produce una respuesta inmunitaria innata robusta, 2) que esta se reduce, pero no se elimina, mediante la incorporación al 100 % de la modificación de 5mc/pU, y 3) que la incorporación de las modificaciones 5mc/N1pU dan como resultado una respuesta de citoquinas no detectable.

Por último, dado que estas inyecciones son de sacarosa al 5 % (que por sí sola no tiene efecto), este resultado debería reflejar fielmente el potencial inmunoestimulador de estas modificaciones.

A partir de los datos, es evidente que las moléculas modificadas con N1pU producen más proteína y, al mismo tiempo, tienen poco o ningún efecto sobre la expresión de IFN-alfa. También es evidente que se requiere recubrimiento para la producción de proteínas para esta modificación química. La relación proteína:citoquina de 748 en comparación con la relación de PC para el ARNm no modificado (PC = 9) significa que esta modificación química es muy superior en relación con los efectos o implicaciones biológicas asociadas con IFN-alfa.

Tabla 91. G-CSF humano e IFN-alfa de ratón en suero

Formulación	Vía	Dosis (ug/ratón)	Dosis (ul)	Proteína G-CSF (pg/ml)	Expresión IFN-alfa (pg/ml)	Relación de PC
ARNm de GCSF no mod.	I.M.	200	50	605,6	67,01	9
ARNm de GCSF 5mc/pU	I.M.	200	50	356,5	8,87	40
GCSF ARNm5mc/N1pU	I.M.	200	50	748,1	0	748
GCSF ARNm5mc/N1pU sin tapa	I.M.	200	50	6,5	0	6,5
R848	I.M.	75	50	3,4	40,97	,08
5 % de sacarosa	I.M.	-	50	0	1,49	0
Sin tratar	I.M.	-	-	0	0	0

Ejemplo 60: Administración *in vivo* de ARN modificado

La producción de proteína de ARNm modificado se evaluó administrando ARNm de G-CSF modificado o ARNm de Factor IX modificado a ratas hembra Sprague Dawley (n=6). A las ratas se les inyectaron 400 ug en 100 ul de ARNm de G-CSF (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (G-CSF Gen1), ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (G-CSF Gen2) o ARNm del Factor IX (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina (Factor IX Gen1) reconstituida a partir de la forma liofilizada en sacarosa al 5 %. La sangre se recogió 8 horas después de la inyección y el nivel de proteína G-CSF en suero se midió mediante ELISA. La Tabla 92 muestra los niveles de proteína G-CSF en suero después de 8 horas.

Estos resultados demuestran que tanto el ARNm modificado con G-CSF Gen 1 como el G-CSF Gen 2 pueden producir proteína G-CSF humana en una rata después de una única inyección intramuscular, y que la producción de proteína G-CSF humana mejora cuando se utiliza química Gen 2 sobre química Gen 1.

Tabla 92. Proteína G-CSF en suero de rata (vía de inyección I.M.)

Formulación	Proteína G-CSF (pg/ml)
G-CSF Gen1	19,37
G-CSF Gen2	64,72
Factor IX Gen 1	2,25

Ejemplo 78. Estabilidad de ARN modificado

- 5 Se realizaron experimentos de estabilidad para obtener una mejor comprensión de las condiciones de almacenamiento para retener la integridad del ARN modificado. ARNm de G-CSF no modificado (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1), ARNm de G-CSF (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 6; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina y ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina lipoplexada con 0,75 % en volumen de RNAIMAX™ se almacenó a 50 °C, 40 °C, 37 °C, 25 °C, 4 °C o -20 °C. Después de que el ARNm se había almacenado durante 0 horas, 2 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 5 días y 14 días, el ARNm se analizó mediante electroforesis en gel usando un sistema Bio-Rad EXPERION™. El ARNm de G-CSF modificado, no modificado y lipoplexado también se almacenó en RNASTABLE® (Biomatrica, Inc. San Diego, CA) a 40 °C o agua a -80 °C o 40 °C durante 35 días antes de analizarse mediante electroforesis en gel.
- 10 15 Todas las muestras de ARNm sin estabilizador se mantuvieron estables después de 2 semanas después del almacenamiento a 4 °C o -20 °C. El ARNm de G-CSF modificado, con o sin lipoplex, fue más estable que el G-CSF no modificado cuando se almacenó a 25 °C (estable a 5 días frente a 48 horas), 37 °C (estable a 24 horas frente a 6 horas) y 50 °C (estable a 6 horas frente a 2 horas). ARNm de G-CSF no modificado, ARNm de G-CSF modificado con o sin 12 ciclos de congelación/descongelación tolerados de lipoplex.
- 20 25 Las muestras de ARNm almacenadas en el estabilizador a 40 °C mostraron una estabilidad similar a las muestras de ARNm almacenadas en agua a -80 °C después de 35 días, mientras que el ARNm almacenado en agua a 40 °C mostró una degradación intensa después de 18 días.
- 30 35 Las muestras de ARNm almacenadas a 4 °C, 25 °C y 37 °C se almacenaron en tampón TE 1x o el tampón de formulación (cloruro de sodio 150 mM, cloruro de calcio 2 mM, fosfato 2 mM, EDTA 0,5 mM a un pH de 6,5). El ARNm almacenado a 4 °C fue estable durante al menos 60 días tanto en el TE como en el tampón de formulación. A 25 °C, el ARNm en el tampón de formulación fue estable durante 14 días y el tampón TE fue estable durante al menos 6 días.
- 40 45 El almacenamiento de ARNm en el tampón de formulación a 37 °C fue estable durante 6 días en comparación con el tampón TE, que fue estable solo hasta 4 días.

Ejemplo 62. Efectos de las modificaciones químicas sobre la expresión del ARNm formulado

- 35 El ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) totalmente modificado con 5-metilcitosina y 2'fluorouridina se formula en solución salina o DLin-MC3-DMA y se administra por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea a roedores a una dosis de 0,5 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,005 mg/kg y/o 0,0005 mg/kg. El ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', 1) completamente modificado con 5-metilcitosina y pseTapaudouridina se formula en DLin-MC3-DMA y se administra por vía intramuscular o subcutánea a roedores en una dosis de 0,5 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,005 mg/kg y/o 0,0005 mg/kg. Las formulaciones de DLin-MC3-DMA se analizan antes de la administración para determinar el tamaño medio y el potencial zeta. Se obtienen imágenes de los roedores a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 72 horas, 96 horas, 144 horas y 168 horas después de la dosificación y la bioluminiscencia se mide en fotones por segundo para cada vía de administración y formulación.

Ejemplo 63. Expresión de ARNm formulado con PLGA**A. Síntesis y caracterización de microesferas de PLGA de luciferasa**

- 50 ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metil pseudouridina, modificado con 25 % de uridina reemplazada con 2-tiouridina y 25 % de citosina reemplazada con 5-metilcitosina, completamente modificada con N1-metil pseudouridina, o completamente modificada con pseudouridina en tampón TE 1x y, a continuación, se formuló en microesferas de PLGA. Las microesferas de PLGA se sintetizaron usando los procedimientos de doble emulsificación de agua/aceite/agua conocidos en la técnica usando una tapa de éster de PLGA (Lactel, Cat# B6010-2, viscosidad inherente 0,55-0,75, 50:50 LA:GA), alcohol polivinílico (PVA) (Sigma, Cat# 348406-25G, MW 13-23k) diclorometano y agua. En resumen, se añadieron 0,4 ml de ARNm en tampón TE a 4 mg/ml (W1) a 2 ml de PLGA disueltos en diclorometano (DCM) (O1) a una concentración de 200 mg/ml de PLGA. La emulsión W1/O1 se homogeneizó (homogeneizador IKA Ultra-Turrax, T18) durante 30 segundos a velocidad 5 (~19.000 rpm). A continuación, se añadió la emulsión W1/O1 a 250 ml de PVA al 1 % (W2) y se homogeneizó durante 1 minuto a velocidad 5 (~19.000 rpm). Las formulaciones se dejaron en agitación durante 3

5 horas, a continuación se pasaron por un colador de malla de nailon de 100 µm (Fisherbrand Cell Strainer, Cat # 22-363-549) para eliminar los agregados más grandes y finalmente se lavaron por centrifugación (10 min, 9250 rpm, 4 °C). Se descartó el sobrenadante y los gránulos de PLGA se resuspendieron en 5-10 ml de agua, lo que se repitió 2 veces. Después de lavar y resuspender con agua, se usaron 100-200 µl de una muestra de microesferas de PLGA para medir el tamaño de partícula de las formulaciones por difracción láser (Malvern Mastersizer 2000). Las formulaciones lavadas se congelaron en nitrógeno líquido y, a continuación, se liofilizaron durante 2-3 días.

10 Después de la liofilización, se pesaron ~10 mg de PLGA MS en tubos Eppendorf de 2 ml y se deformularon agregando 1 ml de DCM y dejando que las muestras se agitaran durante 2 a 6 horas. El ARNm se extrajo de las microesferas de PLGA deformuladas añadiendo 0,5 ml de agua y agitando la muestra durante la noche. El ARNm de luciferasa no formulado en tampón TE (control no formulado) se introdujo en DCM y pasó por el proceso de deformulación (control de deformulación) para usarse como control en el ensayo de transfección. La eficiencia de encapsulación, el porcentaje de carga en peso y el tamaño de partícula se muestran en la Tabla 93. La eficiencia de encapsulación se calculó como mg de ARNm de la deformulación de microesferas de PLGA dividido por la cantidad inicial de ARNm añadida a la formulación. El porcentaje en peso de carga en la formulación se calculó como mg de ARNm de la deformulación de microesferas de PLGA dividido por la cantidad inicial de PLGA añadida a la formulación.

15 Tabla 93. Características de PLGA

20

Modificaciones químicas	ID muestra	Eficiencia de encapsulación (%)	Carga teórica de ARNm (% en peso)	Carga real de ARNm (% en peso)	Tamaño de partícula (D50, um)
Completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metil pseudouridina	43-66A	45,8	0,4	0,18	33,4
	43-66B	29,6		0,12	27,7
	43-66C	25,5		0,10	27,1
25 % de uridina reemplazada con 2-tiouridina y 25 % de citosina reemplazada con 5-metilcitosina	43-67A	34,6	0,4	0,14	29,9
	43-67B	22,8		0,09	30,2
	43-67C	23,9		0,10	25,1
Completamente modificado con N1 - metil pseudouridina	43-69A	55,8	0,4	0,22	40,5
	43-69B	31,2		0,12	41,1
	43-69C	24,9		0,10	46,1
Completamente modificado con pseudouridina	43-68-1	49,3	0,4	0,20	34,8
	43-68-2	37,4		0,15	35,9
	43-68-3	45,0		0,18	36,5

B. Expresión de proteínas de ARNm modificado encapsulado en microesferas de PLGA

25 El día antes de la transfección, 20.000 células HeLa (ATCC no. CCL-2; Manassas, VA) se recolectaron mediante tratamiento con solución de tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) y se sembraron en un volumen total de 100 ul de medio EMEM (complementado con 10 % de FCS y 1x Glutamax) por pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Manassas, VA). Las células se cultivaron a 37 oC en atmósfera de CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se diluyeron 83 ng de muestras de microesferas de PLGA de ARNm de luciferasa deformulado, control de ARNm de luciferasa deformulado (control Deform) o control de ARNm de luciferasa no formulado (control No formul.) en un volumen final de 10 ul de OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). Se utilizó Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) como reactivo de transfección y se diluyeron 0,2 ul en un volumen final de 10 ul de OPTI-MEM. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, ambas soluciones se combinaron y se incubaron 15 min más a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 20 ul de la solución combinada a 100 ul de medio de cultivo celular que contenía las células HeLa. A continuación, las placas se incubaron como se ha descrito anteriormente.

30 Después de una incubación de 18 a 22 horas, las células que expresaban luciferasa se lisaron con 100 ul de tampón de lisis pasivo (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Se transfirieron alícuotas de los lisados a placas de 96 pocillos de poliestireno blanco opaco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución

de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de unas 200 unidades relativas de luz por pocillo. El lector de placas fue un BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT).

- 5 Las células se recolectaron y la bioluminiscencia (en unidades relativas de luz, RLU) para cada muestra se muestra en la Tabla 94. La transfección de estas muestras confirmó que las diversas químicas del ARNm de luciferasa aún pueden expresar la proteína luciferasa después de la formulación de microesferas de PLGA.

Tabla 94. Modificaciones químicas

Modificaciones químicas	ID de muestra	Biolum. (RLU)
Completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metil pseudouridina	Control deform.	164266,5
	Control no formul.	113714
	43-66A	25174
	43-66B	25359
	43-66C	20060
25 % de uridina reemplazada con 2-tiouridina y 25 % de citosina reemplazada con 5-metilcitosina	Control deform.	90816,5
	Control no formul.	129806
	43-67 A	38329,5
	43-67B	8471,5
	43-67C	10991,5
Completamente modificado con N1-metil pseudouridina	Control de deform.	928093,5
	Control no formul.	1512273,5
	43-69A	1240299,5
	43-69B	748667,5
	43-69C	1193314
Completamente modificado con pseudouridina	Control deform.	154168
	Control no formul.	151581
	43-68-1	120974,5
	43-68-2	107669
	43-68-3	97226

- 10 Ejemplo 64. Estudios *in vitro* del Factor IX

A. Medios sin suero

- 15 Se transfeció ARNm de factor IX humano (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) en medio sin suero. El sobrenadante del cultivo celular se recogió y se sometió a digestión con tripsina antes de someterse a la separación de los péptidos por HPLC bidimensional. Se usó desorción/ionización láser asistida por matriz para detectar los péptidos. Se detectaron 8 péptidos y 7 de los péptidos detectados son exclusivos del Factor IX. Estos resultados indican que el ARNm transfecido en el medio sin suero 20 pudo expresar la proteína Factor IX de longitud completa.

B. Células 293A de riñón embrionario humano (HEK)

- 25 Se transfecaron 250 ng de ARNm de factor IX humano optimizado por codón (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 10; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) en células HEK 293A (150.000 células/pocillo) utilizando Lipofectamine 2000 en DMEM en presencia de FBS al 10 %. Los complejos de transfección se eliminaron 3 horas después de la transfección. Las células se recogieron a las 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 horas después de la transfección. Se aisló el ARN total y se usó para la síntesis de ADNc. El ADNc se sometió a análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando un conjunto de cebadores específicos del factor IX optimizado por codón. Para la normalización se utilizó el nivel de hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT) humana. Los datos se representan como un porcentaje de ARNm detectable considerando el nivel de ARNm como 100 % en el punto de tiempo de 3 horas. La vida media del ARNm modificado con Factor IX totalmente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina 30 en células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) es de aproximadamente 8-10 horas.

Ejemplo 65. Formulación salina: administración subcutánea

ARNm modificado con G-CSF humano (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) y ARNm modificado con EPO humana (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ

5 ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina), se formularon en solución salina y se administraron a ratones mediante inyección intramuscular (IM) a una dosis de 100 ug.

10 Los controles incluían luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina)) o el tampón de formulación (F.Buffer) . Se extrajo sangre de los ratones 13 horas después de la inyección para determinar la concentración del polipéptido humano en suero en pg/ml. (Los grupos de G-CSF midieron G-CSF humano en suero de ratón y los grupos de EPO midieron EPO humana en suero de ratón). Los datos se muestran en la Tabla 95.

15 El ARNm se degrada rápidamente en el suero en ausencia de formulación, lo que sugiere que el mejor procedimiento para que el ARNm dure más tiempo en el sistema es mediante la formulación del ARNm. Como se muestra en la Tabla 95, el ARNm se puede administrar por vía subcutánea usando solo una formulación de tampón.

20 Tabla 95. Régimen de dosificación

Grupo	Tratamiento	Vol. de dosis (μ l/ratón)	Vehículo dosificación	Promedio suero	Proteico pg/mL,
G-CSF	G-CSF	100	Tampón formulación	45	
G-CSF	Luciferasa	100	Tampón formulación	0	
G-CSF	Tampón de formulación	100	Tampón formulación	2,2	
EPO	EPO	100	Tampón formulación	72,03	
EPO	Luciferasa	100	Tampón formulación	26,7	
EPO	Tampón de formulación	100	Tampón formulación	13,05	

Ejemplo 66. Estabilidad de nanopartículas de formulaciones

25 Se evaluaron formulaciones de DLin-KC2-DMA, Teta-5-Lap, DLin-DMA, DLin-K-DMA, C12-200, DLin-MC3-DMA a una relación lípido:ARNm de 20:1 para el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y la eficiencia de encapsulación para la estabilidad a temperatura ambiente. La mayoría de las nanopartículas son estables a temperatura ambiente durante al menos un mes, como se muestra en las Tablas 96 y 97.

30 Tabla 96. Tamaño de partículas e índice de polidispersidad

Formulación #	Lípido	Tiempo			
		0 horas	24 horas	48 horas	30 días
NPA-003-4	DLin-KC2-DMA	112 nm	110 nm	103 nm	104 nm
		PDI: 0,05	PDI: 0,06	PDI: 0,09	PDI: 0,08
NPA-006-2	Teta-5-Lap	95 nm	95 nm	95 nm	100 nm
		PDI: 0,09	PDI: 0,12	PDI: 0,10	PDI: 0,11
NPA-012-1	DLin-DMA	90 nm	87 nm	89 nm	82 nm
		PDI: 0,09	PDI: 0,07	PDI: 0,08	PDI: 0,08
NPA-013-1	DLin-K-DMA	92 nm	91 nm	96 nm	91 nm
		PDI: 0,07	PDI: 0,06	PDI: 0,05	PDI: 0,06
NPA-014-1	C12-200	99 nm	98 nm	99 nm	94 nm
		PDI: 0,06	PDI: 0,09	PDI: 0,07	PDI: 0,07
NPA-015-1	DLin-MC3-DMA	106 nm	100 nm	100 nm	99 nm

Formulación #	Lípido	Tiempo			
		0 horas	24 horas	48 horas	30 días
		PDI: 0,07	PDI: 0,06	PDI: 0,05	PDI: 0,05

Tabla 97. Eficiencia de encapsulación

Formulación #	Lípido	Tiempo			
		0 horas	24 horas	48 horas	30 días
NPA-003-4	DLin-KC2-DMA	100 %	98 %	100 %	100 %
NPA-006-2	Teta-5-Lap	99 %	100 %	100 %	100 %
NPA-012-1	DLin-DMA	100 %	100 %	100 %	100 %
NPA-013-1	DLin-K-DMA	83 %	85 %	96 %	100 %
NPA-014-1	C12-200	88 %	93 %	90 %	96 %
NPA-015-1	DLin-MC3-DMA	100 %	99 %	100 %	100 %

Ejemplo 67. Administración intravítreos

- 5 ARNm modificado con mCherry (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 7; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) y ARNm modificado con luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) formulado en solución salina se administró intravítreamente en ratas como se describe en la Tabla 98. La muestra se comparó con un control de solución salina solo administrada por vía intravítreos.
- 10

Tabla 98. Cuadro de dosificación

Grupo N.º	Nivel de dosis (μ g ARN modificado/ojo)	Volumen de dosis (μ L/ojo)	Tratamiento	
			Ojo derecho (OD)	Ojo izquierdo (OS)
Control	0	5	Tampón de administración solo	Tampón de administración solo
ARN modificado en tampón de administración	10	5	mCherry	Luciferasa

- 15 La formulación se administrará en el ojo izquierdo o derecho de cada animal el día 1 mientras el animal está anestesiado. El día anterior a la administración, se aplicó dos veces pomada o solución oftálmica de gentamicina en ambos ojos. La solución o pomada oftálmica de gentamicina también se aplicó inmediatamente después de la inyección y al día siguiente de la inyección. Antes de la dosificación, se aplican gotas midriáticas (tropicamida al 1% y/o fenilefrina al 2,5%) en cada ojo.
- 20 20 18 horas después de la dosificación, los ojos que recibieron la dosis de mCherry y el tampón de administración se enclearon y cada ojo se colocó por separado en un tubo que contenía 10 ml de paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente para la fijación del tejido durante la noche. Al día siguiente, los ojos se transferirán por separado a tubos que contienen 10 ml de sacarosa al 30% y se almacenarán a 21 °C hasta que se procesen y seccionen. Las diapositivas preparadas a partir de diferentes secciones se evaluaron bajo microscopía F. Se observó expresión positiva en las diapositivas preparadas con los ojos a los que se administró ARNm modificado con mCherry y el control no mostró expresión.
- 25

Ejemplo 68. Estudio de expresión de citoquinas *in vivo*

- 30 A los ratones se les inyectaron por vía intramuscular 200 ug de ARNm modificado con G-CSF (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 6; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia) que no estaba modificado con una tapa 5', Tapa1 (sin modificar), completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina y una tapa 5', Tapa1 (Gen1) o completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina y una tapa 5', Tapa1 (tapa Gen2) o sin tapa (Gen2 sin tapar). También se analizaron controles de R-848, sacarosa al 5% y ratones no tratados. Después de 8 horas, se recogió el suero de los ratones y se analizó la expresión de interferón-alfa (IFN-alfa). Los resultados se muestran en la Tabla 99.

