(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 994 006**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/67 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2022 PCT/US2022/043808**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2023 WO23044006**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2022 E 22786641 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 4271818**

(54) Título: **Composiciones y métodos para producir polirribonucleótidos circulares**

(30) Prioridad:

17.09.2021 US 202163245354 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2025

(73) Titular/es:

FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS VI, LLC (100.00%)
55 Cambridge Parkway, 8th Floor
Cambridge, MA 02142, US

(72) Inventor/es:

DUDKIN, VADIM;
PAEK, KI, YOUNG;
DE BOER, ALEXANDRA, SOPHIE y
NELSON, JENNIFER, A.

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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 y métodos para producir polirribonucleótidos circulares

Antecedentes

Hay una necesidad de métodos para producir, purificar y usar polirribonucleótidos circulares.

Sumario de la invención

La divulgación proporciona composiciones y métodos para producir, purificar y usar ARN circular.

En un aspecto, la invención presenta un polirribonucleótido lineal que tiene la fórmula 5'-(A)-(B)-(C)-(D)-(E)-(F)-(G)-3'. El polirribonucleótido lineal incluye, de 5' a 3', (A) una mitad 3' de fragmento de intrón catalítico del Grupo I; (B) un sitio de corte y empalme 3'; (C) un fragmento de exón 3'; (D) una carga de polirribonucleótido; (E) un fragmento de exón 5'; (F) un sitio de corte y empalme 5'; y (G) una mitad 5' de fragmento de intrón catalítico del Grupo I. El polirribonucleótido incluye una primera región de apareamiento que tiene de 2 a 50, por ejemplo, de 5 a 50, por ejemplo, de 6 a 50, por ejemplo, de 7 a 50, por ejemplo, de 8 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos y está presente dentro de (A) la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I; (B) el sitio de corte y empalme 3'; o (C) el fragmento de exón 3'. El polirribonucleótido también incluye una segunda región de apareamiento que tiene de 2 a 50, por ejemplo, de 5 a 50, por ejemplo, de 6 a 50, por ejemplo, de 7 a 50, por ejemplo, de 8 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, por lo menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos y está presente dentro de (E) el fragmento de exón 5'; (F) el sitio de corte y empalme 5'; o (G) la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I. La primera región de apareamiento tiene del 80% al 100% (por ejemplo, del 85% al 100%, por ejemplo, del 90% al 100%, por ejemplo, el 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de complementariedad con la segunda región de apareamiento o tiene de cero a 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10), pares de bases mal apareadas.

En otro aspecto, la invención presenta un polirribonucleótido lineal que tiene la fórmula 5'-(A)-(B)-(C)-(D)-(E)-(F)-(G)-3'. El polirribonucleótido lineal incluye, de 5' a 3', (A) una mitad 3' del fragmento intrón catalítico del Grupo I; (B) un sitio de corte y empalme 3'; (C) un fragmento de exón 3'; (D) una carga de polirribonucleótido; (E) un fragmento de exón 5'; (F) un sitio de corte y empalme 5'; y (G) una mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I, en donde la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) son de un gen pre-ARNt-Leu de Cyanobacterium Anabaena. El polirribonucleótido incluye una primera región de apareamiento que tiene de 5 a 50, por ejemplo, de 6 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, por lo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos y está presente dentro de (A) la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I; (B) el sitio de corte y empalme 3'; o (C) el fragmento de exón 3'. El polirribonucleótido también incluye una segunda región de apareamiento que tiene de 5 a 50, por ejemplo, de 6 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, por lo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos y está presente dentro de (E) el fragmento de exón 5'; (F) el sitio de corte y empalme 5'; o (G) la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I. La primera región de apareamiento tiene del 80% al 100% (por ejemplo, del 85% al 100%, por ejemplo, del 90% al 100%, por ejemplo, el 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de complementariedad con la segunda región de apareamiento o tiene de cero a 10 por ejemplo, (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) pares de bases mal apareadas.

En otro aspecto, la invención presenta un polirribonucleótido lineal que tiene la fórmula 5'-(A)-(B)-(C)-(D)-(E)-(F)-(G)-3'. El polirribonucleótido lineal incluye, de 5' a 3', (A) una mitad 3' del fragmento intrón catalítico del Grupo I; (B) un sitio de corte y empalme 3'; (C) un fragmento de exón 3'; (D) una carga de polirribonucleótido; (E) un fragmento de exón 5'; (F) un sitio de corte y empalme 5'; y (G) una mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I, en donde la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) proceden de un pre-ARNr de Tetrahymena. El polirribonucleótido incluye una primera región de apareamiento que tiene de 6 a 50, por ejemplo, de 7 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, por lo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos y está presente dentro de (A) la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I; (B) el sitio de corte y empalme 3'; o (C) el fragmento de exón 3'. El polirribonucleótido también incluye una segunda región de apareamiento que tiene de 6 a 50, por ejemplo, de 7 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, por lo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos y está presente dentro de (E) el fragmento de exón 5'; (F) el sitio de corte y empalme 5'; o (G) la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I. La primera región de apareamiento tiene del 80% al

100% (por ejemplo, del 85% al 100%, por ejemplo, del 90% al 100%, por ejemplo, el 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de complementariedad con la segunda región de apareamiento o tiene de cero a 10 por ejemplo, (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) pares de bases mal apareadas.