Tabla 99. Expresión IFN-alfa

Formulación	IFN-alfa (pg/ml)
G-CSF no modificado	67,012
G-CSF Gen1	8,867
Tapa Gen2 de G-CSF	0
Gen2 de G-CSF sin recubrir	0
R-848	40,971
5 % de sacarosa	1,493
Sin tratar	0

Ejemplo 69. Expresión *in vitro* de ARNm modificado con VEGF

Las células HEK293 se transfecaron con ARNm modificado (ARNm) VEGF-A (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 19; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) que se había complejado con Lipofectamine2000 de Invitrogen (Carlsbad, CA) a la concentración que se muestra en la Tabla 100. La expresión de la proteína se detectó mediante ELISA y la proteína (pg/ml) se muestra en la Tabla 100.

10 **Tabla 100. Expresión de proteína**

Cantidad transfectada	10 ng	2,5 ng	625 pg	156 pg	39 pg	10 pg	2 pg	610 fg
Proteína (pg/ml)	10495	10038	2321,23	189,6	0	0	0	0

Ejemplo 70. Cribado *in vitro* en células HeLa de GFP

El día antes de la transfección, se recolectaron 20.000 células HeLa (ATCC n.º CCL-2; Manassas, VA) mediante tratamiento con solución de tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) y se sembraron en un volumen total de 100 ul de medio EMEM (suplementado con FCS al 10 % y Glutamax 1x) por pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Manassas, VA). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, 37,5 ng o 75 ng de ARN modificado con proteína verde fluorescente (GFP) (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 18; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) con la modificación química descrita en la Tabla 101, se diluyeron en 10 ul de volumen final de OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). Se utilizó Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) como reactivo de transfección y se diluyeron 0,2 ul en 10 ul de volumen final de OPTI-MEM. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, ambas soluciones se combinaron y se incubaron 15 minutos adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la solución combinada de 20 ul al medio de cultivo celular de 100 ul que contenía las células HeLa y se incubó a temperatura ambiente.

Después de una incubación de 18 a 22 horas, las células que expresaban luciferasa se lisaron con 100 ul de tampón de lisis pasivo (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Se transfirieron alícuotas de los lisados a placas de 96 pocillos de poliestireno blanco opaco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). La intensidad de fluorescencia media (MFI) se determinó para cada química y se muestra en la Tabla 101.

Estos resultados demuestran que la GFP completamente modificada con N1-metilpseudouridina y 5-metilcitosina produce más proteína en las células HeLa en comparación con la otra química. Además, la dosis más alta de GFP administrada a las células dio como resultado el valor de MFI más alto.

Tabla 101. Intensidad media de fluorescencia

Química	37,5 ng	75 ng
	MFI	MFI
Sin modificaciones	97400	89500
5-metilcitosina/pseudouridina	324000	715000
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina	643000	1990000

40 Ejemplo 71. Estudios de toxicidad

A. Diseño del estudio

A ratas Sprague-Dawley (n=8, 4 machos, 4 hembras) se les administró ARNm de luciferasa modificado por inyección

(la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 16; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) como se describe en el cuadro de dosificación de la Tabla 102. A un grupo de control se le administró el tampón de formulación (Tampón F). Después de 7 días se sacrificaron las ratas.

5

Tabla 102. Cuadro de dosificación

Formulación	Dosis de ARNm (ug)	Volumen de dosis (mL)	Concentración de dosis (mg/mL)
Luciferasa	100	0,1	0
Luciferasa	300	0,1	1,0
Luciferasa	1000	0,1	3,0
Luciferasa	3x1000	0,3 (cada dosis fue de 0,1)	10
Tampón de formulación	0		10

B. Aumento de peso y consumo de alimentos

- 10 Las ratas se pesaron antes de la administración de ARNm y 7 días después de la administración. La Tabla 103 muestra el aumento de peso medio y el porcentaje de aumento de peso por grupo evaluado separados por género. Todos los animales continuaron aumentando de peso y comportándose normalmente. Cada grupo analizado consumió aproximadamente la misma cantidad de alimentos durante el transcurso del estudio.

15 **Tabla 103. Aumento de peso**

Grupo	Aumento de peso medio (g)	Aumento de peso (%)
100 ug	16,875	6,5
300 ug	22,125	8,3
1000 ug	19	6,95
3 x 1000 ug	20,375	7,7
Tampón de formulación	18,75	6,8

C. Electrolitos

- 20 Despues de 7 días se sacrificaron las ratas y se tomaron muestras para determinar electrolitos. Se analizaron los niveles de calcio, bicarbonato, potasio, fósforo, cloruro y sodio en cada grupo. Los resultados se muestran en la Tabla 104. No se observaron cambios en los electrolitos en las ratas después de 7 días.

Tabla 104. Electrolitos

Grupo	Calcio (mg/dL)	Bicarbonato (mEq/L)	Potasio (mEq/L)	Fósforo (mg/dL)	Cloruro (mEq/L)	Sodio (mEq/L)
100 ug	9,8	19,9	4,7	8,3	101,0	139,6
300 ug	9,8	23,3	4,4	8,2	100,5	139,6
1000 ug	10,6	22,5	5,2	9,1	101,0	138,8
3 x 1000 ug	10,2	22,6	4,6	8,11	100,4	138,8
Tampón de formulación	9,6	20,1	5,4	9,2	99,5	139,9

25 D.Hematología

- Despues de 7 días se sacrificaron las ratas y se tomaron muestras para determinar los niveles hematológicos. Para cada grupo se determinaron los glóbulos rojos (RBC), el hematocrito (HGT), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina (HGB), la hemoglobina corpuscular media (MCH) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC). Los resultados se muestran en la Tabla 105. No hubo cambios en el recuento sanguíneo ni en los factores de coagulación de la sangre 7 días después de la administración.

Tabla 105. Hematología

Grupo	RBC (Millón/uL)	HCT (%)	MCV (fL)	HGB (g/dL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
100 ug	7,5	44,1	58,7	14,7	19,5	3,4
300 ug	7,3	43,5	59,6	14,5	19,8	33,3
1000 ug	7,2	42,5	58,8	14,2	19,55	33,3
3 x 1000 ug	7,2	43,5	60,6	14,4	20,0	33,1
Tampón de formulación	8,0	46,6	58,0	15,5	19,3	33,4

E. Glóbulos blancos

Después de 7 días se sacrificaron las ratas y se tomaron muestras para determinar el recuento de glóbulos blancos.
 5 Se determinaron los neutrófilos (porcentaje de neutrófilos segmentados), monocitos, basófilos, linfocitos, eosinófilos y glóbulos blancos (WBC) para cada grupo. Los resultados se muestran en la Tabla 106. En la Tabla 106, "NT" significa no probado. 7 días después de la administración no hubo aumento de glóbulos blancos, lo que sugiere que no hubo inflamación.

Tabla 106. Glóbulo blanco

Grupo	Neutrófilo (% NEU-SEG)	Monocitos (%) MON)	Basófilos (%) BASO)	Linfocitos (% LYM)	Eosinófilos (%) EOS)	WBC (Miles/uL)
100 ug	10,6	2,0	0,4	85,9	1,3	14
300 ug	12,0	2,8	0,4	83,6	1,0	10,2
1000 ug	12,8	2,3	NT	83,0	1,5	10,7
3 x 1000 ug	11,6	2,0	0,1	85,5	0,9	10,9
Tampón de formulación	16,6	2,3	0,9	79,6	0,9	13,0

F. Química del suero

Después de 7 días se sacrificaron las ratas y se tomaron muestras para determinar la química del suero. Para cada grupo se determinó la fosfatasa alcalina (ALP), aspartato transaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT) y creatina fosfoquinasa (CPK). Los resultados se muestran en la Tabla 107.

Tabla 107. Química de suero

Grupo	ALP (IU/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	CPK (IU/L)
100 ug	144,4	198,3	60,8	488,1
300 ug	169,5	200,3	49,3	968,3
1000 ug	150,5	189,8	51,5	744
3 x 1000 ug	152,0	14,3	45,9	481,1
Tampón de formulación	183	170,4	62,8	589,8

G. Proteínas del hígado

Después de 7 días se sacrificaron las ratas y se tomaron muestras para determinar los niveles de proteína en el hígado. Se determinó el nivel de albúmina, globulina y proteína total para cada grupo. Los resultados se muestran en la Tabla 108. No se observaron cambios en la producción de enzimas hepáticas o proteínas hepáticas 7 días después de la administración con el ARNm modificado.

Tabla 108. Hematología

Grupo	Albúmina (g/dL)	Globulina (g/dL)	Proteína total (g/dL)
100 ug	3,3	2,5	5,8
300 ug	3,2	2,4	5,6
1000 ug	3,2	2,7	5,9
3 x 1000 ug	3,4	2,6	6,0

Grupo	Albúmina (g/dL)	Globulina (g/dL)	Proteína total (g/dL)
Tampón de formulación	3,6	2,6	6,2

H. Conclusiones

- 5 Del análisis de las ratas 7 días después de la administración con el ARNm modificado, la administración de dosis altas de ARNm no resultó en efectos adversos. Dosis tan altas como 30 veces la dosis efectiva parecen estar seguras a partir de este análisis. La histopatología mostró solo una inflamación mínima en el sitio de la inyección y el sitio de la inyección mostró solo cambios consistentes con la inyección y nada que sugiera problemas relacionados con la dosis. Además, no había posibilidad de que las enzimas musculares sugirieran que había daño muscular.

10 Ejemplo 72. Condiciones de almacenamiento para ARN modificado

A. Orgánicos

- 15 Para evaluar la capacidad del ARNm para resistir un entorno orgánico, el ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se almacenó a temperatura ambiente en soluciones de etanol, metanol o diclorometano a una concentración de 1 mg/ml. Las muestras se recogieron a 1 hora, 6 horas y 1 día. La muestra se diluyó con agua a 200 ng/ul y se incubó durante la noche a 20 temperatura ambiente en una campana extractora para evaporar el solvente orgánico. Las muestras de control se completaron en paralelo con el ARNm en agua (control de agua, orgánico). El ARNm fue estable a temperatura ambiente durante 1 día en cada una de las tres soluciones, según se determinó analizando muestras en un bioanalizador.

25 B. Solvente acuoso

- Se añadió ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con pseudouridina y 5-metilcitosina) a 3 tampones diferentes y agua para evaluar el efecto de solventes acuosos sobre la estabilidad del ARNm. Se añadió ARNm al tampón de citrato (pH 3, ácido cítrico 100 mM), tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7.4, fosfato 6,7 mM y cloruro de sodio 154 mM), tampón TE (pH 8, ácido clorhídrico Tris 10 mM y ácido etilendiaminotetraacético 1 mM) o agua (pH 5.5, agua para inyección (WFI)) a 1 mg/ml. Las muestras se recogieron a 1 hora, 6 horas y 1 día y se diluyeron con agua a una concentración de 200 ng/ul. Las muestras de control se completaron en paralelo con ARNm en agua (control de agua, acuoso). La incubación del ARNm en el tampón PBS, el tampón TE y el agua no afectó a la integridad del ARNm después de 1 día. Las muestras incubadas en citrato no fueron detectables por el bioanalizador.

- En estudios adicionales para evaluar el tampón de citrato, tampón de citrato a un pH de 2, 3 y 4, cada uno con citrato 10 mM y 1 mg/ml de ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificados con pseudouridina y 5-metilcitosina) se evaluaron. A un pH de 2, se detectó visualmente la precipitación y el bioanalizador no detectó ARNm por debajo de un pH de 4. Cuando se comparó con el tampón de fosfato, no se detectó ARNm en muestras con pH bajo y la precipitación fue visible en muestras de tampón de fosfato que tenían un pH de 2 .

45 C. pH

- Para estudiar los efectos del pH sobre la estabilidad del ARNm, el ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificada con pseudouridina y 5-metilcitosina) se almacenó a temperatura ambiente en tampones acuosos que tenían un pH de 5.8, 6.5 o 7.2. Las muestras se recogieron 1 hora, 1 día y 1 semana después de añadir el ARNm a la muestra de pH. Después de la recolección, las muestras se incubaron a una concentración de 1 mg/ml y, a continuación, se diluyeron a 200 ng/ul con agua antes de congelarlas y caracterizarlas mediante un bioanalizador. El ARNm se mantuvo estable después de 1 semana de almacenamiento a temperatura ambiente en el intervalo de pH evaluado de 5.8-7.2.

55 D. Congelación/descongelación y liofilización

- Para evaluar el efecto de los ciclos de congelación/descongelación en la estabilidad del ARNm, el ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) en el tampón de formulación se sometió a numerosos ciclos de congelación/descongelación. Se encontró que el ARNm era estable durante al menos 18 ciclos.

Además, el ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16 de ARNm; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se sometió a 3 rondas de liofilización para probar la estabilidad del ARNm. Se añadió ARNm al agua y se recogieron muestras después de cada una de las 3 rondas de liofilización. El ARNm seco se diluyó con agua para alcanzar una concentración de 1 mg/ml. Las muestras se almacenaron congeladas hasta la caracterización del bioanalizador a 200 ng/ul. Las muestras de control se completaron en paralelo con las formulaciones de ARNm y agua y siguieron los mismos ciclos de congelación y descongelación. Se encontró que el ARNm era estable después de 3 ciclos de liofilización cuando se analizó mediante caracterización con bioanalizador a 200 ng/ul.

10 E. Centrifugación

Para evaluar los efectos de la centrifugación en la integridad del ARNm, ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; 5-metilcitosina y pseudouridina) en agua a 1 mg /ml se expuso a 10 ciclos de 10k RPM (13,3k xg) durante 10 minutos a 4 °C. Las muestras de ARNm y agua se almacenaron a 4 °C como control durante la centrifugación. Despues de 10 ciclos de centrifugación, el ARNm aún era estable cuando se analizó mediante caracterización con bioanalizador a 200 ng/ul.

20 F. Transfección *in vitro* después del almacenamiento

El día antes de la transfección, se recolectaron 20.000 células HeLa (ATCC n.º CCL-2; Manassas, VA) mediante tratamiento con solución de tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) y se sembraron en un volumen total de 100 ul de medio EMEM (suplementado con FCS al 10 % y Glutamax 1x) por pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Manassas, VA). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se diluyeron 250 ng de ARNm de luciferasa de las formulaciones de las muestras de disolvente orgánico y acuoso liofilizado, centrifugado en un volumen final de 10 ul de OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). Se utilizó Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) como reactivo de transfección y se diluyeron 0,2 ul en un volumen final de 10 ul de OPTI-MEM. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, ambas soluciones se combinaron y se incubaron 15 min más a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 20 ul de la solución combinada a 100 ul de medio de cultivo celular que contenía las células HeLa. A continuación, las placas se incubaron como se ha descrito anteriormente.

35 Despues de 18 h a 22 h de incubación, las células que expresaban luciferasa se lisaron con 100 ul de tampón de lisis pasiva (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Se transfirieron aliquotas de los lisados a placas de 96 pocillos de poliestireno blanco opaco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de unas 200 unidades relativas de luz por pocillo. El lector de placas fue un BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT).

40 También se evaluaron controles de transfección simulada (reactivo de transfección solo), control de ARNm de luciferasa en agua y sin tratar. Las células se recolectaron y el promedio de bioluminiscencia (en unidades relativas de luz, RLU) para cada señal se muestra en la Tabla 109. La transfección de estas muestras confirmó que la liofilización, la centrifugación, los solventes orgánicos y los solventes acuosos, excepto el tampón de citrato, no afectaron a la actividad del ARNm de luciferasa. El tampón de citrato mostró una actividad reducida después de la transfección.

Tabla 109. Bioluminiscencia

Muestra	Bioluminiscencia (RLU)
1 liofilización	2832350
1 control de liofilización	3453250
2 liofilizaciones	2480000
2 control de liofilizaciones	3716130
3 liofilizaciones	1893960
3 control de liofilizaciones	3009020
Centrifugación, 10 ciclos	3697590
Control de centrifugación	5472920
Etanol, 1 día	4214780
Metanol, 1 día	2834520
Diclorometano, 1 día	3017890
Control de agua, orgánico, 1 día	2641450

Muestra	Bioluminiscencia (RLU)
Tampón de citrato, 1 hora	280160
Tampón de PBS, 1 hora	2762050
Tampón de TE, 1 hora	3141250
Control de agua, acuoso, 1 hora	3394000
Tampón de citrato, 1 día	269790
Tampón de PBS, 1 día	4084330
Tampón de TE, 1 día	5344400
Control de agua, acuoso, 1 día	3579270
Sin tratar	5580
Transfección de prueba	7560
Control de ARNm de luciferasa	4950090

Ejemplo 73. Homogeneización

Diferentes soluciones de ARNm de luciferasa (como se describe en la Tabla 110 donde "X" se refiere a la solución que contiene ese componente) (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) para probar el porcentaje de rendimiento de las diferentes soluciones, la integridad del ARNm por bioanalizador y la expresión proteica del ARNm por transfección *in vitro*. Las soluciones de ARNm se prepararon en agua, tampón TE 1x a 4 mg/ml como se indica en la Tabla 110, y se añadieron a diclorometano (DCM) o DCM que contenía 200 mg/ml de polí(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Lactel, Cat# B6010-2, viscosidad inherente 0,55-0,75, 50:50 LA:GA) para lograr una concentración final de ARNm de 0,8 mg/ml. Las soluciones que requerían homogeneización se homogeneizaron durante 30 segundos a velocidad 5 (aproximadamente 19.000 rpm) (Homogeneizador IKA Ultra-Turrax, T18). Las muestras de ARNm en agua, diclorometano y ácido polí(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) no fueron recuperables (NR). Todas las muestras, excepto las muestras NR, mantuvieron la integridad del ARNm según lo determinado por el bioanalizador (Bio-rad Experion).

El día antes de la transfección, se recolectaron 20.000 células HeLa (ATCC n.º CCL-2; Manassas, VA) mediante tratamiento con solución de tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) y se sembraron en un volumen total de 100 ul de medio EMEM (suplementado con FCS al 10 % y Glutamax 1x) por pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Manassas, VA). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO2 al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se diluyeron 250 ng de ARNm de luciferasa de las muestras recuperables en un volumen final de 10 ul de OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). Se utilizó Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) como reactivo de transfección y se diluyeron 0,2 ul en un volumen final de 10 ul de OPTI-MEM. Despues de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, ambas soluciones se combinaron y se incubaron 15 minutos adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 20 ul de la solución combinada a 100 ul de medio de cultivo celular que contenía las células HeLa. A continuación, las placas se incubaron como se ha descrito anteriormente. También se evaluaron controles de ARNm de luciferasa (ARNm de luciferasa formulado en solución salina) (Control) y células no tratadas (Sin tratar). Las células se recolectaron y el promedio de bioluminiscencia (en fotones/segundo) (biolum. (p/s)) para cada señal también se muestra en la Tabla 110. Todas las muestras recuperables mostraron actividad de ARNm de luciferasa cuando se analizaron.

Después de 18 a 22 horas de incubación, las células que expresaban luciferasa se lisaron con 100 ul de tampón de lisis pasiva (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Se transfirieron alícuotas de los lisados a placas de 96 pocillos de poliestireno blanco opaco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de unas 200 unidades relativas de luz por pocillo. El lector de placas fue un BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT).

Las células se recolectaron y el promedio de bioluminiscencia (en unidades relativas de luz, RLU) (biolum. (RLU)) para cada señal también se muestra en la Tabla 110. Todas las muestras recuperables mostraron actividad de ARNm de luciferasa cuando se analizaron.

Tabla 110. Soluciones

Solución N.º	Agua	1x Tampón de TE	DCM	DCM/PLG A	Homogeneizador	Rendimiento (%)	Biolum. (RLU)
1	X					96	5423780
2		X			X	95	4911950
3	X				X	92	2367230

Solución N.º	Agua	1x Tampón de TE	DCM	DCM/PLG A	Homogeneizador	Rendimiento (%)	Biolum. (RLU)
4		X			X	90	4349410
5	X		X		X	66	4145340
6		X	X		X	71	3834440
7	X			X	X	NR	n/a
8		X		X	X	24	3182080
9	X			X		NR	n/a
10		X		X		79	3276800
11	X		X			79	5563550
12		X	X			79	4919100
Control							2158060
Sin tratar							3530

Ejemplo 74. Evaluación de agua y tampón de TE

El ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se reconstituyó en agua o tampón de TE como se describe en la Tabla 111 y, a continuación, formulado en microesferas de PLGA. Las microesferas de PLGA se sintetizaron usando los procedimientos de emulsificación doble agua/aceite/agua conocidos en la técnica usando PLGA (Lactel, Cat# B6010-2, viscosidad inherente 0,55-0,75, 50:50 LA:GA), alcohol polivinílico (PVA) (Sigma, Cat# 348406-25G, MW 13-23k) diclorometano y agua. Brevemente, se añadieron de 0,2 a 0,6 ml de ARNm en agua o tampón de TE a una concentración de 2 a 6 mg/ml (W1) a 2 ml de PLGA disueltos en diclorometano (DCM) (O1) a una concentración de 100 mg/ml de PLGA. La emulsión W1/O1 se homogeneizó (Homogeneizador IKA Ultra-Turrax, T18) durante 30 segundos a velocidad 5 (~19.000 rpm). A continuación, se añadió la emulsión W1/O1 a 250 ml de PVA al 1 % (W2) y se homogeneizó durante 1 minuto a velocidad 5 (~19.000 rpm). Las formulaciones se dejaron en agitación durante 3 horas, a continuación se pasaron por un colador de malla de nailon de 100 µm (Fisherbrand Cell Strainer, Cat # 22-363-549) para eliminar los agregados más grandes y finalmente se lavaron por centrifugación (10 min, 9250 rpm, 4 °C). Se descartó el sobrenadante y los gránulos de PLGA se resuspendieron en 5-10 ml de agua, lo que se repitió 2x. Las formulaciones lavadas se congelaron en nitrógeno líquido y, a continuación, se liofilizaron durante 2-3 días. Después de la liofilización, se pesaron ~10 mg de PLGA MS en tubos eppendorf de 2 ml y se deformularon agregando 1 ml de DCM y dejando que las muestras se agitaran durante 2 a 6 horas. El ARNm se extrajo de las microesferas de PLGA deformuladas añadiendo 0,5 ml de agua y agitando la muestra durante la noche. El ARNm de luciferasa no formulado en agua o tampón de TE (controles de deformulación) se añadió a DCM y pasó por el proceso de deformulación para usarse como control en el ensayo de transfección.

El día antes de la transfección, se recolectaron 20.000 células HeLa (ATCC n.º CCL-2; Manassas, VA) mediante tratamiento con solución de tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) y se sembraron en un volumen total de 100 ul de medio EMEM (suplementado con FCS al 10 % y Glutamax 1x) por pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Manassas, VA). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO2 al 5 % durante la noche. Al día siguiente, se diluyeron 100 ng de las muestras de ARNm de luciferasa deformulado en un volumen final de 10 ul de OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). Se utilizó Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) como reactivo de transfección y se diluyeron 0,2 ul en un volumen final de 10 ul de OPTI-MEM. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, ambas soluciones se combinaron y se incubaron 15 minutos adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 20 ul de la solución combinada a 100 ul de medio de cultivo celular que contenía las células HeLa. A continuación, las placas se incubaron como se ha descrito anteriormente.

Después de 18 a 22 horas de incubación, las células que expresaban luciferasa se lisaron con 100 ul de tampón de lisis pasiva (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Se transfirieron alícuotas de los lisados a placas de 96 pocillos de poliestireno blanco opaco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de unas 200 unidades relativas de luz por pocillo. El lector de placas fue un BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT). Para determinar la actividad del ARNm de luciferasa de cada formulación, las unidades relativas de luz (RLU) para cada formulación se dividieron por las RLU del control de deformulación de ARNm apropiado (ARNm en agua o tampón de TE). La Tabla 111 muestra la actividad del ARNm de luciferasa. La actividad del ARNm de luciferasa en las formulaciones de microesferas de PLGA (Form.) mejoró sustancialmente mediante la formulación en tampón de TE frente a agua.

Tabla 111. Formulaciones

Form.	Conc. De ARNm (mg/ml)	Volumen de solvente W1 (ul)	ARNm total (ug)	Carga teórica de ARNm (% en peso)	Carga real de ARNm (% en peso)	Solvente W1	Actividad (% de control de deformulación)
PLGA A	4	400	1600	0,80	0,14	Agua	12,5 %
PLGA B	4	200	800	0,40	0,13	Agua	1,3 %
PLGA C	4	600	2400	1,20	0,13	Agua	12,1 %
PLGA D	2	400	800	0,40	0,07	Agua	1,3 %
PLGA E	6	400	2400	1,20	0,18	Tampón de TE	38,9 %
PLGA F	4	400	1600	0,80	0,16	Tampón de TE	39,7 %
PLGA G	4	400	1600	0,80	0,10	Tampón de TE	26,6 %

Ejemplo 75. Modificaciones químicas en ARNm

El día antes de la transfección, se recolectaron 20.000 células HeLa (ATCC n. ° CCL-2; Manassas, VA) mediante tratamiento con solución de tripsina-EDTA (Life Technologies, Grand Island, NY) y se sembraron en un volumen total de 100 ul de medio EMEM (suplementado con FCS al 10 % y Glutamax 1x) por pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Manassas, VA). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, 83 ng de ARN modificado con luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos no mostrada en secuencia; tapa 5', Tapa1) con la modificación química descrita en la Tabla 112 se diluyeron en volumen final de 10ul de OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). Se utilizó Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) como reactivo de transfección y se diluyeron 0,2 ul en un volumen final de 10 ul de OPTI-MEM. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, ambas soluciones se combinaron y se incubaron 15 minutos más a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 20 ul de solución combinada a 100 ul de medio de cultivo celular que contenía las células HeLa y se incubaron a temperatura ambiente.

Después de 18 a 22 horas de incubación, las células que expresaban luciferasa se lisaron con 100 ul de tampón de lisis pasiva (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Las alícuotas de los lisados se transfirieron a placas de 96 pocillos de poliestireno opaco blanco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). Los volúmenes de lisado se ajustaron o diluyeron hasta que no se detectaron más de 2 millones de unidades de luz relativa (RLU) por pocillo para las muestras que producían la señal más fuerte y las RLU para cada química analizada se muestran en la Tabla 44. El lector de placas fue un BioTek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de aproximadamente 200 unidades de luz relativa por pocillo.

Tabla 112. Modificaciones químicas

Muestra	RLU
Sin tratar	336
Luciferasa no modificada	33980
5-metilcitosina y pseudouridina	1601234
5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina	421189
25 % de citosinas reemplazadas por 5-metilcitosina y 25 % de uridinas reemplazadas por 2-tiouridina	222114
N1-metilpseudouridina	3068261
Pseudouridina	140234
N4-Acetylctidina	1073251
5-metoxiuridina	219657
5-Bromouridina	6787
N4-Acetylctidina y N1-metilpseudouridina	976219
5-metilcitosina y 5-metoxiuridina	66621
5-metilcitosina y 2'fluorouridina	11333

Ejemplo 76. Administración intramuscular y subcutánea

ARNm modificado con luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (5mC/pU), completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (5mC/N1mpU), totalmente modificada con pseudouridina (pU), totalmente modificada con N1-metilpseudouridina (N1mpU) o modificada donde el 25 % de las citosinas se reemplazan con 5-metilcitosina y el 25 % de las uridinas se reemplazan con 2-tiouridina (5mC/s2U) formulada en PBS (pH 7.4) se administró a ratones Balb-C por vía intramuscular o subcutánea a una dosis de 2,5 mg/kg. Se tomaron imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas y 144 horas para administración intramuscular y 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas y 120 horas para administración subcutánea. Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón.

El flujo total promedio (fotones/segundo) para la administración intramuscular se muestra en la Tabla 113 y el flujo total promedio (fotones/segundo) para la administración subcutánea se muestra en la Tabla 114. La señal de fondo fue 3,79E+05 (p/s). La expresión máxima para la administración intramuscular se observó entre las 24 y las 48 horas para toda la química y la expresión aún se detectaba a las 144 horas. Para la administración subcutánea, la expresión máxima se observó a las 2-8 horas y la expresión se detectó a las 72 horas.

Tabla 113. Administración intramuscular

	5mC/pU	5mC/N1mpU	5mC/s2U	pU	N1mpU
	Flujo (p/s)				
2 horas	1,98E+07	4,65E+06	4,68E+06	2,33E+06	3,66E+07
8 horas	1,42E+07	3,64E+06	3,78E+06	8,07E+06	7,21E+07
24 horas	2,92E+07	1,22E+07	3,35E+07	1,01E+07	1,75E+08
48 horas	2,64E+07	1,01E+07	5,06E+07	7,46E+06	3,42E+08
72 horas	2,18E+07	8,59E+06	3,42E+07	4,08E+06	5,83E+07
96 horas	2,75E+07	2,70E+06	2,38E+07	4,35E+06	7,15E+07
120 horas	2,19E+07	1,60E+06	1,54E+07	1,25E+06	3,87E+07
144 horas	9,17E+06	2,19E+06	1,14E+07	1,86E+06	5,04E+07

Tabla 114. Administración subcutánea

	5mC/pU	5mC/N1mpU	5mC/s2U	pU	N1mpU
	Flujo (p/s)				
2 horas	5,26E+06	4,54E+06	9,34E+06	2,43E+06	2,80E+07
8 horas	2,32E+06	8,75E+05	8,15E+06	2,12E+06	3,09E+07
24 horas	2,67E+06	5,49E+06	3,80E+06	2,24E+06	1,48E+07
48 horas	1,22E+06	1,77E+06	3,07E+06	1,58E+06	1,24E+07
72 horas	1,12E+06	8,00E+05	8,53E+05	4,80E+05	2,29E+06
96 horas	5,16E+05	5,33E+05	4,30E+05	4,30E+05	6,62E+05
120 horas	3,80E+05	4,09E+05	3,21E+05	6,82E+05	5,05E+05

Ejemplo 77. Estudio de bomba osmótica

Antes de la implantación, se carga una bomba osmótica (ALZET® Osmotic Pump 2001D, DURECT Corp. Cupertino, CA) con 0,2 ml de PBS 1X (pH 7.4) (bomba cargada con PBS) o 0,2 ml de ARNm modificado con luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificada con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina) a 1 mg/ml en PBS 1x (pH 7.4) (bomba cargada con luciferasa) e incubada durante la noche en PBS 1x (pH 7.4) a 37 °C.

A los ratones Balb-C (n=3) se les implanta por vía subcutánea la bomba cargada con PBS o la bomba cargada con luciferasa y se obtienen imágenes a las 2 horas, 8 horas y 24 horas. Como control, se implanta una bomba cargada con PBS por vía subcutánea y se inyecta a los ratones por vía subcutánea ARNm modificado con luciferasa en PBS 1x (bomba cargada con PBS; luciferasa SC) o no se implanta una bomba osmótica y se inyecta a los ratones por vía subcutánea ARNm modificado con luciferasa en 1 x PBS (SC Luciferasa). Las formulaciones de luciferasa se

describen en la Tabla 115

Tabla 115. Formulaciones de luciferasa

Grupo	Vehículo	Conc (mg/ml)	Vol. Iny.(ul)	Cant.(ug)	Dosis (mg/kg)
Bomba cargada con PBS; Luciferasa SC	PBS	1,00	50	50	2,5
Bomba cargada de luciferasa	PBS	1,00	-	200	10,0
Bomba cargada con PBS	PBS	-	-	-	-
Luciferasa SC	PBS	1,00	50	50	2,5

5 Ejemplo 78. Estudio de bomba osmótica externa

Se carga una bomba osmótica externa (ALZET® Osmotic Pump 2001D, DURECT Corp. Cupertino, CA) con 0,2 ml de PBS 1X (pH 7.4) (bomba cargada con PBS) o 0,2 ml de ARNm modificado con luciferasa (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina) a 1 mg/ml en 1x PBS (pH 7.4) (bomba cargada con luciferasa) y se incubó durante la noche en 1x PBS (pH 7.4) a 37 °C.

Utilizando un catéter conectado a la bomba externa cargada con PBS o a la bomba cargada con luciferasa, se administra la formulación a ratones Balb-C (n=3). Se obtienen imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas y 24 horas. Como control, se usa una bomba externa cargada con PBS y a los ratones se les inyecta por vía subcutánea ARNm modificado con luciferasa en PBS 1x (bomba cargada con PBS; luciferasa SC) o no se usa la bomba externa y a los ratones solo se les inyecta por vía subcutánea ARNm modificado con luciferasa en 1x PBS (SC Luciferasa). Veinte minutos antes de la formación de imágenes, se inyecta a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesian y las imágenes se adquieren con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se mide como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Las formulaciones de luciferasa se describen en la Tabla 116 y el flujo total promedio (fotones/segundo).

Tabla 116. Formulaciones de luciferasa

Grupo	Vehículo	Conc (mg/ml)	Vol. Iny. (ul)	Cant. (ug)	Dosis (mg/kg)
Bomba cargada con PBS; Luciferasa SC	PBS	1,00	50	50	2,5
Bomba cargada con luciferasa	PBS	1,00	-	200	10,0
Bomba cargada con PBS	PBS	-	-	-	-
Luciferasa SC	PBS	1,00	50	50	2,5

25 Ejemplo 79. Estudio de sellador de fibrina

El sellador de fibrina, tal como Tisseel (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL), está compuesto de fibrinógeno y trombina en una jeringa de dos cilindros. Al mezclar, el fibrinógeno se convierte en fibrina para formar un coágulo de fibrina en alrededor de 10 a 30 segundos. Este coágulo puede imitar el mecanismo de coagulación natural del cuerpo. Además, un hidrogel de fibrina es una estructura tridimensional que puede usarse potencialmente en la administración de liberación sostenida. Actualmente, el sellador de fibrina está aprobado para su aplicación en hemostasia y sellado para reemplazar las técnicas quirúrgicas convencionales tales como sutura, ligadura y cauterización.

35 Los componentes de trombina y fibrinógeno se cargaron por separado en una jeringa de doble cilindro. A ratones Balb-C (n=3) se les inyectaron por vía subcutánea 50 ul de fibrinógeno, 50 ul de trombina y también se les inyectó en el mismo sitio ARNm de luciferasa modificado (la secuencia de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina) (Tisseel+Luciferasa), 50 ul de fibrinógeno y 50 ul de trombina (Tisseel) o ARNm de luciferasa modificado (Luciferasa). La inyección de fibrinógeno y trombina se realizó simultáneamente utilizando la jeringa de doble cilindro. La inyección subcutánea de luciferasa se realizó 15 minutos después de la inyección de fibrinógeno/trombina para permitir la polimerización del hidrogel de fibrina (grupo Tisseel + Luciferasa). También se evaluó un grupo de control de ratones no tratados. Se tomaron imágenes de los ratones a las 5 horas y a las 24 horas. Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesieron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Las formulaciones de luciferasa se describen en la Tabla 117 y el flujo total promedio (fotones/segundo) se muestra en la Tabla 118. Se encontró que el sellador de fibrina no interfiere con la formación de imágenes y la inyección de luciferasa y Tisseel mostró expresión de luciferasa.

Tabla 117. Formulaciones de luciferasa

Grupo	Vehículo	Conc (mg/ml)	Vol. Iny. (ul)	Cant. (ug)	Dosis (mg/kg)
Tisseel+ Luciferasa	PBS	1,00	50	50	2,5
Tisseel	-	-	-	-	-
Luciferasa	PBS	1,00	50	50	2,5
Sin tratar	-	-	-	-	-

Tabla 118. Flujo total

Grupo	5 horas	24 horas
	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
Tisseel+Luciferasa	4,59E+05	3,39E+05
Tisseel	1,99E+06	1,06E+06
Luciferasa	9,94E+05	7,44E+05
Sin tratar	3,90E+05	3,79E+05

5 Ejemplo 80. Estudio de sellador de ARNm que contiene fibrina

A. ARNm modificado y cloruro de calcio

Antes de la reconstitución, el ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina o completamente modificado con N1-metilpseudouridina se añade al cloruro de calcio. A continuación, el cloruro de calcio se usa para reconstituir la trombina. El fibrinógeno se reconstituye con una solución de inhibidor de fibrinólisis según las instrucciones del fabricante. La trombina reconstituida que contiene ARNm modificado y fibrinógeno se carga en una jeringa de doble cilindro. A los ratones se les inyecta por vía subcutánea 50 ul de fibrinógeno y 50 ul de trombina que contiene ARNm modificado o se les inyectan 50 ul de PBS que contiene una dosis equivalente de ARNm de luciferasa modificada. También se evalúa un grupo de control de ratones no tratados. Se toman imágenes de los ratones a intervalos predeterminados para determinar el flujo total medio (fotones/segundo).

20 B. ARNm modificado formulado con nanopartículas lipídicas y cloruro de calcio

Antes de la reconstitución, el ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina o completamente modificado con N1-metilpseudouridina se formula en una nanopartícula lipídica que se añade al cloruro de calcio. A continuación, el cloruro de calcio se usa para reconstituir la trombina. El fibrinógeno se reconstituye con una solución de inhibidor de fibrinólisis según las instrucciones del fabricante. La trombina reconstituida que contiene ARNm modificado y fibrinógeno se carga en una jeringa de doble cilindro. A los ratones se les inyecta por vía subcutánea 50 ul de fibrinógeno y 50 ul de trombina que contiene ARNm modificado o se les inyectan 50 ul de PBS que contiene una dosis equivalente de ARNm de luciferasa modificada. También se evalúa un grupo de control de ratones no tratados. Se toman imágenes de los ratones a intervalos predeterminados para determinar el flujo total medio (fotones/segundo).