En algunas realizaciones, (A) o (C) incluye la primera región de apareamiento y (E) o (G) incluye la segunda región de apareamiento.

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) incluye la primera región de apareamiento y el fragmento de exón 5' de (E) incluye la segunda región de apareamiento.

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) incluye la primera región de apareamiento y la mitad 5' del fragmento intrón catalítico del Grupo I de (G) incluye la segunda región de apareamiento.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) incluye la primera región de apareamiento y el fragmento de exón 5' de (E) incluye la segunda región de apareamiento.

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento incluyen cero o un par de bases mal apareadas.

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento son 100% complementarias.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) proceden de un gen pre-ARNt-Leu de la cianobacteria Anabaena, un pre-ARNt de Tetrahymena o un gen td del fago T4.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) proceden de un gen de pre-ARNt-Leu de Cyanobacterium Anabaena, y el fragmento de exón 3' de (C) incluye la primera región de apareamiento y el fragmento de exón 5' de (E) incluye la segunda región de apareamiento. La primera región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 5 a 50, por ejemplo, de 10 a 15 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, o 15) ribonucleótidos y la segunda región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 5 a 50, por ejemplo, de 10 a 15 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, o 15) ribonucleótidos.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) son de un pre-ARNr de Tetrahymena, y la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) incluye la primera región de apareamiento y el fragmento de exón 5' de (E) incluye la segunda región de apareamiento. En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) incluye la primera región de apareamiento y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) incluye la segunda región de apareamiento. La primera región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 6 a 50, por ejemplo, de 10 a 16 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16) ribonucleótidos, y la segunda región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 6 a 50, por ejemplo, de 10 a 16 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16) ribonucleótidos.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) son de un gen td de fago T4. El fragmento de exón 3' de (C) puede incluir la primera región de apareamiento y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) puede incluir la segunda región de apareamiento. La primera región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 2 a 16, por ejemplo, de 10 a 16 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16) ribonucleótidos, y la segunda región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 2 a 16, por ejemplo, de 10 a 16 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16) ribonucleótidos.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (A) es el extremo terminal 5' del polinucleótido lineal.

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento intrón catalítico del Grupo I de (G) es el extremo terminal 3' del polirribonucleótido lineal.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal no incluye una región de apareamiento adicional.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal no incluye una región de apareamiento 3' para (A) que incluye complementariedad de ácido nucleico parcial o completa con una región de apareamiento 5' para (G).

En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido de (D) incluye una secuencia de expresión, una secuencia no codificante, o una secuencia de expresión y una secuencia no codificante.

En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido de (D) incluye una secuencia de expresión que

codifica un polipéptido.

En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido de (D) incluye un IRES enlazado operativamente con una secuencia de expresión que codifica un polipéptido.

En algunas realizaciones, el IRES está situado en sentido ascendente de la secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el IRES está situado en sentido descendente de la secuencia de expresión.

En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido de (D) incluye una secuencia de expresión que codifica un polipéptido que tiene un efecto biológico en un sujeto.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal incluye además una primera región espaciadora entre el fragmento de exón 3' de (C) y la carga de polirribonucleótido de (D). La primera región espaciadora puede tener, por ejemplo, por lo menos 5 (por ejemplo, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20) ribonucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal incluye además una segunda región espaciadora entre la carga de polirribonucleótido de (D) y el fragmento de exón 5' de (E). La segunda región espaciadora puede tener, por ejemplo, por lo menos 5 (por ejemplo, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20) ribonucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, cada región espaciadora puede tener por lo menos 5 (por ejemplo, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20) ribonucleótidos de longitud. Cada región espaciadora tiene, por ejemplo, de 5 a 500 (por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500) ribonucleótidos de longitud. La primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora pueden incluir una secuencia poliA. La primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora pueden incluir una secuencia poliA-C. La primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora pueden incluir una secuencia poliA-G. La primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora pueden incluir una secuencia poliA-T. La primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora pueden incluir una secuencia aleatoria.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal tiene de 50 a 20.000, por ejemplo, de 100 a 20.000, por ejemplo, de 200 a 20.000, por ejemplo, de 300 a 20.000 (por ejemplo, 50, 100, 200, 300, 400, 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, 3,500, 4,000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000 o 20.000) ribonucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal tiene, por ejemplo, por lo menos 50, por lo menos 100, por lo menos 200, por lo menos 300, por lo menos 400, por lo menos 500, por lo menos 1.000, por lo menos 2.000, por lo menos 3.000, por lo menos 4.000 o por lo menos 5.000 ribonucleótidos de longitud.

En otro aspecto, la invención presenta un vector de ADN que incluye un promotor de ARN polimerasa enlazado operativamente a una secuencia de ADN que codifica el polirribonucleótido lineal de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente.

En otro aspecto, la invención presenta un polirribonucleótido circular (por ejemplo, un polirribonucleótido circular cerrado covalentemente) producido a partir del polirribonucleótido lineal o el vector de ADN de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente.

En otro aspecto, la invención presenta un polirribonucleótido circular (por ejemplo, un polirribonucleótido circular cerrado covalentemente) que tiene una unión de corte y empalme que une un fragmento de exón 5' y un fragmento de exón 3'. El fragmento de exón 3' incluye una primera región de apareamiento que incluye de 2 a 50, por ejemplo, de 5 a 50, por ejemplo, de 6 a 50, por ejemplo, de 7 a 50, por ejemplo, de 8 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos, y el fragmento de exón 5' incluye una segunda región de apareamiento que incluye de 2 a 50, por ejemplo, de 5 a 50, por ejemplo, de 6 a 50, por ejemplo, de 7 a 50, por ejemplo, de 8 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos. La primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento pueden incluir una complementariedad del 80% al 100% (por ejemplo, del 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%). La primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento incluyen de cero a 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) pares de bases (pb) mal apareadas. En algunas realizaciones, el polinucleótido circular incluye además una carga de polirribonucleótido. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una secuencia de expresión (o codificante), una secuencia no codificante, o una combinación de una secuencia de expresión (o codificante) y una secuencia no codificante. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una secuencia de expresión (codificante) que codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye un IRES enlazado operativamente con una secuencia de expresión que codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye además una región espaciadora entre el IRES y el fragmento de exón 3' o el fragmento de exón 5'. La región espaciadora puede tener, por ejemplo,

por lo menos 5 (por ejemplo, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20) ribonucleótidos de longitud. La región espaciadora puede tener, por ejemplo, de 5 a 500 (por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o 500) ribonucleótidos. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia poliA. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia poliA-C. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia poliA-G. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia poliA-T. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia aleatoria.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular tiene de 50 a 20.000, por ejemplo, de 100 a 20.000, por ejemplo, de 200 a 20.000, por ejemplo, de 300 a 20.000 (por ejemplo, 50, 100, 200, 300, 400, 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, 3.500, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000 o 20.000) ribonucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular tiene, por ejemplo, por lo menos 500, por lo menos 1.000, por lo menos 2.000, por lo menos 3.000, por lo menos 4.000 o por lo menos 5.000 ribonucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular se produce a partir de un polirribonucleótido lineal o vector como se describe en la presente.

En otro aspecto, la invención presenta un método para expresar un polipéptido en una célula proporcionando a la célula un polirribonucleótido lineal, un vector de ADN o un polirribonucleótido circular como se describe en la presente. El método incluye además permitir que la maquinaria celular exprese el polipéptido a partir del polirribonucleótido.

En otro aspecto, la invención presenta un método para producir un polirribonucleótido circular como se describe en la presente proporcionando un polirribonucleótido lineal como se describe en la presente en condiciones adecuadas para el auto-corte y empalme del polirribonucleótido lineal para producir el polirribonucleótido circular.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente divulgación, a continuación se definen una serie de términos. Los términos definidos en la presente tienen el significado entendido comúnmente por una persona experta en las áreas relevantes para la divulgación. No se pretende que términos como "un", "uno" y "el" se refieran únicamente a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la que puede usarse un ejemplo específico a modo de ilustración. El término "o" se usa para referirse a "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere sólo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación admite una definición que se refiere sólo a alternativas y a "y/o". La terminología empleada en la presente se usa para describir realizaciones específicas, pero su uso no debe considerarse limitativo, excepto en los casos indicados en las reivindicaciones.

Como se usa en la presente, cualquier valor proporcionado en un intervalo de valores incluye los límites superior e inferior, y cualquier valor contenido dentro de los límites superior e inferior.

Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a un valor que está dentro de ± 10% de un valor enumerado.