C. ARNm modificado y fibrinógeno

35 Antes de la reconstitución, el ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina o completamente modificado con N1-metilpseudouridina se añade a la solución inhibidora de la fibrinólisis. La solución inhibidora de la fibrinólisis se usa a continuación para reconstituir el fibrinógeno. La trombina se reconstituye con la solución de cloruro de calcio según las instrucciones del fabricante. El fibrinógeno reconstituido que contiene ARNm modificado y trombina se carga en una jeringa de doble cilindro. A los ratones se les inyectan por vía subcutánea 50 ul de trombina y 50 ul de ARNm modificado que contiene fibrinógeno o se les inyectan 50 ul de PBS que contiene una dosis equivalente de ARNm de luciferasa modificada. También se evalúa un grupo de control de ratones no tratados. Se toman imágenes de los ratones a intervalos predeterminados para determinar el flujo total medio (fotones/segundo).

45 D. ARNm modificado formulado con nanopartículas lipídicas y fibrinógeno

Antes de la reconstitución, el ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina o completamente modificado con N1-metilpseudouridina se

formula en una nanopartícula lipídica que se añade a la solución inhibidora de fibrinólisis. La solución inhibidora de fibrinólisis se usa a continuación para reconstituir el fibrinógeno. La trombina se reconstituye con la solución de cloruro de calcio según las instrucciones del fabricante. El fibrinógeno reconstituido que contiene ARNm modificado y trombina se carga en una jeringa de doble cilindro. A los ratones se les inyectan por vía subcutánea 50 ul de trombina y 50 ul de ARNm modificado que contiene fibrinógeno o se les inyectan 50 ul de PBS que contiene una dosis equivalente de ARNm de luciferasa modificado. También se evalúa un grupo de control de ratones no tratados. Se toman imágenes de los ratones a intervalos predeterminados para determinar el flujo total medio (fotones/segundo).

E. ARNm modificado y trombina

Antes de la reconstitución, el ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina o completamente modificado con N1-metilpseudouridina se añade a la trombina reconstituida después de reconstituirla con el cloruro de calcio según las instrucciones del fabricante. La solución inhibidora de la fibrinólisis se usa a continuación para reconstituir el fibrinógeno según las instrucciones del fabricante. El fibrinógeno y la trombina reconstituidos que contienen ARNm modificado se cargan en una jeringa de doble cilindro. A los ratones se les inyecta por vía subcutánea 50 ul de trombina que contiene ARNm modificado y 50 ul de fibrinógeno o se les inyectan 50 ul de PBS que contiene una dosis equivalente de ARNm de luciferasa modificado. También se evalúa un grupo de control de ratones no tratados. Se toman imágenes de los ratones a intervalos predeterminados para determinar el flujo total medio (fotones/segundo).

F. ARNm modificado formulado con nanopartículas lipídicas y trombina

Antes de la reconstitución, el ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina o completamente modificado con N1-metilpseudouridina se formula en una nanopartícula lipídica que se añade a la trombina reconstituida después de reconstituirla con el cloruro de calcio según las instrucciones del fabricante. La solución inhibidora de la fibrinólisis se usa a continuación para reconstituir el fibrinógeno según las instrucciones del fabricante. El fibrinógeno y la trombina reconstituidos que contienen ARNm modificado se cargan en una jeringa de doble cilindro. A los ratones se les inyecta por vía subcutánea 50 ul de trombina que contiene ARNm modificado y 50 ul de fibrinógeno o se les inyectan 50 ul de PBS que contiene una dosis equivalente de ARNm de luciferasa modificado. También se evalúa un grupo de control de ratones no tratados. Se toman imágenes de los ratones a intervalos predeterminados para determinar el flujo total medio (fotones/segundo).

Ejemplo 81. Formulación de lípidos catiónicos de ARNm modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina

Se formuló ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina en los lípidos catiónicos descritos en la Tabla 119. Las formulaciones se administraron por vía intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) a ratones Balb-C a una dosis de 0,05 mg/kg.

Tabla 119. Formulaciones de lípidos catiónicos

Formulación	NPA-126-1	NPA-127-1	NPA-128-1	NPA-129-1	111612-B
Lípido	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
Lípido/relación de ARNm (en peso/en peso)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
Tamaño medio	122 nm	114 nm	153 nm	137 nm	223.2 nm
	PDI: 0,13	PDI: 0,10	PDI: 0,17	PDI: 0,09	PDI: 0,142
Zeta a pH 7.4	-1,4 mV	-0,5 mV	-1,4 mV	2,0 mV	-3,09 mV
Encaps. (RiboGr)	95 %	77 %	69 %	80 %	64 %

Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Se tomaron imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas y 24 horas después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y formulación de lípidos catiónicos. El flujo de fondo fue de aproximadamente 4,17E+05 p/s. Los resultados de la formación de imágenes se muestran en la Tabla 120. En la Tabla 120, "NT" significa no probado.

Tabla 120. Flujo

Vía	Punto de tiempo	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
		Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
I.V.	2 horas	1,92E+08	2,91E+08	1,08E+08	2,53E+07	8,40E+06
I.V.	8 horas	1,47E+08	2,13E+08	3,72E+07	3,82E+07	5,62E+06
I.V.	24 horas	1,32E+07	2,41E+07	5,35E+06	4,20E+06	8,97E+05
I.M.	2 horas	8,29E+06	2,37E+07	1,80E+07	1,51E+06	NT
I.M.	8 horas	5,83E+07	2,12E+08	2,60E+07	1,99E+07	NT
I.M.	24 horas	4,30E+06	2,64E+07	3,01E+06	9,46E+05	NT
S.C.	2 horas	1,90E+07	5,16E+07	8,91E+07	4,66E+06	9,61E+06
S.C.	8 horas	7,74E+07	2,00E+08	4,58E+07	9,67E+07	1,90E+07
S.C.	24 horas	7,49E+07	2,47E+07	6,96E+06	6,50E+06	1,28E+06

Ejemplo 82. Estudio intravenoso de nanopartículas lipídicas

- 5 El ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se formuló en una nanopartícula lipídica que contenía 50 % de DLin-MC3-DMA O DLin-KC2-DMA como se describe en la Tabla 121, 38,5 % de colesterol, 10 % de DSPC y 1,5 % de PEG. La formulación se administró por vía intravenosa (I.V.) a ratones Balb-C a una dosis de 0,5 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,005 mg/kg o 0,0005 mg/kg. Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, 10 los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón.

Tabla 121. Formulaciones

Formulación	NPA-098-1	NPA-100-1
Lípido	DLin-KC2-DMA	DLin-MC3-DMA
Lípido/relación de ARNm (en peso/en peso)	20:1	20:1
Tamaño medio	135 nm	152 nm
	PDI: 0.08	PDI: 0.08
Zeta a pH 7.4	-0,6 mV	-1,2 mV
Encaps. (RiboGr)	91 %	94 %

- 15 Para DLin-KC2-DMA, se tomaron imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 72 horas, 96 horas y 168 horas después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y lípido catiónico. formulación. El flujo de fondo fue de aproximadamente 3,66E+05 p/s. Los resultados de las imágenes se muestran en la Tabla 122. Se tomaron imágenes de los órganos a las 8 horas y se midió el flujo total medio (fotones/segundo) para el hígado, el bazo, los pulmones y los riñones. También se analizó un control para cada órgano. 20 Los resultados se muestran en la Tabla 123. La señal máxima para todos los niveles de dosis fue a las 8 horas después de la administración. Además, la distribución a los diversos órganos (hígado, bazo, pulmón y riñón) puede controlarse aumentando o disminuyendo la dosis de LNP.

Tabla 122. Flujo

Punto de tiempo	0,5 mg/kg	0,05 mg/kg	0,005 mg/kg	0,0005 mg/kg
	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
2 horas	3,54E+08	1,75E+07	2,30E+06	4,09E+05
8 horas	1,67E+09	1,71E+08	9,81E+06	7,84E+05
24 horas	2,05E+08	2,67E+07	2,49E+06	5,51E+05
72 horas	8,17E+07	1,43E+07	1,01E+06	3,75E+05
96 horas	4,10E+07	9,15E+06	9,58E+05	4,29E+05
168 horas	3,42E+07	9,15E+06	1,47E+06	5,29E+05

Tabla 123. Flujo de órgano

	Hígado	Bazo	Pulmón	Riñón
	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
0,5 mg/kg	1,42E+08	4,86E+07	1,90E+05	3,20E+05
0,05 mg/kg	7,45E+06	4,62E+05	6,86E+04	9,11E+04
0,005 mg/kg	3,32E+05	2,97E+04	1,42E+04	1,15E+04
0,0005 mg/kg	2,34E+04	1,08E+04	1,87E+04	9,78E+03
Sin tratar	1,88E+04	1,02E+04	1,41E+04	9,20E+03

Para DLin-MC3-DMA, se tomaron imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 144 horas después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y formulación de lípido catiónico. El flujo de fondo fue de aproximadamente 4,51E+05 p/s. Los resultados de las imágenes se muestran en la Tabla 124. Se tomaron imágenes de los órganos a las 8 horas y se midió el flujo total medio (fotones/segundo) para el hígado, el bazo, los pulmones y los riñones. También se analizó un control para cada órgano. Los resultados se muestran en la Tabla 125. La señal máxima para todos los niveles de dosis fue a las 8 horas después de la administración. Además, la distribución a los diversos órganos (hígado, bazo, pulmón y riñón) puede controlarse aumentando o disminuyendo la dosis de LNP.

10

Tabla 124. Flujo

Punto de tiempo	0,5 mg/kg	0,05 mg/kg	0,005 mg/kg	0,0005 mg/kg
	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
2 horas	1,23E+08	7,76E+06	7,66E+05	4,88E+05
8 horas	1,05E+09	6,79E+07	2,75E+06	5,61E+05
24 horas	4,44E+07	1,00E+07	1,06E+06	5,71E+05
48 horas	2,12E+07	4,27E+06	7,42E+05	4,84E+05
72 horas	1,34E+07	5,84E+06	6,90E+05	4,38E+05
144 horas	4,26E+06	2,25E+06	4,58E+05	3,99E+05

Tabla 125. Flujo de órgano

	Hígado	Bazo	Pulmón	Riñón
	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
0,5 mg/kg	1,19E+08	9,66E+07	1,19E+06	1,85E+05
0,05 mg/kg	1,10E+07	1,79E+06	7,23E+04	5,82E+04
0,005 mg/kg	3,58E+05	6,04E+04	1,33E+04	1,33E+04
0,0005 mg/kg	2,25E+04	1,88E+04	2,05E+04	1,65E+04
Sin tratar	1,91E+04	1,66E+04	2,63E+04	2,14E+04

Ejemplo 83. Estudio subcutáneo de nanopartículas lipídicas

15

El ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se formuló en una nanopartícula lipídica que contenía 50 % de DLin-KC2-DMA como se describe en la Tabla 126, 385 % de colesterol, 10 % de DSPC y 1,5 % de PEG. La formulación se administró por vía subcutánea (S.C.) a ratones Balb-C a una dosis de 0,5 mg/kg, 0,05 mg/kg o 0,005 mg/kg.

20

Tabla 126. Formulación DLin-KC2-DMA

Formulación	NPA-098-1
Lípido	DLin-KC2-DMA
Lípido/relación de ARNm (en peso/en peso)	20:1
Tamaño medio	135 nm
	PDI: 0,08
Zeta a pH 7.4	-0,6 mV
Encaps. (RiboGr)	91 %

Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-

luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Se tomaron imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 144 horas después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y formulación de lípidos catiónicos. El límite inferior de detección fue de aproximadamente 3E+05 p/s. Los resultados de las imágenes se muestran en la Tabla 127. Se tomaron imágenes de los órganos a las 8 horas y se midió el flujo total medio (fotones/segundo) para el hígado, el bazo, los pulmones y los riñones. También se analizó un control para cada órgano. Los resultados se muestran en la Tabla 128. La señal máxima para todos los niveles de dosis fue a las 8 horas después de la administración. Además, la distribución a los diversos órganos (hígado, bazo, pulmón y riñón) puede controlarse aumentando o disminuyendo la dosis de LNP. En dosis altas, las formulaciones de LNP migran fuera del sitio de inyección subcutánea, ya que se detectan altos niveles de expresión de luciferasa en el hígado, el bazo, los pulmones y los riñones.

Tabla 127. Flujo

Punto de tiempo	0,5 mg/kg	0,05 mg/kg	0,005 mg/kg
	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
2 horas	3,18E+07	7,46E+06	8,94E+05
8 horas	5,15E+08	2,18E+08	1,34E+07
24 horas	1,56E+08	5,30E+07	7,16E+06
48 horas	5,22E+07	8,75E+06	9,06E+05
72 horas	8,87E+06	1,50E+06	2,98E+05
144 horas	4,55E+05	3,51E+05	2,87E+05

Tabla 128. Flujo de órgano

	Hígado	Bazo	Pulmón	Riñón
	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
0,5 mg/kg	1,01E+07	7,43E+05	9,75E+04	1,75E+05
0,05 mg/kg	1,61E+05	3,94E+04	4,04E+04	3,29E+04
0,005 mg/kg	2,84E+04	2,94E+04	2,42E+04	9,79E+04
Sin tratar	1,88E+04	1,02E+04	1,41E+04	9,20E+03

Ejemplo 84. Estudio subcutáneo de nanopartículas lipídicas catiónicas

El ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina) se formula en una nanopartícula lipídica que contiene 50 % de DLin-MC3-DMA, 38,5 % de colesterol, 10 % de DSPC y 1,5 % de PEG. La formulación se administra por vía subcutánea (S.C.) a ratones Balb-C a una dosis de 0,5 mg/kg, 0,05 mg/kg o 0,005 mg/kg.

Se obtienen imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 144 horas después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y formulación de lípidos catiónicos. Se toman imágenes de los órganos a las 8 horas y se mide el flujo total promedio (fotones/segundo) para el hígado, el bazo, los pulmones y los riñones. También se analiza un control para cada órgano.

Ejemplo 85. Estudio Lipoplex

ARNm de luciferasa lipoplexado (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (5mC/pU), completamente modificado con 5-metilcitosina y N1- metilpseudouridina (5mC/N1mpU) o modificada en la que el 25 % de las citosinas se sustituyeron por 5-metilcitosina y el 25 % de las uridinas se sustituyeron por 2-tiouridina (5mC/S2U). La formulación se administró por vía intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) a ratones Balb-C a una dosis de 0,10 mg/kg.

Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Se tomaron imágenes de los ratones a las 8 horas, 24 horas y 48 horas después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y modificación química. La señal de fondo fue de aproximadamente 3,91E+05 p/s. Los resultados de las imágenes se muestran en la Tabla 129. Se tomaron imágenes de los órganos a las 6 horas y se midió el flujo total medio (fotones/segundo) para el hígado, el bazo, los pulmones y los riñones. También se analizó un control para cada órgano. Los resultados se muestran en la

Tabla 130.

Tabla 129. Flujo

Vía	Punto de tiempo	5mC/pU	5mC/N1mpU	5mC/s2U
		Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
I.V.	8 horas	5,76E+06	1,78E+06	1,88E+06
I.V.	24 horas	1,02E+06	7,13E+05	5,28E+05
I.V.	48 horas	4,53E+05	3,76E+05	4,14E+05
I.M.	8 horas	1,90E+06	2,53E+06	1,29E+06
I.M.	24 horas	9,33E+05	7,84E+05	6,48E+05
I.M.	48 horas	8,51E+05	6,59E+05	5,49E+05
S.C.	8 horas	2,85E+06	6,48E+06	1,14E+06
S.C.	24 horas	6,66E+05	7,15E+06	3,93E+05
S.C.	48 horas	3,24E+05	3,20E+06	5,45E+05

Tabla 130. Flujo de órgano

Vía	Química	Hígado	Bazo	Pulmón	Riñón	Sitio de iny.
		Flujo (p/s)				
I.V.	5mC/pU	5,26E+05	2,04E+07	4,28E+06	1,77E+04	n/a
I.V.	5mC/N1mpU	1,48E+05	5,00E+06	1,93E+06	1,77E+04	n/a
I.V.	5mC/s2U	2,14E+04	3,29E+06	5,48E+05	2,16E+04	n/a
I.M.	5mC/pU	2,46E+04	1,38E+04	1,50E+04	1,44E+04	1,15E+06
I.M.	5mC/N1mpU	1,72E+04	1,76E+04	1,99E+04	1,56E+04	1,20E+06
I.M.	5mC/s2U	1,28E+04	1,36E+04	1,33E+04	1,07E+04	7,60E+05
S.C.	5mC/pU	1,55E+04	1,67E+04	1,45E+04	1,69E+04	4,46E+04
S.C.	5mC/N1mpU	1,20E+04	1,46E+04	1,38E+04	1,14E+04	8,29E+04
S.C.	5mC/s2U	1,22E+04	1,31E+04	1,45E+04	1,08E+04	5,62E+04
	Sin tratar	2,59E+04	1,34E+04	1,26E+04	1,22E+04	n/a

5

Ejemplo 86. Formulación de lípidos catiónicos de ARNm modificado

ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) modificado donde el 25 % de las citosinas se reemplazan con 5-metilcitosina y el 25 % de las uridinas se reemplazan con 2-tiouridina (5 mC/s2U) en los lípidos catiónicos descritos en la Tabla 131. Las formulaciones se administraron por vía intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) a ratones Balb-C a una dosis de 0,05 mg/kg.

Tabla 131. Formulaciones de lípidos catiónicos

Formulación	NPA-130-1	NPA-131-1	NPA-132-1	NPA-133-1	111612-C
Lípido	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
Lípido/relación de ARNm (en peso/en peso)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
Tamaño medio	120 nm	105 nm	122 nm	105 nm	221,3 nm
	PDI: 0,10	PDI: 0,11	PDI: 0,13	PDI: 0,14	PDI: 0,063
Zeta a pH 7.4	0,2 mV	-0,6 mV	-0,5 mV	-0,3 mV	-3,10 mV
Encaps. (RiboGr)	100 %	100 %	93 %	93 %	60 %

15

Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesieron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Se tomaron imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas y 24 horas después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y formulación de lípidos catiónicos. El flujo de fondo fue de aproximadamente 3,31E+05 p/s. Los resultados de la formación de imágenes se muestran en la Tabla 132. En la Tabla 132, "NT" significa no probado. Los ratones no tratados mostraron un flujo medio de 3,14E+05

20

a las 2 horas, 3,33E+05 a las 8 horas y 3,46E+05 a las 24 horas. Se observó una expresión máxima para las tres vías probadas a las 8 horas. DLin-KC2-DMA tiene mejor expresión que DLin-MC3-DMA y DODMA mostró expresión para todas las vías evaluadas.

5 **Tabla 132. Flujo**

Vía	Punto de tiempo	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DLinDMA	DODMA
		Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
I.V.	2 horas	9,88E+06	6,98E+07	9,18E+06	3,98E+06	5,79E+06
I.V.	8 horas	1,21E+07	1,23E+08	1,02E+07	5,98E+06	6,14E+06
I.V.	24 horas	2,02E+06	1,05E+07	1,25E+06	1,35E+06	5,72E+05
I.M.	2 horas	6,72E+05	3,66E+06	3,25E+06	7,34E+05	4,42E+05
I.M.	8 horas	7,78E+06	2,85E+07	4,29E+06	2,22E+06	1,38E+05
I.M.	24 horas	4,22E+05	8,79E+05	5,95E+05	8,48E+05	4,80E+05
S.C.	2 horas	2,37E+06	4,77E+06	4,44E+06	1,07E+06	1,05E+06
S.C.	8 horas	3,65E+07	1,17E+08	3,71E+06	9,33E+06	2,57E+06
S.C.	24 horas	4,47E+06	1,28E+07	6,39E+05	8,89E+05	4,27E+05

Ejemplo 87. Formulación de ARNm modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina

Se formuló ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) totalmente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina en PBS (pH de 7.4). Las formulaciones se administraron por vía intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) a ratones Balb-C a una dosis de 2,5 mg/kg.

Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se injectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Se tomaron imágenes de los ratones a los 5 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y formulación de lípidos catiónicos. El flujo de fondo fue de aproximadamente 3,78E+05 p/s. Los resultados de la formación de imágenes se muestran en la Tabla 133. La expresión de luciferasa ya se observó a los 30 minutos con ambas vías de administración. La máxima expresión de la administración subcutánea aparece entre 30 y 60 minutos. La expresión intramuscular seguía aumentando a los 120 minutos.

25 **Tabla 133. Flujo**

Vía	Punto de tiempo	PBS (pH 7.4)
		Flujo (p/s)
I.M.	5 min	4,38E+05
I.M.	30 min	1,09E+06
I.M.	60 min	1,18E+06
I.M.	120 min	2,86E+06
S.C.	5 min	4,19E+05
S.C.	30 min	6,38E+06
S.C.	60 min	5,61E+06
S.C.	120 min	2,66E+06

Ejemplo 88. Administración intramuscular y subcutánea de ARNm modificado químicamente

ARNm modificado con luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con N4-acetilicitidina, completamente modificado con 5-metoxiuridina, completamente modificado con N4- acetilicitidina y N1-metilpseudouridina o 5-metilcitosina y 5-metoxiuridina totalmente modificada formulada en PBS (pH 7.4) se administró a ratones Balb-C por vía intramuscular o subcutánea a una dosis de 2,5 mg/kg. Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se injectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Se tomaron imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas y 24 horas. El flujo total promedio (fotones/segundo) para la

administración intramuscular se muestra en la Tabla 134_y el flujo total promedio (fotones/segundo) para la administración subcutánea se muestra en la Tabla 135. La señal de fondo fue 3,84E+05 (p/s). La expresión máxima para la administración intramuscular se observó entre las 24 y las 48 horas para toda la química y la expresión aún se detectaba a las 120 horas. Para la administración subcutánea, la expresión máxima se observó a las 2-8 horas y la expresión se detectó a las 72 horas.

5

Tabla 134. Administración intramuscular

	2 horas	8 horas	24 horas
	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
N4-acetilcitidina	1,32E+07	2,15E+07	4,01E+07
5-metoxiuridina	4,93E+06	1,80E+07	4,53E+07
N4-acetilcitidina/ N1-metilpseudouridina	2,02E+07	1,93E+07	1,63E+08
5 -metilcitosina/5 - metoxiuridina	6,79E+06	4,55E+07	3,44E+07

Tabla 135. Administración subcutánea

	2 horas	8 horas	24 horas
	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
N4-acetilcitidina	3,07E+07	1,23E+07	1,28E+07
5-metoxiuridina	7,10E+06	9,38E+06	1,32E+07
N4-acetilcitidina/ N1-metilpseudouridina	7,12E+06	3,07E+06	1,03E+07
5 -metilcitosina/5 - metoxiuridina	7,15E+06	1,25E+07	1,11E+07

10

Ejemplo 89. Estudio *in vivo*

El ARNm modificado con luciferasa que contiene al menos una modificación química se formula como una nanopartícula lipídica (LNP) utilizando el procedimiento de bomba de jeringa y se caracteriza por el tamaño de partícula, el potencial zeta y la encapsulación.

Como se describe en la Tabla 136, la formulación de luciferasa LNP se administra a ratones Balb-C por vía intramuscular (I.M.), intravenosa (I.V.) y subcutánea (S.C.). Como control, el ARN modificado con luciferasa formulado en PBS se administra por vía intravenosa a ratones.

20

El ARNm modificado con luciferasa que contiene al menos una modificación química se formula como una nanopartícula lipídica (LNP) utilizando el procedimiento de bomba de jeringa y se caracteriza por el tamaño de partícula, el potencial zeta y la encapsulación.

Como se describe en la Tabla 136, la formulación de luciferasa LNP se administra a ratones Balb-C por vía intramuscular (I.M.), intravenosa (I.V.) y subcutánea (S.C.). Como control, el ARN modificado con luciferasa formulado en PBS se administra por vía intravenosa a ratones.

Tabla 136. Formulaciones de luciferasa

Formulación	Vehículo	Vía	Concentración (mg/ml)	Volumen de inyección (ul)	Cantidad de ARN modificado (ug)	Dosis (mg/kg)
Luc-LNP	PBS	S.C.	0,2000	50	10	0,5000
Luc-LNP	PBS	S.C.	0,0200	50	1	0,0500
Luc-LNP	PBS	S.C.	0,0020	50	0,1	0,0050
Luc-LNP	PBS	S.C.	0,0002	50	0,01	0,0005
Luc-LNP	PBS	I.V.	0,2000	50	10	0,5000
Luc-LNP	PBS	I.V.	0,0200	50	1	0,0500
Luc-LNP	PBS	I.V.	0,0020	50	0,1	0,0050
Luc-LNP	PBS	I.V.	0,0002	50	0,01	0,0005
Luc-LNP	PBS	I.M.	0,2000	50	10	0,5000
Luc-LNP	PBS	I.M.	0,0200	50	1	0,0500
Luc-LNP	PBS	I.M.	0,0020	50	0,1	0,0050

Formulación	Vehículo	Vía	Concentración (mg/ml)	Volumen de inyección (ul)	Cantidad de ARN modificado (ug)	Dosis (mg/kg)
Luc-LNP	PBS	I.M.	0,0002	50	0,01	0,0005
Luc-PBS	PBS	I.V.	0,20	50	10	0,50

Se obtienen imágenes de los ratones a las 2, 8, 24, 48, 120 y 192 horas para determinar la bioluminiscencia (medida como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón). A las 8 horas o a las 192 horas, se toman imágenes del hígado, el bazo, el riñón y el sitio de inyección para la administración subcutánea e intramuscular para determinar la bioluminiscencia.

5

Ejemplo 90. Estudios de formulación de lípidos catiónicos de ARNm modificado químicamente

ARNm de lucifera (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (5mC/pU), pseudouridina (pU) o N1-metilpseudouridina (N1mpU) se formuló en los lípidos catiónicos descritos en la Tabla 137. Las formulaciones se administraron por vía intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) a ratones Balb-C a una dosis de 0,05 mg/kg.

10

15 **Tabla 137. Formulaciones de lípidos catiónicos**

Formulación	NPA-137-1	NPA-134-1	NPA-135-1	NPA-136-1	111612-A
Lípido	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	C12-200	DODMA
Lípido/relación de ARNm (en peso/en peso)	20:1	20:1	20:1	20:1	20:1
Tamaño medio	111 nm PDI: 0,15	104 nm PDI: 0,13	95 nm PDI: 0,11	143 nm PDI: 0,12	223,2 nm PDI: 0,142
Zeta a pH 7.4	-4,1 mV	-1,9 mV	-1,0 mV	0,2 mV	-3,09 mV
Encaps. (RiboGr)	97 %	100 %	100 %	78 %	64 %
Química	pU	NlmpU	NlmpU	NlmpU	5mC/pU

Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se injectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesieron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Se tomaron imágenes de los ratones a las 2 horas, 8 horas y 24 horas después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y formulación de lípidos catiónicos. El flujo de fondo fue de aproximadamente 4,11E+05 p/s. Los resultados de la formación de imágenes se muestran en la Tabla 138. Se observó la expresión máxima para las tres vías analizadas a las 8 horas.

20

25 **Tabla 138. Flujo**

Vía	Punto de tiempo	DLin-MC3-DMA (pU)	DLin-MC3-DMA (N1mpU)	DLin-KC2-DMA (N1mpU)	C12-200 (N1mpU)	DODMA (5mC/pU)
		Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
I.V.	2 horas	3,21E+08	1,24E+09	1,01E+09	9,00E+08	3,90E+07
I.V.	8 horas	1,60E+09	3,22E+09	2,38E+09	1,11E+09	1,17E+07
I.V.	24 horas	1,41E+08	3,68E+08	3,93E+08	8,06E+07	1,11E+07
I.M.	2 horas	2,09E+07	3,29E+07	8,32E+07	9,43E+07	4,66E+06
I.M.	8 horas	2,16E+08	6,14E+08	1,00E+09	8,77E+07	7,05E+06
I.M.	24 horas	1,23E+07	1,40E+08	5,09E+08	1,36E+07	1,14E+06
S.C.	2 horas	2,32E+07	3,60E+07	2,14E+08	1,01E+08	3,11E+07
S.C.	8 horas	5,55E+08	9,80E+08	4,93E+09	1,01E+09	8,04E+07
S.C.	24 horas	1,81E+08	2,74E+08	2,12E+09	4,74E+07	1,34E+07

Ejemplo 91. Estudios de ARNm modificado químicamente

ARNm de lucifera (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificado con N4-acetilcitolina (N4-acetil), completamente modificado con 5-metoxiuridina (5met), completamente modificado con N4-acetilcitolina y N1-metilseudouridina (N4-acetil/N1mpU) o totalmente modificada con 5-metilcitosina y 5-metoxiuridina (5mC/5-met) se formuló en DLin-MC3-DMA como se describe en la Tabla 139. Las formulaciones se administraron por vía intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) a ratones Balb-C a una dosis de 0,05 mg/kg.

Tabla 139. Formulaciones de lípidos catiónicos

Formulación	NPA-141-1	NPA-142-1	NPA-143-1	NPA-144-1
Lípido	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-MC3-DMA
Lípido/relación de ARNm (en peso/en peso)	20:1	20:1	20:1	20:1
Tamaño medio	138 nm	116 nm	144 nm	131 nm
	PDI: 0,16	PDI: 0,15	PDI: 0,15	PDI: 0,15
Zeta a pH 7.4	-2,8 mV	-2,8 mV	-4,3 mV	-5,0 mV
Encaps. (RiboGr)	97 %	100 %	75 %	72 %
Química	N4-acetil	5met	N4-acetil/ N1mpU	5mC/5-met

- 10 Veinte minutos antes de la obtención de imágenes, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón. Se tomaron imágenes de los ratones a las 2 horas, 6 horas y 24 horas después de la dosificación y se midió el flujo total promedio (fotones/segundo) para cada vía de administración y formulación de lípidos catiónicos.
- 15 El flujo de fondo fue de aproximadamente 2,70E+05 p/s. Los resultados de las imágenes se muestran en la Tabla 140.

Tabla 140. Flujo

Vía	Punto de tiempo	N4-acetil	5met	N4-acetil/ N1mpU	5mC/5-met
		Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)	Flujo (p/s)
I.V.	2 horas	9,17E+07	3,19E+06	4,21E+07	1,88E+06
I.V.	6 horas	7,70E+08	9,28E+06	2,34E+08	7,75E+06
I.V.	24 horas	6,84E+07	1,04E+06	3,55E+07	3,21E+06
I.M.	2 horas	8,59E+06	7,86E+05	5,30E+06	5,11E+05
I.M.	6 horas	1,27E+08	8,88E+06	3,82E+07	3,17E+06
I.M.	24 horas	4,46E+07	1,38E+06	2,00E+07	1,39E+06
S.C.	2 horas	1,83E+07	9,67E+05	4,45E+06	1,01E+06
S.C.	6 horas	2,89E+08	1,78E+07	8,91E+07	1,29E+07
S.C.	24 horas	6,09E+07	6,40E+06	2,08E+08	6,63E+06

Ejemplo 92. Microesferas de PLGA

20 A. Síntesis de microesferas de PLGA

Las microesferas de ácido polilácticoglicólico (PLGA) se sintetizaron usando los procedimientos de emulsificación doble de agua/aceite/agua conocidos en la técnica usando una tapa de éster de PLGA (Lactel, Cat# B6010-2, viscosidad inherente 0,55-0,75, 50:50 LA:GA) o Tapa de ácido PLGA (Lactel, Cat#B6013-2, viscosidad inherente 0,55-0,75, 50:50 LA:GA), alcohol polivinílico (PVA) (Sigma, Cat# 348406-25G, MW 13-23k) díclorometano y agua. Brevemente, se añadieron 0,4 ml de ARNm en agua (W1) a 4 mg/ml a 2 ml de PLGA disueltos en díclorometano (DCM) (O1) a concentraciones que oscilaban entre 50 y 200 mg/ml de PLGA. La emulsión W1/O1 se homogeneizó (Homogeneizador IKA Ultra-Turrax, T18) durante 30 segundos a velocidad 4 (~15.000 rpm). A continuación, la emulsión W1/O1 se añadió a 250 ml de PVA al 1 % (W2) y se homogeneizó durante 1 minuto a velocidad 5 (~19.000 rpm). Las formulaciones se dejaron en agitación durante 3 horas, a continuación se pasaron a través de un colador de malla de nylon de 100 µm (Fisherbrand Cell Strainer, Cat # 22-363-549) para eliminar los agregados más grandes y finalmente se lavaron por centrifugación (10 min, 9250 rpm, 4 °C). Se descartó el sobrenadante y los gránulos de PLGA se resuspendieron en 5-10 ml de agua, lo que se repitió 2x. Las formulaciones lavadas se congelaron en nitrógeno líquido y, a continuación, se liofilizaron durante 2-3 días.

35 B. Disminución de la velocidad de homogeneización o concentración de PLGA

Se prepararon microesferas de luciferasa de PLGA (ARNm de luciferasa que se muestra en la SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) usando las condiciones descritas anteriormente con ester- PLGA recubierto. Después de lavar y resuspender con agua, se usaron 100-200 µl de una muestra de microesferas de PLGA para medir el tamaño de partícula de las formulaciones por difracción láser (Malvern Mastersizer 2000). El tamaño de partícula de las microesferas hechas al disminuir la velocidad de homogeneización durante la adición de la primera emulsión a la segunda emulsión con una concentración de PLGA de 200 mg/ml se muestra en la Tabla 141 y el tamaño de partícula de las microesferas hechas al disminuir la concentración de PLGA en diclorometano (DCM) se muestra en la Tabla 142 con una velocidad de homogeneización de 5 durante la adición de la primera emulsión a la segunda emulsión.

Tabla 141. Disminución de la velocidad de homogeneización

Velocidad del homogeneizador de adición	Tamaño promedio D50 (µm)
2	41,5
3	35,9
4	32,5
5	26,5
6	25,0

Tabla 142. Disminución de la concentración de PLGA en DCM

Concentración de PLGA (mg/mL)	Tamaño promedio D50 (µm)
200	27,7
100	14,2
50	8,7

Se usó PLGA con una viscosidad inherente de 0,55 - 0,75 recubierta con ácido o con éster para fabricar las microesferas que se muestran en la Tabla 143. También se determinaron el tamaño de partícula de las microesferas y la cinética de liberación y se muestran en la Tabla 143.

Tabla 143. Disminución de la concentración de PLGA en DCM

Muestra	Concentración de PLGA mg/ml	Grupo final	Velocidad del homogeneizador de adición	Carga teórica de ARNm (%) en peso)	Carga real de ARNm (%) en peso)	Ef. de encap. %	Tamaño promedio D50 (µm)
A	200	Éster	3	0,4	0,14	45	38,7
B	200	Ácido	3	0,4	0,06	18	31,3
C	200	Éster	5	0,4	0,13	41	32,2
D	200	Ácido	5	0,4	0,07	22	28,0
E	100	Éster	5	0,8	0,15	23	17,1
F	100	Ácido	5	0,8	0,10	18	15,9

C. Estudio de liberación de ARNm modificado encapsulado en microesferas de PLGA

Se deformularon microesferas de PLGA formuladas con ARN modificado con luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) y se determinó la integridad del ARN modificado extraído mediante electroforesis automatizada (Bio-Rad Experion). Después de la liofilización, se pesaron ~10 mg de PLGA MS en tubos eppendorf de 2 ml y se deformularon agregando 1 ml de DCM y dejando que las muestras se agitaran durante 2 a 6 horas. El ARNm se extrajo de las microesferas de PLGA deformuladas añadiendo 0,5 ml de agua y agitando la muestra durante la noche. El ARNm de luciferasa sin formular en agua (control de deformación) se agregó a DCM y pasó por el proceso de deformulación para usarse como control. El ARNm modificado extraído se comparó con el ARNm modificado no formulado y el control de deformulación para probar la integridad del ARNm modificado encapsulado. La mayoría del ARN modificado estaba intacto para el lote ID A, B, C, D, E, en comparación con el control deformulado (control de deform.) y el control sin formular (control sin form.).

D. Estudio de liberación de ARNm modificado encapsulado en microesferas de PLGA

Las microesferas de PLGA formuladas con ARN modificado con luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificada con 5-

metilcitosina y pseudouridina) se resuspendieron en tampón TE a una concentración de microesferas de PLGA de 80 mg/ml por duplicado o triplicado. Después de la resuspensión, las muestras se mantuvieron incubando y agitando a 37 °C durante el curso del estudio. Para cada punto de tiempo (0,04, 0,25, 1,2, 4 y 7 días), se centrifugaron los tubos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el gránulo en 0,25 ml de tampón TE nuevo. Para determinar la cantidad de ARN modificado liberado de las microesferas de PLGA, la concentración de ARN modificado en el sobrenadante se determinó mediante OD 260. El porcentaje de liberación, que se muestra en la Tabla 144, se calculó en función de la cantidad total de ARN modificado en cada muestra. La velocidad de liberación de las formulaciones de ARNm se puede adaptar alterando el tamaño de partícula, la concentración de PLGA y la tapa del extremo ácido versus éster.

10 **Tabla 144. Liberación de porcentaje**

Tiempo (días)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Lote E	Lote F
	% de liberación					
0,04	7,1	13,6	9,5	9,5	21,2	21,7
0,25	18,0	23,3	17,5	24,0	31,3	37,7
1,2	26,3	29,1	22,8	31,6	41,0	46,5
4	33,5	37,1	29,0	40,4	48,8	60,7
7	37,6	41,5	32,4	45,2	55,0	68,3

E. Estudio *in vivo* de microesferas PLGA de luciferasa

15 Las microesferas de PLGA que contienen ARNm de luciferasa (SEQ ID NO: 16; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1) completamente modificadas con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina o completamente modificadas con N1-metilpseudouridina se formulan como se describe en la Tabla 145 y se inyecta por vía subcutánea en ratones. Veinte minutos antes de la formación de imágenes, se inyecta a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. A continuación, los animales se anestesiaron y las imágenes se adquirieron con un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón.

Tabla 145. Formulación

Grupo	n	Dosis (ug)	Volumen (ul)	Vehículo
1	6	50	200	0,5 % de CMC, 5 % de manitol, 0,1 % de polisorbato 80
2	6	50	200	5 % de sacarosa
3	3	5	200	5 % de sacarosa

25 Ejemplo 93. Formulaciones de tampones

El ARNm modificado se puede formular en tampones a base de agua. Los tampones que son similares a los sistemas biológicos son tradicionalmente isotónicos. Tales tampones y soluciones de tampón se pueden preparar según las siguientes pautas. Los componentes de ejemplo se dan en la Tabla 146.

30 En algunos aspectos, se pueden añadir iones de calcio a una solución de tampón para formulaciones.

Tabla 146. Tampones

Tampón	Componentes
Solución salina tamponada con Tris	Tris y cloruro de sodio
Solución salina tamponada con fosfato	cloruro de sodio, fosfato de sodio y, en algunas formulaciones, cloruro de potasio y fosfato de potasio
Lactato de Ringer (para un litro)	130 mEq de ion sodio = 130 mmol/L 109 mEq de ion cloruro = 109 mmol/L 28 mEq de lactato = 28 mmol/L 4 mEq de ion potasio = 4 mmol/L 3 mEq de ion calcio = 1,5 mmol/L

Ejemplo 94. Nanopartícula lipídica que contiene una pluralidad de ARNm modificados

ARNm de EPO (SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina), ARNm de G-CSF (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificada con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina) y ARNm del Factor IX (SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina), se formula en DLin-MC3-DMA como se describe en la Tabla 147. Las formulaciones se administran por vía intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) para Ratones Balb-C a una dosis de 0,05 mg/kg. Las formulaciones de LNP de control que contienen solo un ARNm también se administran a una dosis equivalente.

5 ARNm de EPO (SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina), ARNm de G-CSF (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; totalmente modificada con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina) y ARNm del Factor IX (SEQ ID NO: 10; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos no mostrada en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina), se formula en DLin-MC3-DMA como se describe en la Tabla 147. Las formulaciones se administran por vía intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) para Ratones Balb-C a una dosis de 0,05 mg/kg. Las formulaciones de LNP de control que contienen solo un ARNm también se administran a una dosis equivalente.

10 **Tabla 147. Formulación DLin-MC3-DMA**

Formulación	NPA-157-1
Lípido	DLin-MC3- DMA
Lípido/relación de ARNm (en peso/en peso)	20:1
Tamaño medio	89 nm
	PDI: 0,08
Zeta a pH 7.4	1,1 mV
Encaps. (RiboGr)	97 %

El suero se recoge de los ratones a las 8 horas, 24 horas, 72 horas y/o 7 días después de la administración de la formulación. El suero se analiza mediante ELISA para determinar la expresión proteica de EPO, G-CSF y Factor IX.

15 Ejemplo 95. Estudios de formulación de lípidos catiónicos de ARNm modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina

20 ARNm de EPO (SEQ ID NO: 9; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia; tapa 5', Tapa1; completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina) o ARNm de G-CSF (SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 140 nucleótidos que no se muestra en la secuencia, tapa 5', Tapa1, completamente modificada con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina) se formula en DLin-MC3-DMA y DLin-KC2-DMA como se describe en la Tabla 148. Las formulaciones se administraron por vía intravenosa (I.V.), intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) a ratones Balb-C a una dosis de 0,05 mg/kg.

25 **Tabla 148. Formulaciones DLin-MC3-DMA y DLin-KC2-DMA**

Formulación	NPA-147-1	NPA-148-1	NPA-150-1	NPA-151-1
ARNm	EPO	EPO	G-CSF	G-CSF
Lípido	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA	DLin-MC3-DMA	DLin-KC2-DMA
Lípido/relación de ARNm (en peso/en peso)	20:1	20:1	20:1	20:1
Tamaño medio	117 nm	82 nm	119 nm	88 nm
	PDI: 0,14	PDI: 0,08	PDI: 0,13	PDI: 0,08
Zeta a pH 7.4	-1,7 mV	0,6 mV	3,6 mV	2,2 mV
Encaps. (RiboGr)	100 %	96 %	100 %	100 %

El suero se recoge de los ratones a las 8 horas, 24 horas, 72 horas y/o 7 días después de la administración de la formulación. El suero se analiza por ELISA para determinar la expresión proteica de EPO y G-CSF.

30 Ejemplo 96. SAR dirigida de pseudouridina y N1-metil pseudouridina

Con el enfoque reciente en la pseudouridina de nucleósido de pirimidina, se diseñaron una serie de estudios de actividad de estructura para investigar las modificaciones que contienen ARNm en pseudouridina o N1-metil-pseudouridina.

35 El estudio se diseñó para explorar el efecto de la longitud de la cadena, el aumento de la lipofilia, la presencia de estructuras de anillo y la alteración de las interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas cuando se realizaron modificaciones en la posición N1, posición C6, posición 2, posición 4 y en el esqueleto de fosfato. También se investiga la estabilidad.

40 Con este fin, se investigan modificaciones que implican alquilación, cicloalquilación, alquil-cicloalquilación, arilación, alquil-arylación, fracciones de alquilación con grupos amino, fracciones de alquilación con grupos de ácido carboxílico y fracciones de alquilación que contienen fracciones cargadas con aminoácidos. El grado de alquilación es

generalmente C1-C₆. Los ejemplos de modificaciones químicas incluyen las enumeradas en la Tabla 149 y la Tabla 150.

Tabla 149. Pseudouridina y N1-metil pseudouridina SAR

Modificación química	Compuesto #	De origen natural
N1-Modificaciones		
N1-Etil-pseudo-UTP	1	N
N1-Propil-pseudo-UTP	2	N
N1- <i>iso</i> -propil-pseudo-UTP	3	N
N1-(2,2,2-Trifluoroethyl)-pseudo-UTP	4	N
N1-Ciclopropil-pseudo-UTP	5	N
N1-Ciclopropilmetil-pseudo-UTP	6	N
N1-Fenil-pseudo-UTP	7	N
N1-bencil-pseudo-UTP	8	N
N1-Aminometil-pseudo-UTP	9	N
Pseudo-UTP-N1-2-ácido etanoico	10	N
N 1-(3-Amino-3-carboxipropil)pseudo-UTP	11	N
N1-Metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudo-UTP	12	Y
Modificaciones C-6		
6-Metil-pseudo-UTP	13	N
6-Trifluorometil-pseudo-UTP	14	N
6-Metoxy-pseudo-UTP	15	N
6-Fenil-pseudo-UTP	16	N
6-Yodo-pseudo-UTP	17	N
6-Bromo-pseudo-UTP	18	N
6-Cloro-pseudo-UTP	19	N
6-Fluoro-pseudo-UTP	20	N
Modificaciones de 2 o 4 posiciones		
4-Tio-pseudo-UTP	21	N
2-Tio-pseudo-UTP	22	N
Modificaciones de la estructura principal de fosfato		
Alfa-tio-pseudo-UTP	23	N
N1-Me-alfa-tio-pseudo-UTP	24	N

Tabla 150. Pseudouridina y N1-metil Pseudouridina SAR

Modificación química	Compuesto #	De origen natural
N1-Metil-pseudo-UTP	1	Y
N1-Butil-pseudo-UTP	2	N
N1- <i>tert</i> -Butil-pseudo-UTP	3	N
N1-Pentil-pseudo-UTP	4	N
N1-Hexil-pseudo-UTP	5	N
N1-Trifluorometil-pseudo-UTP	6	Y
N1-Ciclobutil-pseudo-UTP	7	N
N1-Ciclopentil-pseudo-UTP	8	N
N1-Ciclohexil-pseudo-UTP	9	N
N1-Cicloheptil-pseudo-UTP	10	N
N1-Ciclooctil-pseudo-UTP	11	N
N1-Ciclobutilmethyl-pseudo-UTP	12	N

Modificación química	Compuesto #	De origen natural
N1-Ciclopentilmethyl-pseudo-UTP	13	N
N1-Ciclohexilmethyl-pseudo-UTP	14	N
N1-Cicloheptilmethyl-pseudo-UTP	15	N
N1-Ciclooctilmethyl-pseudo-UTP	16	N
N1- <i>p</i> -tolil-pseudo-UTP	17	N
N1-(2,4,6-Trimetil-fenil)pseudo-UTP	18	N
N1-(4-Metoxi-fenil)pseudo-UTP	19	N
N1-(4-Amino-fenil)pseudo-UTP	20	N
N1(4-Nitro-fenil)pseudo-UTP	21	N
Pseudo-UTP-N1- <i>p</i> -ácido benzoico	22	N
N1-(4-Metil-bencil)pseudo-UTP	24	N
N1-(2,4,6-Trimetil-bencil)pseudo-UTP	23	N
N1-(4-Metoxi-bencil)pseudo-UTP	25	N
N1-(4-Amino-bencil)pseudo-UTP	26	N
N1-(4-Nitro-bencil)pseudo-UTP	27	N
Pseudo-UTP-N1-metil- <i>p</i> -ácido benzoico	28	N
N1-(2-Amino-etil)pseudo-UTP	29	N
N1-(3-Amino-propil)pseudo-UTP	30	N
N1-(4-Amino-butil)pseudo-UTP	31	N
N1-(5-Amino-pentil)pseudo-UTP	32	N
N1-(6-Amino-hexil)pseudo-UTP	33	N
Pseudo-UTP-N1-3-ácido propiónico	34	N
Pseudo-UTP-N1-4-ácido butanoico	35	N
Pseudo-UTP-N1-5-ácido pentanoico	36	N
Pseudo-UTP-N1-6-ácido hexanoico	37	N
Pseudo-UTP-N1-7-heptanoic acid	38	N
N1-(2-Amino-2-carboxietil)pseudo-UTP	39	N
N1-(4-Amino-4-carboxibutil)pseudo-UTP	40	N
N3-Alquil-pseudo-UTP	41	N
6-Etil-pseudo-UTP	42	N
6-Propil-pseudo-UTP	43	N
6-iso-Propil-pseudo-UTP	44	N
6-Butil-pseudo-UTP	45	N
6-tert-Butil-pseudo-UTP	46	N
6-(2,2,2-Trifluoroethyl)-pseudo-UTP	47	N
6-Etoxi-pseudo-UTP	48	N
6-Trifluorometoxi-pseudo-UTP	49	N
6-Fenil-pseudo-UTP	50	N
6-(Fenil-sustituido)-pseudo-UTP	51	N
6-Ciano-pseudo-UTP	52	N
6-Azido-pseudo-UTP	53	N
6-Amino-pseudo-UTP	54	N
6-Etilcarboxilato-pseudo-UTP	54b	N
6-Hidroxi-pseudo-UTP	55	N
6-Metilamino-pseudo-UTP	55b	N

Modificación química	Compuesto #	De origen natural
6-Dimetilamino-pseudo-UTP	57	N
6-Hidroxiamino-pseudo-UTP	59	N
6-Formil-pseudo-UTP	60	N
6-(4-Morfolino)-pseudo-UTP	61	N
6-(4-Tiomorfólico)-pseudo-UTP	62	N
N1-Me-4-tio-pseudo-UTP	63	N
N1-Me-2-tio-pseudo-UTP	64	N
1,6-Dimetil-pseudo-UTP	65	N
1-Metil-6-trifluorometil-pseudo-UTP	66	N
1-Metil-6-etil-pseudo-UTP	67	N
1-Metil-6-propil-pseudo-UTP	68	N
1-Metil-6-iso-propil-pseudo-UTP	69	N
1-Metil-6-butil-pseudo-UTP	70	N
1-Metil-6-tert-butil-pseudo-UTP	71	N
1-Metil-6-(2,2,2-Trifluoroethyl)pseudo-UTP	72	N
1-Metil-6-yodo-pseudo-UTP	73	N
1-Metil-6-bromo-pseudo-UTP	74	N
1-Metil-6-cloro-pseudo-UTP	75	N
1-Metil-6-fluoro-pseudo-UTP	76	N
1-Metil-6-metoxi-pseudo-UTP	77	N
1-Metil-6-ethoxi-pseudo-UTP	78	N
1-Metil-6-trifluorometoxi-pseudo-UTP	79	N
1-Metil-6-fenil-pseudo-UTP	80	N
1-Metil-6-(fenilo sustituido)pseudo-UTP	81	N
1-Metil-6-ciano-pseudo-UTP	82	N
1-Metil-6-azido-pseudo-UTP	83	N
1-Metil-6-amino-pseudo-UTP	84	N
1-Metil-6-etilcarboxilato-pseudo-UTP	85	N
1-Metil-6-hidroxi-pseudo-UTP	86	N
1-Metil-6-metilamino-pseudo-UTP	87	N
1-Metil-6-dimetilamino-pseudo-UTP	88	N
1-Metil-6-hidroxiamino-pseudo-UTP	89	N
1-Metil-6-formil-pseudo-UTP	90	N
1-Metil-6-(4-morfolino)-pseudo-UTP	91	N
1-Metil-6-(4-tiomorfólico)-pseudo-UTP	92	N
1-Alquil-6-vinil-pseudo-UTP	93	N
1-Alquil-6-alil-pseudo-UTP	94	N
1-Alquil-6-homoalil-pseudo-UTP	95	N
1-Alquil-6-etinil-pseudo-UTP	96	N
1-Alquil-6-(2-propinil)-pseudo-UTP	97	N
1-Alquil-6-(1-propinil)-pseudo-UTP	98	N

Ejemplo 97 Incorporación de nucleósidos de origen natural y no natural

Los nucleósidos de origen natural y no natural se incorporan al ARNm que codifica un polipéptido de interés. En las Tablas 151 y 152 se dan ejemplos de estos. Ciertos trifosfatos de nucleósido (NTP) disponibles comercialmente se investigan en los polinucleótidos. En la Tabla 152 se proporciona una selección de estos. A continuación, se examina el ARNm resultante para determinar su capacidad para producir proteínas, inducir citoquinas, y/o producir un resultado

terapéutico.

Tabla 151. Nucleósidos de origen natural y no natural

Modificación química	Compuesto #	De origen natural
N4-Metil-Citosina	1	Y
N4,N4-Dimetil-2'-OMe-Citosina	2	Y
Ácido 5-oxiacético-éster metílico-uridina	3	Y
N3-Metil-pseudo-Uridina	4	Y
5-Hidroximetil-Citosina	5	Y
5-Trifluorometil-Citosina	6	N
5-Trifluorometil-Uridina	7	N
5-Metil-amino-metil-Uridina	8	Y
5-Carboxi-metil-amino-metil-Uridina	9	Y
5-Carboximetilaminometil-2'-OMe-Uridina	10	Y
5-Carboximetilaminometil-2-tio-Uridina	11	Y
5-Metilaminometil-2-tio-Uridina	12	Y
5-Metoxi-carbonil-metil-Uridina	13	Y
5-Metoxi-carbonil-metil-2'-OMe-Uridina	14	Y
Ácido 5-oxiacético-uridina	15	Y
3-(3-Amino-3-carboxipropil)-Uridina	16	Y
Éster de metilo 5-(carboxihidroximetil)uridina	17	Y
5-(carboxihidroximetil)uridina	18	Y

Tabla 152. Trifosfatos de nucleósidos de origen no natural

Modificación química	Compuesto #	De origen natural
N1-Me-GTP	1	N
2'-OMe-2-Amino-ATP	2	N
2'-OMe-pseudo-UTP	3	Y
2'-OMe-6-Me-UTP	4	N
2'-Azido-2'-desoxi-ATP	5	N
2'-Azido-2'-desoxi-GTP	6	N
2'-Azido-2'-desoxi-UTP	7	N
2'-Azido-2'-desoxi-CTP	8	N
2'-Amino-2'-desoxi-ATP	9	N
2'-Amino-2'-desoxi-GTP	10	N
2'-Amino-2'-desoxi-UTP	11	N
2'-Amino-2'-desoxi-CTP	12	N
2-Amino-ATP	13	N
8-Aza-ATP	14	N
Xantosina-5'-TP	15	N
5-Bromo-CTP	16	N
2'-F-5-Metil-2'-desoxi-UTP	17	N
5-Aminoalil-CTP	18	N
2-Amino-ribosida-TP	19	N

Ejemplo 98. Incorporación de modificaciones a la nucleobase y carbohidrato (azúcar)

Los nucleósidos de origen natural y no natural se incorporan al ARNm que codifica un polipéptido de interés. Los nucleósidos y NTP disponibles comercialmente que tienen modificaciones tanto en la nucleobase como en el

carbohidrato (azúcar) se examinan para determinar su capacidad para incorporarse en el ARNm y producir proteínas, inducir citoquinas y/o producir un resultado terapéutico. En las Tablas 153 y 154 se dan ejemplos de estos nucleósidos.

Tabla 153. Modificaciones de combinación

Modificación química	Compuesto #
5-yodo-2'-fluoro-desoxiuridina	1
5-yodo-citidina	6
2'-bromo-desoxiuridina	7
8-bromo-adenosina	8
8-bromo-guanosina	9
Clorhidrato 2,2'-anhidro-citidina	10
2,2'-anhidro-uridina	11
2'-Azido-desoxiuridina	12
2-amino-adenosina	13
N4-Benzoyl-citidina	14
N4-Amino-citidina	15
2'-O-Metil-N4-Acetyl-citidina	16
2'Fluoro-N4-Acetyl-citidina	17
2'Fluor-N4-Bz-citidina	18
2'O-metil-N4-Bz-citidina	19
2'O-metil-N6-Bz-desoxiadenosina	20
2'Fluoro-N6-Bz-desoxiadenosina	21
N2-isobutil-guanosina	22
2'Fluro-N2-isobutil-guanosina	23
2'O-metil-N2-isobutil-guanosina	24

Tabla 154. Combinaciones de origen natural

Nombre	Compuesto #	De origen natural
5-Metoxicarbonilmethyl-2-tiouridina TP	1	Y
5-Metilaminometil-2-tiouridina TP	2	Y
5-Carbamoilmethyluridina TP	3	Y
5-Carbamoilmethyl-2'-O-metiluridina TP	4	Y
1-Metil-3-(3-amino-3-carboxipropil) pseudouridina TP	5	Y
5-Metilaminometil-2-selenouridina TP	6	Y
5-Carboximethyluridina TP	7	Y
5-Metildihidrouridina TP	8	Y
lisidina TP	9	Y
5-Taurinometiluridina TP	10	Y
5-Taurinometil-2-tiouridina TP	11	Y
5-(iso-Pentenilaminometil)uridina TP	12	Y
5-(iso-Pentenilaminometil)-2-tiouridina TP	13	Y
5-(iso-Pentenilaminometil)-2'-O-metiluridina TP	14	Y
N4-Acetyl-2'-O-metilcitidina TP	15	Y
N4,2'-O-Dimetilcitidina TP	16	Y
5-Formil-2'-O-metilcitidina TP	17	Y
2'-O-Metilpseudouridina TP	18	Y
2-Tio-2'-O-metiluridina TP	19	Y
3,2'-O-Dimetiluridina TP	20	Y

En las tablas, "UTP" significa trifosfato de uridina, "GTP" significa trifosfato de guanosina, "ATP" significa trifosfato de adenosina, "CTP" significa trifosfato de citosina, "TP" significa trifosfato y "Bz" significa bencilo.

5 LISTA DE SECUENCIAS

<110> TERAPÉUTICA MODERNA

<120> COMPOSICIONES DE NUCLEÓSIDO, NUCLEÓTIDO Y ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> M011.20/2030.1011PCT

10 <140> PCT/US2012/XXXXXX

<141> 2012-12-14

<150> US 61/576.705

<151> 2011-12-16

<150> US 61/618.957

15 <151> 2012-04-02

<150> US 61/648.244

<151> 2012-05-17

<150> US 61/681.712

<151> 2012-08-10

20 <150> US 61/696.381

<151> 2012-09-04

<150> US 61/709.303

<151> 2012-10-03

<150> US 61/712.490

25 <151> 2012-10-11

<150> PCT/US2012/058519

<151> 2012-10-03

<160> 25

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

30 <210> 1

<211> 10

<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> base_modificada
5 <222> (4)...(4)
<223> n= A o G
<400> 1
ccrnccaugg 10
<210> 2
10 <211> 9
<212> ARN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> base_modificada
15 <222> (8)...(8)
<223> n= U o A
<220>
<221> base_modificada
<222> (9)...(9)
20 <223> n = U o A
<400> 2
uuauuuann 9
<210> 3
<211> 615
25 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 3

ES 2 923 757 T3

atggctggac ctgccaccca gagccccatg aagctgatgg ccctgcagct gctgctgtgg 60
cacagtgcac tctggacagt gcaggaagcc acccccctgg gcccctgccag ctccctgccc 120
cagagcttcc tgctcaagt ctttagagaa gtgaggaaga tccaggcga tggcgacg 180
ctccaggaga agctgtgtc cacctacaag ctgtgccacc cccaggagct ggtgctgctc 240
ggacactctc tggcatccc ctgggtccc ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag 300
ctgcaggct gctttagcca actccatagc ggccctttcc tctaccagg gctcctgcag 360
gcccctggaa ggtatctcccc cgagttgggt cccaccttgg acacactgca gctggacg 420
gcccacttg ccaccacca ctggcagcag atggaaagaac tggaaatggc ccctgccc 480
cagcccccc agggtgcacat gcccgccttc gcctctgtt tccagcgcgg ggcaggaggg 540
gtcctggtt cctccatct gcagagcttc ctggagggtgt cgtaccgcgt tctacgcccac 600
cttgcggcagc cctga 615

<210> 4

<211> 800

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggct ggacctgcca cccagagccc catgaagctg atggccctgc agctgctgct 120
gtggcacagt gcactcttga cagtgcagga agccacccccc ctggggccctg ccagctccct 180
gccccagagc ttccctgtca agtgctttaga gcaagtgagg aagatccagg gcgatggcgc 240
agcgctccag gagaagctgt gtgccaccta caagctgtc caccggagg agctgggtgt 300
gctcggacac tctctggca tcccctggc tcccctgagc agctgccccca gccaggccct 360
gcagctggca ggctgcttga gccaactcca tagcgccctt ttcccttctacc aggggttct 420
gcagggccctg gaaggatct ccccgagtt gggtccacc ttggacacac tgcagctgg 480
cgtcgccgac ttggccacca ccatctggca gcagatggaa gaaactggaa tggccctgtc 540
cctcgagccc acccagggtg ccatggcgc cttcgcctt gttttccagc gcccggcagg 600
aggggttctg gttgcctccc atctgcagag ctccctggag gtgtcgtaacc gcttttac 660
ccaccttgc cagccctgaa gcgctgcctt ctgcggggct tgccttctgg ccatgcctt 720
cttctctccc ttgcacctgt accttgggt cttaataa agcctgagta ggaaggcggc 780
cgctcgagca tgcattttaga 800

<210> 5

<211> 800

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggcc ggtcccgca cccaaagccc catgaaaactt atggccctgc agttgctgct 120
ttggcactcg gcccctgttga cagtccaaaga agcgactctt ctccggacccctg cctcatcg 180
gcccgcgtca ttccctttga agtgtctggc gcagggtgcga aagattcagg gcgatggagc 240
cgcaactccaa gagaagctct ggcgcacata caaaactttgc catcccgagg agctcgtaact 300
gctcgggcac agttggggta ttccctggc tccctctctcg tccctgtccgt cgcaggctt 360
gcagttggca ggggtgcctt cccagctcca ctccgggtttt ttcttgcatac agggactgct 420
gcaagccctt gaggaaatct cgccagaatt gggccgcacg ctggacacgt tgcagctcg 480
cgtggcggat ttgcacacaa ccatctggca gcagatggag gaaactggaa tggcaccgc 540

ES 2 923 757 T3

gctgcagccc acgcaggggg caatgccggc ctttgcgtcc gcgtttcagc gcagggcggg 600
 tggagtccctc gttagcgagcc accttaatc atttttggaa gtctcgtaacc gggtgcttag 660
 acatcttcgcg cagccgtgaa gcgctgcctt ctgcggggct tgccctctgg ccatgccctt 720
 cttctctccc ttgcacctgt acctcttgtt cttgaataa agcctgagta ggaaggcggc 780
 cgctcgagca tgcatctaga 800

<210> 6

<211> 758

<212> ARN

5

<213> Homo sapiens

<400> 6

gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauauaag agccaccaug gccgggucccg 60
 cgacccaaag ccccaugaaa cuuauggccc ugcaguugcu gcuuuggcac ucggccucu 120
 ggacaguucca agaagcgacu ccucucggac cugccucauc guugccgcag ucaauuccuuu 180
 ugaagugucu ggagcaggug cgaaagauuc agggcgaugg agccgcacuc caagagaagc 240
 ucugcgcac auacaaaacuu ugccaucucg aggagcucgu acugcucggg cacagcuiugg 300
 ggauuuccug ggcuccucuc ucguccuguc cguccgcaggc uuuggcaguug gcagggugcc 360
 uuuucccagcu ccacuccggu uuguuucuugu aucaaggacu gcugcaagcc cuugagggaa 420
 ucucgcaga auiuggcccg acgcuggaca cguugcagcu cgacguggcg gauuuucgcaa 480
 caaccaaucug gcagcagaug gaggaacugg ggauggcacc cgccgcugcag cccacgcagg 540
 gggcaaugcc ggccuuuugcg uccgcguuuc agcgcaggcc ggguggaguc cucguagcga 600
 gccaccuuuca aucauuuuuug gaagucucgu accgggugcu gagacauuuu ggcgcagccgu 660
 gaagcgcugc cuuucugcggg gcuugccuuuc ugcccuaugcc cuuucucu cccuuggcacc 720
 uguaccucuu ggucuuuugaa uaaagccuga guaggaag 758

<210> 7

<211> 854

10

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 7

gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauauaag agccaccaug guauccaagg 60
 gggaggagga caacauggcg aucaucaagg aguuucaugcg auucaaggug cacauggaaag 120
 guucggucaa cggacacgaa uuugaaaucg aaggagagg ugaaaaagg cccuauaaga 180
 ggacacagac cgcgaaacuc aaggucacga aagggggacc acuuuccuuuc gcccugggaca 240
 uucuuucgccc ccaguuuaug uacgggucca aagcauaugu gaagcauccc gcccguauuuc 300
 cugacuaucu gaaacucagc uuucccgagg gauucaagug ggagcggguc augaacuuuug 360
 aggacgggg uguagucacc guaaccuaag acucaagccu ccaagacggc gaguicauu 420
 acaagguaa acugcggggg acuaacuuuc cguccggauug gcccggugauug cagaagaaaa 480
 cgaugggauug ggaagcguca ucgaggagga uguacccaga agauggugca uugaagggggg 540
 agaucaagca gagacugaag uugaaagaug gggcacauua ugaugccgag gugaaaaacga 600
 cauacaaagc gaaaaagccg gugcagcuiuc cccggagcgu uaaugugaa aucaaguugg 660
 auauuacuuuc acacaaugag gacuacacaa uugucgaaca guacgaacgc gcugagggua 720
 gacacucgac gggaggcaug gacgaguuguu acacaaugaua agcugccuuuc ugcccggguu 780
 gccuucuggc caugccuuuc uucucuccu ugaccuugua ccucuugguc uuugaaauaaa 840
 gccugaguag gaag 854

<210> 8

15

<211> 896

<212> ADN

ES 2 923 757 T3

<213> Homo sapiens

<400> 8

```
taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagac 60
caccatggtt tccaaggggg aggaggacaa catggcgttc atcaaggagt tcacgcatt 120
caaggtgcac atggaagggtt cggtcaacgg acacgaatt gaaatcgaag gagagggtga 180
aggaaggccc tatgaagggg cacagaccgc gaaactcaag gtacgaaag ggggaccact 240
tccttcgccc tgggacattt ttccggccca gtttatgtac gggtccaaag catatgtgaa 300
gcattccgccc gatattcctg actatgtaa actcgtttt cccgagggtat tcaagtgggaa 360
gcgggtcatg aactttgagg acgggggtt agtcaccgtt acccaagact caagcctcca 420
agacggcgcag ttcatctaca aggtcaaact gcggggact aacttcgtt cgatgggccc 480
ggtgatgcag aagaaaacga tggatgggaa agcgtcatcg gagaggatgt acccagaaga 540
```

```
tggtgcatgg aagggggaga tcaagcagag actgaagttt aaagatgggg gacattatga 600
tgccgaggtt aaaacgacat acaaagcga aaagccgtt cagttcccg gacgtataa 660
tgtaatatc aagttggata ttacttcaca caatgaggac tacacaattt tcgaacagta 720
cgaacgcgtt gagggttagac actcgtcccc aggcattggac gagttgtaca aatgataagc 780
tgccttcgtt gggcttgc ttcgtggccat gccccttc tctcccttgc acctgtacct 840
cttggtcttt gaataaagcc tgagtaggaa ggcggccgtt cgagcatgca tctaga 896
```

5

<210> 9

<211> 725

<212> ARN

<213> Homo sapiens

10

<400> 9

```
ggggaaauuaag agagaaaaaaga agaguauaagaa gaaauauuaag agccaccaug ggagugcaccg 60
aguguuccgc gugguugugg uugcugcugt cgcucuugag ccuucccacug ggacugccug 120
ugcugggggc accacccaga uugaucugcg acucacggg acuugagagg uaccuuuuug 180
aagccaaaga agccgaaaac aucacaaccg gaugcgccga gcacugcuucc cucaaugaga 240
acauuacugu accggauaca aaggcuauu ucuaugcaug gaagagaaug gaaguaggac 300
agcaggccgu cgaagugugg caggggcucg cgcuuuuguc ggaggcggug uugcgggguc 360
aggcccuccu cgucaacuca ucacagccgu gggagccccu ccaacuuuau gucgauuaag 420
cgugugcggg gcuccgcgc uugacgacgu ugcuuucggg ucugggcgcu caaaaggagg 480
cuauuucgc gccugacgcg gccuccgcgg cacccucccg aacgaucacc gcggacacgu 540
uuaggaagcu uuuuagagug uacagcaauu uccuccgcgg aaagcugaaa uuguaauacug 600
gugaaagcug uaggacaggg gaucgcugau aagcugccuu cugcggggcu ugccuucugg 660
ccaugcuccu cuucucuccu uugcaccgu accucuuggu cuuugauua agccugagua 720
ggaag 725
```

<210> 10

<211> 1536

<212> ARN

15

<213> Homo sapiens

<400> 10

gggaaaauaag agagaaaaaga agaguuaagaa gaaaauauaag agccaccaaau gcagcgcguc 60
 aacaugauua uggccgaauc gccgggacuc aucacaauu gcccucuuggg uuaucucuuug 120
 ucggcagaaau guaccguguu cuuggaucac gaaaacgcga acaaaaauucu uaaucgccccg 180
 aagcgguaau acuccggaa acuugaggag uuugugcagg gcaaucuuga acgagagugc 240
 auggaggaga aaugcuuu ugaggaggcg agggaaagugu uugaaaacac agagcgaaaca 300
 acggaguuuu ggaagcaaua cguagauugg gaccagugug agucgaaucc guggccuau 360
 ggggaaucau guaaagaua caucaauagc uaugaaugcu ggugcccggu uggguuugaa 420
 gggaaagaacu gugagcugga ugugacguc aacaucaaaa acggacgcug ugaggcauuu 480
 uguagaacu cggcugacaa uaagguauga ugcugcugca cagagggaaua ccggcuggcg 540
 gagaaccaaa aaucgugcga gcccgacug cgguuccuuu gugggggggu gacguguguca 600
 cagacuagca aguugacgag agcgagacu guauuucccg accguggacua cgucaacagc 660
 accgaagccg aaacaauuccu cgauaacauc acgcagagca cucaguccuu caauqacuuu 720
 acgaggguugc uaggugguga ggacgcgaaa cccggucagu ucccccuggca ggugguauug 780
 aacggaaaag ucgaugccuu uuguggaggu uccauuuguca acgagaagug gauugucaca 840
 gcggcacacu gctguagaaac aggugugaaa auacacgguaug ugcccggaga gcauaacauu 900
 gaagagacag agcacacggc acaaaaagcga aaugucauca gaaucauucc acaccauac 960
 uauaacgcgg caaucaauaa guacaucac gacauucgcac uuuuggagcu ugacqaaccu 1020
 uuggugcuua auucguacgu cacccuuau uguauuugccg acaaagagua uacaaacauuc 1080
 uucuugaaau ucggcuccgg guacguacg ggcuggggca gaguguucca uaaggguaga 1140
 uccgcacugg uguugcaaua ccucagggug cccucugugg aucgaccac uugucugcgg 1200
 uccaccaauu ucacaauuca caacaaauug uucugugcgg gauuuccauga aggggggaga 1260
 gauagcugcc agggagacuc aggggguccc cacgugacgg aagucgaggg gacgucauuu 1320
 cugacggaa uuaucucaug gggagaggaa ugugcgauga agggggaaaua uggcaucuac 1380
 acuaaagugu cacgguaugu caauuggauc aaggaaaaga cgaacucac gugauacgccc 1440
 agcgcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugccu uciuucucucc cuugcaccug 1500
 uaccucuugg ucuuugaaaua aagccugagu aggaag 1536

<210> 11

<211> 767

<212> ADN

5

<213> Homo sapiens

<400> 11

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
 caccatggga gtgcacgagt gtcccgctgt gtttgttgc tctgtgtcgc tcttgagcct 120
 cccactggga ctgcctgtc tggggcacc acccagattt atctgcact cacgggtact 180
 ttagaggtac cttcttgaag ccaaagaagc cgaaaacatc acaacccgat gcccgcagca 240
 ctgtccctc aatgagaaca ttactgtacc ggatacaaaag gtcaattttt atgcattggaa 300
 gagaatggaa gtaggacagc agggcgtcga agtgtggcag gggctcgccg ttttgcggaa 360
 ggcgggtttg cggggtcagg ccctctctgt caactcatca cagccgtggg agcccctcca 420
 acttcatgtc gataaaagcgg tgtcgggct ccgcagttt acgacgttgc ttccggctct 480
 gggcgcacaa aaggaggcta tttcggccgc tgacgcggcc tccgcggcac ccctccgaac 540
 gatcaccgcg gacacgttta ggaagcttt tagagtgtac agcaattttc tccgcggaaa 600
 gctgaaattt tatactgttg aagcgtgttag gacagggat cgctgataag ctgccttctg 660
 cggggcttgc ctctggcca tgcccttctt ctctcccttg cacctgtacc tcttggtctt 720
 tgaataaagc ctgagtagga aggcggccgc tcgagcatgc atctaga 767

<210> 12

<211> 750

10

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 923 757 T3

taatacgact cactatagg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggga gtgcacgagt gtcccgctg gttgtggtt ctgcgtgcgc tcttgagcct 120
cccactggga ctgcctgtc tggggcacc acccagattt atctgcact cacgggtact 180
tgagaggta cttcttgaag ccaaagaagc cgaaaacatc acaaccggat gcgccgagca 240
ctgtccctc aatgagaaca ttactgtacc ggatacaaag gtcaatttct atgcattggaa 300
gagaatggaa gtaggacagc aggcgtcga agtgtggcag gggctcgcc ttttgcggaa 360
ggcgggtgtt cggggtcagg ccctccctgt caactcatca cagccgtggg agccctcca 420
acttcatgtc gataaagcgg tgtcgggct ccgcagcttg acgacgttgc ttccggctct 480
gggcgcacaa aaggaggcta ttccggcc tcacgcggcc tccgcggcac ccctccgaac 540
gatcacccgcg gacacgttta ggaagttt tagagtgtac agcaatttcc tccgcggaaa 600
gctgaaattt tatactggtg aagcgtgttag gacaggggat cgtgataag ctgccttctg 660
cggggcttgc ctctggcca tgcccttctt ctctcccttg caccgttacc tcttggtctt 720
tgaataaagc ctgagtagga aggccggccgc 750

<210> 13

<211> 1578

<212> ADN

5

<213> Homo sapiens

<400> 13

taatacgact cactatagg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
cacaatgca gcgcgtcaac atgattatgg ccgaatcgcc gggactcatc acaatctgcc 120
tcttgggta tctcttgcg gcagaatgtt ccgtgttctt ggatcacaa aacgcgaaca 180
aaattcttaa tcgccccgaag cggtataact ccgggaaact tgaggagttt gtgcaggcga 240
atcttgcacg agatgcatg gaggagaat gtcctttga ggaggcggagg gaagtgtttt 300
aaaacacaga gcaacaacag gagttttga agaataactgt agatggggac cagtgtgagt 360
cgaatccgtg cctcaatggg ggatcatgtt aagatgacat caatagttt gaatgtgtt 420
gcccgttgg gtttgaaggg aagaactgtg agctggatgt gacgtcaac atcaaaaaacg 480
gacgctgtga gcagtttgtt aagaactcggtt ctgacaataa ggtatgtatgc tcgtgcacag 540
aggatatacg gctggcgag aaccaaaaat ctgcgcagcc cgcagtcggc ttcccttgc 600
ggagggttag cgtgtcacag actagcaagt tgacgagagc ggagactgtt ttccccgacg 660
tggactacgt caacagcacc gaagccggaa caatcctcga taacatcagc cagagcactc 720
agtccctcaaa tgactttacg agggtcgttag gtggtgagga cgcggaaaccc ggtcagttcc 780
cctggcaggt ggtattgaac ggaaaatgtc atgcctttt tggaggttcc attgtcaacg 840
agaagtggat tgcacacgcg gcacactgcg tagaaacagg agtggaaatc acggtagtgg 900
cgggagagca taacattgaa gagacagagc acacggaaaca aaagcgaaat gtcatcagaa 960
tcattccaca ccataactat aacgcggcaa tcaataactgtt ccattttgtt attgcgcac 1020
tggagcttgc cgaacatttg gtgtttaatt ctgcgtcactc cgtatcgggc tggggcagag 1080
aagagtatac aaacatcttgc tggaaatcg gctccgggtt cgtatcgggc tggggcagag 1140
tgttccataa gggtagatcc gcactgggtt tgcaataacct cagggtggcc ctcgtggatc 1200

-
gagccacttg tctgcgggtcc accaaattca caatctacaa caatatgttc tgcgggat 1260
tccatgaagg tgggagat agctgccagg gagactcagg gggtcccccgtgacggaaag 1320
tcgagggac gtcatttctg acgggaatta tctcatgggg agaggaatgt gcgatgaagg 1380
ggaaatatgg catctacact aaagtgtcac ggtatgtcaa ttggatcaag gaaaagacga 1440
aactcacgtg atcagccagc gtcgcctct gccccggcttgc cttctggcc atgccttct 1500
tctctccctt gcacctgtac ctcttggtct ttgaataaag cctgagtagg aaggccggcc 1560
ctcgagcatg catctaga 1578

10

<210> 14

<211> 848

<212> ARN

<213> Homo sapiens

ES 2 923 757 T3

<400> 14

```

aaauaagaga gaaaagaaga guaagaagaa auuaagagc caccauggug agcaaggcg 60
aggaggauaa cauggccauc aucaaggagu ucaugcgcuu caaggugcac auggagggcu 120
ccgugaacgg ccacgaguuc gagaucgagg gcgagggcg 9ggccgcccc uacgagggca 180
cccagaccgc caagcugaag gugaccaagg guggccccc gcccuiucgccc ugggacaaucc 240
uguccccuca guucauguac ggcuccaagg ccuacgugaa gcaccccgcc gacaucccg 300
acuacuugaa gcuguccuuc cccgagggcu ucaagugggg ggcgcgugaug aacuucgagg 360
acggcggcgu ggugaccgug acccaggacu ccuuccugca ggacggcgag uucaucuaca 420
aggugaagcu ggcgcggacc aacuuccccc cgcacggccc cguaaugcag aagaagacca 480
uggcuggga ggcuccuccc gagcggau gacccgagga cggcgccug aagggcgaga 540
ucaagcagag gcugaagcug aaggacggcg gccacuacga cgugagguc aagaccaccu 600
acaaggccaa gaagcccgug cagcugcccg ggcuccuacaa cguacaacauc aaguuggaca 660
ucaccuccca caacgaggac uacaccaucg uggaacaguac cgaacgcgccc gagggcggcc 720
acuccaccgg cgcauggac gagcuguaca agugagcugc cuucugcggg gciuugccuuc 780
uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc uguaccucuu ggucuuuugaa uaaagccuga 840
guaggaag 848

```

<210> 15

<211> 1838

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
caccatggaa gatgcgaaga acatcaagaa gggacctgcc ccgttttacc ctggggagga 120
cggtacagca ggagaacagc tccacaaggc gatgaaacgc tacggccctgg tccccggAAC 180
gattgcgtt accgatgcac atattgaggt agacatcaca tacgcagaat acttcgaaat 240
gtcggtgagg ctggcggaag cgatgaagag atatggtctt aacactaatc accgcacatcg 300
ggtgtgttcg gagaactcat tgcaagggtt catggccgtc cttggagcac ttttcatcg 360
ggtcgcagtc ggcgcagcga acgacatcta caatgagcg 9gaactcttga atagcatggg 420
aatctcccg cgcacggtc tggttgcgtt caaaaagggg ctgcagaaaa tcctcaacgt 480
gcagaagaag ctcccccattt ttcaaaagat catcattatg gatagcaaga cagattacca 540
agggttccag tcgatgtata cttttgtac atgcattttt cgcgcagggt ttaacgagta 600
tgacttcgtc cccgagtcat ttgacagaga taaaaccatc ggcgtatttga tgaattccctc 660
ggtagcacc ggtttgccaa aggggggtgc gttgccccac cgcactgtt gtgtcggtt 720
ctcgacgcgtt agggatccta tctttgttaa tcagatcatt cccgacacag caatccgtc 780
cgtgttacct tttcatcactg gttttggcat gttcacact gtcggctatt tgatttgcgg 840
ttcagggttc gtaacttatgt atcggttgcg ggaagaactt tttttgagat ctttgcaga 900
ttacaagatc cagtccggccc tccttgcgc aacgcctttc tcattctttcg cggaaatcgac 960
acttattgtt aagtatgacc ttccaaatct gcatgagatt gcctcagggg gacgcggcgct 1020
tagcaaggaa gtcggggagg cagtggccaa ggccttccac cttcccgaa ttccggcagg 1080
atacgggctc acggagacaaa catccgcgt ctttatcactc cccgagggtg acgataagcc 1140
gggagccgtc gggaaatggg tcccccttct tgaagccaa gtcgttagacc tcgacacggg 1200
aaaaaccctc ggagtgaacc agggggcgaa gctctgcgt agagggccga tgatcatgtc 1260
aggttacgtt aataaccctt aagcgacgaa tgcgttgcgtt gacaaggatg ggtggttgca 1320
ttccggagac attgcctatt gggatgagga tgacgttgc tttatcgtt atgcactt 1380
gagcttgcattt aataacaag gctatcagg tgcgttgcg gacgttgcgtt caatccgtt 1440
ccagcaccccc aacattttcg acggccggagt ggcggggttt cccgatgacg acgggggtga 1500
gctgccagcg gcccgtttag tcctcgaaca tggaaaaca atgaccggaa aggagatcg 1560
ggactacgtt gcatcacaag tgacgttgc gaaagaaactt aggggggggg tagtctttgt 1620

```

```

ggacgagggtc ccgaaaggct tgactggaa gcttgcgtt cgcaaaatcc gggaaatcc 1680
gattaaggca aagaaaggcg ggaaaatcgcc tgcgttgcgtt gtcgttgcgtt gggggctt 1740
ccttctggcc atgccttct tcttccctt gacgttgcgtt ctttgggtt ttgaataaaag 1800
ccttgcgtt aaggccggccg ctcgttgcgtt catctaga 1838

```

10

<210> 16

ES 2 923 757 T3

<211> 1796

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 16

gggaaauuaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauuaag agccaccaug gaagaugcga 60
 agaacaucaa gaagggaccu gccccguuuu accuuuugga ggacgguaca gcaggagaac 120
 agcuccacaa ggcgaugaaa cgcuacgccc uggucccccgg aacgauuugcg uuuaccgaug 180
 cacauauuga gguagacauc acauacgcag aauacuucga aaugucggug aggciugcgg 240
 aagcgaugaa gagauauggu cuuaacacua aucaccgcau cguggugugu ucggagaacu 300
 cauugcaguu uuucaugccg guccuuggag cacuuuuucau cggggucgca gucgcgccag 360
 cgaacgacau cuacaaugag cgggaacucu ugaauagcau gggaaucucc cagccgacgg 420
 ucguguuuug cuccaaaaag gggcugcaga aauuccucaa cgugcagaag aagcucccca 480
 uuauucaaaa gaucaucau auggauagc agacagauua ccaaggguuc cagucauqu 540
 auaccuuuug gadaucgcau uugccgccc gguuuuacga guaugacuuc gucccccqagu 600
 cauugacag agauaaaaacc aucgcgcuga uuaugaauc cugugguac accgguiugc 660
 caaagggggu ggcgiugccc caccgcacug cuugugugcg guucgcac gcuagggauc 720
 cuaucuugg uaaucagauc auuuccgaca cagcaauucc guccguggua ccuuuuucauc 780
 acgguuuugg cauguucacg acucucggcu auuugauuug cgguiuucagg gucguacuua 840
 uguaucgguu cgaggaagaa cuguuuuuga guuccuugca agauuaacaag auccacuagg 900
 cccuccuuug gccaacgcuu uucucauucu uugcgaaauc gacacuuauu gauaaguau 960
 accuuuuccaa ucugcaugag auugccucag ggggagcgcc gcuuagcaag gaagucgggg 1020
 aggtagggc caagcgcuuc caccuucccg gaauiucggca gggauacggg cucacggaga 1080
 caacaucgcg gauccuuuauac acgcccggagg gugacgauaa gccgggagcc gucggaaaag 1140
 ugguccccuu cuuugaagcc aaggugcuag accucgacac gggaaaaacc cugggaguga 1200
 accagagggg cgagcucuugc gugagaggcg cgaugaucau gucaggguac gugaaauaacc 1260
 cugaagcgcac gaaugcgcug aucgacaagg auggugguu gcauucggga gacauuugccu 1320
 auugggauga ggaugagcac uucuuuuauc uagaucgacu uaagagcuiug aucaauuaca 1380
 aaggcuaaca gguagcgcu gccgagcucg agucaauucc gcuccaggcac cccaaacauuu 1440
 ucgacgcccgg aguggccggg uugccgaug acgacgcggg ugagcugcca gcggccgugg 1500
 uaguccucga acaugggaaa acaauggaccg aaaaggagau cguggacuac guagcaucac 1560
 aagugacgac ugcgaagaaa cugagggag ggguagucuu uguggacgag gucccgaaag 1620
 gcuugacugg gaagcugac gcucgcaaaa uccggggaaau ccugauuaag gcaaagaaaag 1680
 gcgaaaaau cgugcuguga uaagcugccu ucugcggggc uugccuucug gccaugccu 1740
 ucuucucucc cuugcaccug uaccucuugg ucuuugaaaua aagccugagu aggaag 1796

5

<210> 17

<211> 902

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagagc 60
 caccatggtg agcaagggcg aggagctgtt caccggggtg gtgcccattcc tggtcgagct 120
 ggacggcgcac gtaaacggcc acaaggctcg cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccc 180
 ctacggcaag ctgaccctga agttcatctg caccaccggc aagctgccc tgccctggcc 240
 caccctctgt accaccctga cctacggcg tcagtgcttc agccgttacc cccgaccat 300
 gaagcagcac gacttcttca agtccggcat gcccgaaggc tacgtccagg agcgcaccat 360
 cttcttcaag gacgacggca actacaagac cccgcggcggag gtgaagttcg agggcgacac 420
 cctggtaac cgcatcgagc tgaaggcat cgacttcaag gaggacggca acatctggg 480
 gcacaagctg gagtacaact acaacagcca caacgttcat atcatggccg acaagcagaa 540
 gaacggcata aaggtaact tcaagatccg ccacaaacatc gaggacggca gcgtcgagct 600
 cgccgaccac taccagcaga acaccccat cggcgacggc cccgtgtcg tgcccgacaa 660
 ccactacctg agcacccat ccccccgttag caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat 720
 ggtctctgtg gagttctgtga cccggccgg gatctactc ggcattggacg agctgtacaa 780
 gtaagctgcc ttctgcgggg ctgccttctt ggcctatgccc ttcttcttc cttgcaccc 840
 gtacctcttg gtcttgaat aaagcttgcg taggaaggcg gccgtcgag catgcacatcta 900

10

ga	902
<210> 18	
<211> 863	
5 <212> ARN	
<213> Homo sapiens	
<400> 18	
gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauauaag agccaccaug guguccaagg 60 gugaggaauu guuuaccggg guggugccua uucucgucga acuugacggg gaugugaaug 120 gacacaaguu uucgguaucc ggagaaggag agggugacgc cacauacgga aagcuuacac 180 ucaaaaauuau cuguacgacg gggaaacugc ccguacccug gccuacgcuc guaaccacgc 240 ugacuuuaagg agugcagugc uuuagcagau accccgacca uaugaaggcag cacgacuuucu 300 ucaagucggc gaugcccggag ggguacgugc aagagaggac cauuuuucuuc aaagacgaug 360 gcaauuacaa aacacgcgcga gaagucaagu uugagggcga uacucugguc aaucggauuc 420 aaaugaaggg aaucgauuuc aaagaagaug gaaacaucu ugcccuaaag cucgaguaca 480 acuauaacuc gcauaauguc uauaucauggcugacaagca gaaaaacggu aucaaaguca 540 acuuuaagau ccgacacaaau auugaggacg guucggugca gcuuugccggac cacuaucuac 600 agaaauacgcc gauuggggau ggucggucc uuuugccggua uaaccauuau cucucaaccc 660 agucagcccu gagcaaagau ccaaacgaga agagggacca caugggcuuug cucgaaauucg 720 ugacagcggc agggauacu cugggaauugg acgaguugua caagugauaa gcugccuuucu 780 gcggggcuiug cciucuggcc augcciuucu ucucuccuu gcaccuguac cucuuggucu 840 uugaaauaag ccugaguagg aag 863	
<210> 19	
10 <211> 716	
<212> ARN	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	
gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauauaag agccaccaug aacuuuucu 60 ugucaugggu gcacuggagc cuugcgcugc ugcuguaucu ucaucacgcu aaguggagcc 120 aggccgcacc cauggcgag gguggcgac agaaucacca cgaaguaguc aaauucaugg 180 acguguacca gaggucguau ugccaucga uugaaacucu uguggauauc uuucaagaa 240 accccgauga aaucgaguac uuuuucaaac cgucgugugu ccccucaug aggugccgggg 300 gaugcugcaa ugaugaaggg uuggagugug uccccacggc ggagucgaaau aucacaauugc 360 aaaucaugcg caucaaacca caucaggguc agcauauugg agagaugucc uuuucccagc 420 acaacaaaug ugaguguaga ccgaagaagg accgagcccg acaggaaaac ccaugcggac 480 cgugcuccga gggcgcaaa cacuuguucg uacaagaccc ccagacaugc aagugcucu 540 guaagaaauac cgauucgcgg uguagggcga gacagcugga auuqaacqag cgacacgugua 600 ggugcgacaa gccuagacgg ugacugccu ucugcggggc uugcciuucug gccaugccu 660 ucuucucucc ciugcaccug uaccucuugg uuuuugaaaua aagccugagu aggaag 716	
15 <210> 20	
<211> 758	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	

ES 2 923 757 T3

<400> 20

taatacgact cactataggg aaataagaga gaaaagaaga gtaagaagaa atataagac 60
caccatgaac tttctttgt catgggtca ctgggcctt ggcgtgcgc tgatcttc 120
tcacgctaag tggagccagg ccgcacccat ggccgggggt ggcggacaga ataccacga 180
agtatgtcaaa ttcatggacg tgtaccagag gtcgtattgc catccgattt aaactttgt 240
ggatatctt caagaatacc ccgatgaaat cgagtacatt ttcaaaacgt cgtgtgtccc 300
tctcatgagg tgccccggat gctcaatga tgaagggttg gagtgtgtcc ccacggagga 360
gtcaaatatc acaatgcaaa tcatgcgcac caaaccacat cagggtcacg atattggaga 420
gatgtcctt ctccagcaca acaaattgtga gttagacccg aagaaggacc gagcccgaca 480
ggaaaaccca tgccggaccgt gctccgagcg ggcacaaacac ttgttcgtac aagaccccca 540
gacatgcaag tgctcatgtt agaataccga ttcgcgggtt aaggcgagac agctggaatt 600
gaacgagcgc acgtgttagt ggcacaagcc tagacgggtga gctgccttc gcggggcttg 660
cctctggcc atgcccttc tctctccctt gcacctgtac ctcttggtct ttgaataaaag 720
cctgagtagg aaggcggccg ctcgagcatg catctaga 758

<210> 21

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
1 5 10 15
Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala
20 25 30

<210> 22

10 <211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu
1 5 10 15
Cys Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala
20 25

15 <210> 23

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Ser Leu Ile Thr
1 5 10 15
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30
Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg
35 40 45

20

ES 2 923 757 T3

<210> 24

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 24

Met Lys Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Ser Asn Leu Leu Leu Cys
1 5 10 15
Gln Ser Val Ala Pro
20

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 25

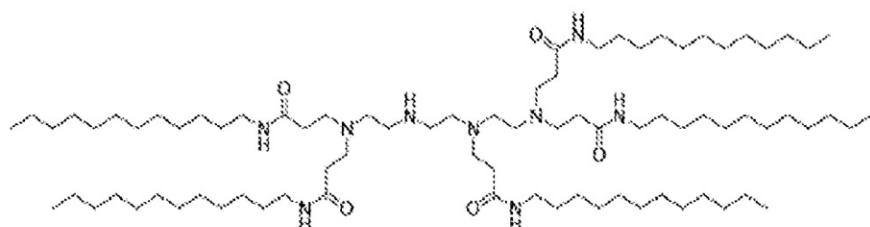
Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg
20

REIVINDICACIONES

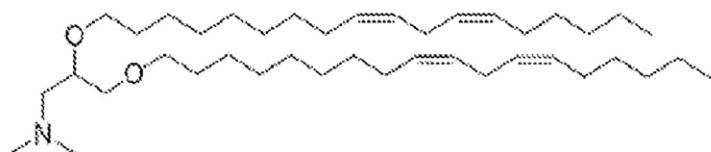
1. Una composición farmacéutica que comprende un ARNm modificado con 1-metil-pseudouridina que codifica un polipéptido de interés, en el que el ARNm se formula como una nanopartícula lipídica.
5
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el ARNm codifica un péptido o polipéptido inmunogénico.
3. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para usar en un procedimiento
10 para tratar o prevenir una enfermedad o afección en un ser humano o en otro mamífero.
4. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 3, en la que el ARNm codifica un péptido o polipéptido inmunogénico y se usa para desencadenar o provocar una respuesta inmune.
- 15 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2 o la composición farmacéutica para su uso de las reivindicaciones 3 o 4, en la que el ARNm codifica una secuencia polipeptídica para una vacuna.
6. La composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en la que la
20 composición se administra por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Figura 1

98N12-5 (TETA5-LAP)



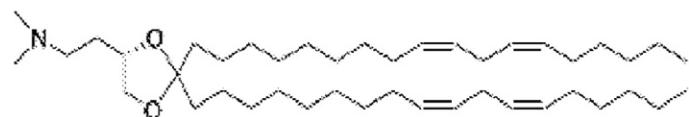
DLin-DMA



Dlin-K-DMA (2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano)



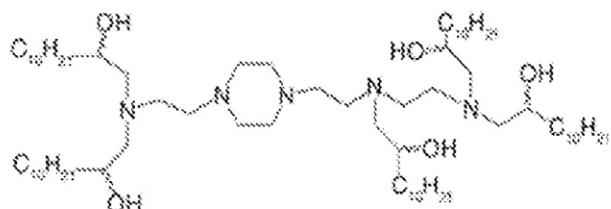
DLin-KC2-DMA



DLin-MC3-DMA



C12-200



TÉCNICA ANTERIOR

Figura 2

Only single cutters are shown in the map.

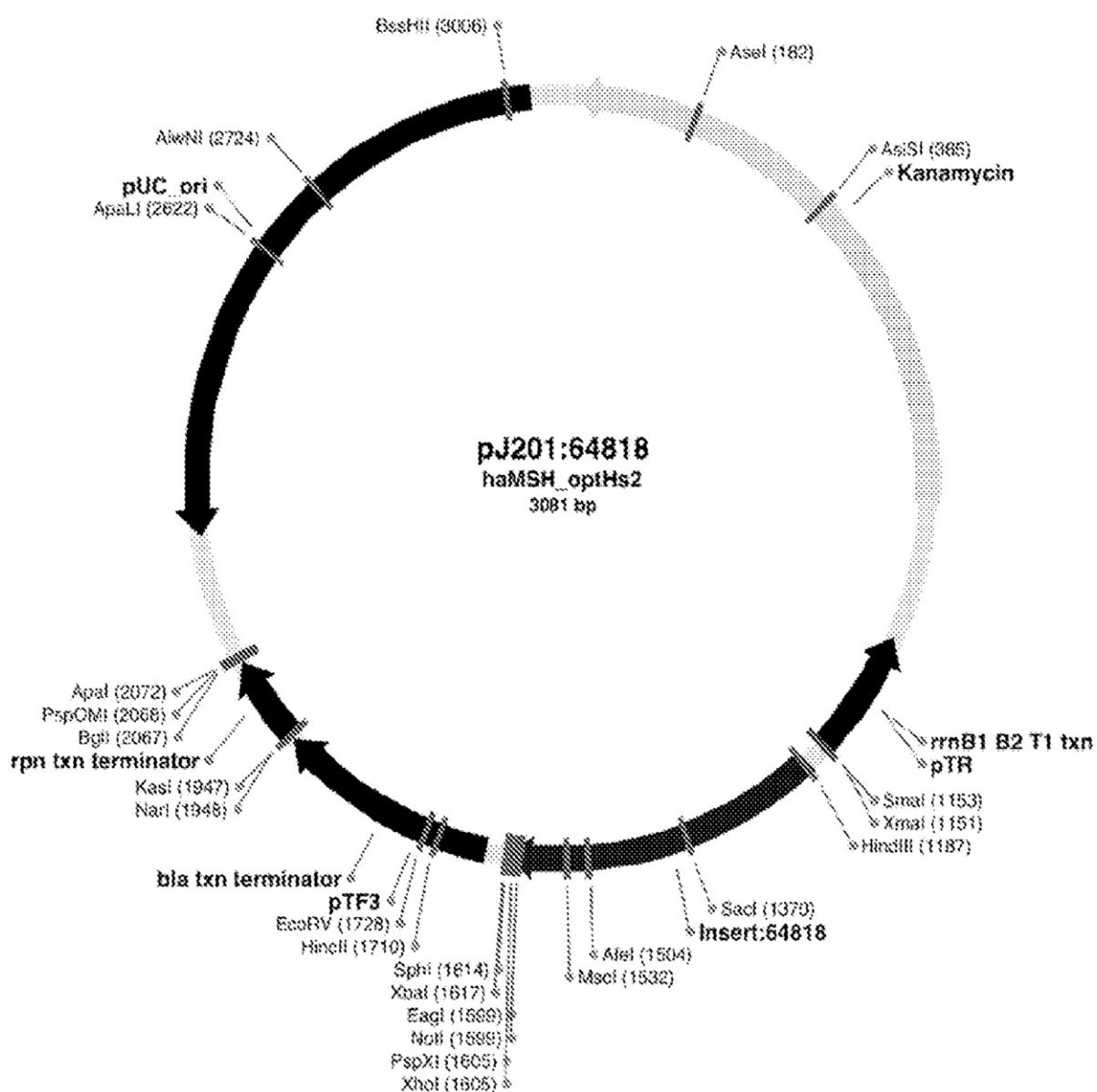


Figura 3