Como se usa en la presente, el término "portador" es un compuesto, composición, reactivo o molécula que facilita el transporte o la entrega de una composición (por ejemplo, un polirribonucleótido circular) en una célula mediante una modificación covalente del polirribonucleótido circular, a través de un agente parcial o completamente encapsulante, o una combinación de los mismos. Ejemplos no limitativos de portadores incluyen portadores de carbohidratos (por ejemplo, un fitoglicógeno modificado con anhídrido o un material de tipo glucógeno), nanopartículas (por ejemplo, una nanopartícula que encapsula o está enlazada covalentemente al polirribonucleótido circular), liposomas, fusosomas, reticulocitos diferenciados ex vivo, exosomas, portadores proteicos (por ejemplo, una proteína enlazada covalentemente al polirribonucleótido circular), o portadores catiónicos (por ejemplo, un lipopolímero catiónico o un reactivo de transfección).

Como se usa en la presente, los términos "polirribonucleótido circular" y "ARN circular" se usan indistintamente y se refieren a una molécula de polirribonucleótido que tiene una estructura que no tiene extremos libres (es decir, sin extremos 3' o 5' libres), por ejemplo, una molécula de polirribonucleótido que forma una estructura circular o sin extremos mediante enlaces covalentes o no covalentes. El polirribonucleótido circular puede ser, por ejemplo, un polirribonucleótido cerrado covalentemente.

Como se usa en la presente, el término "eficiencia de circularización" es una medida del polirribonucleótido circular resultante frente a su material de partida no circular.

Como se usan en la presente, los términos "enfermedad", "trastorno" y "afección" se refieren a un estado de salud subóptimo, por ejemplo, un estado que es o sería típicamente diagnosticado o tratado por un profesional médico.

Por "heterólogo" se entiende que se produce en un contexto distinto al natural (nativo). Una secuencia de polinucleótidos "heteróloga" indica que la secuencia de polinucleótidos se usa de una manera distinta a la que se encuentra en el genoma nativo de esa secuencia. Por ejemplo, un "promotor heterólogo" se usa para impulsar la transcripción de una secuencia que no es una que se transcribe de manera nativa por ese promotor; por lo tanto, una secuencia de "promotor heterólogo" se incluye a menudo en un constructo de expresión por medio de técnicas de ácido nucleico recombinante. El término "heterólogo" también se usa para referirse a una secuencia dada que se coloca en una relación no natural con otra secuencia; por ejemplo, una secuencia de nucleótidos codificante o no codificante heteróloga se inserta comúnmente en un genoma mediante técnicas de transformación genómica, dando como resultado un genoma modificado genéticamente o recombinante.

Como se usa en la presente, "aumentar la aptitud" o "promover la aptitud" de un sujeto se refiere a cualquier alteración favorable en la fisiología, o de cualquier actividad llevada a cabo por un organismo sujeto, como consecuencia de la administración de un péptido o polipéptido descrito en la presente, incluyendo, pero no limitado a, uno o más de los siguientes efectos deseados: (1) aumento de la tolerancia al estrés biótico o abiótico en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (2) aumento del rendimiento o la biomasa en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (3) modificación del tiempo de floración en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (4) aumento de la resistencia a plagas o patógenos en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (4) aumento de la resistencia a herbicidas en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (5) aumentar la población de un organismo sujeto (por ejemplo, un insecto de importancia agrícola) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (6) aumentar la tasa reproductiva de un organismo sujeto (por ejemplo, un insecto, por ejemplo, una abeja o un gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (7) aumentar la movilidad de un organismo sujeto (por ejemplo, un insecto, por ejemplo, abeja o gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (8) aumentar el peso corporal de un organismo sujeto (por ejemplo, un insecto, por ejemplo, una abeja o gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (9) aumentar la tasa metabólica o la actividad de un organismo sujeto (por ejemplo, un insecto, por ejemplo, abeja o gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (10) aumentar la polinización (por ejemplo, el número de plantas polinizadas en un periodo de tiempo determinado) por un organismo sujeto (por ejemplo, un insecto, por ejemplo, una abeja o gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (11) aumentar la producción de un organismo sujeto (por ejemplo, insecto, por ejemplo, abeja o gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (12) aumentar el contenido de nutrientes del organismo sujeto (por ejemplo, insecto) (por ejemplo, proteínas, ácidos grasos o aminoácidos) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; o (13) aumentar la resistencia de un organismo sujeto a pesticidas (por ejemplo, un neonicotinoide (por ejemplo, imidacloprid) o un insecticida de organofósforo (por ejemplo, un fosforotioato, por ejemplo, fenitrotión)) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más, (14) aumentar la salud o reducir la enfermedad de un organismo sujeto, como un animal humano o no humano. Un aumento de la aptitud del huésped puede determinarse en comparación con un organismo sujeto al que no se ha administrado el agente modulador. Por el contrario, "disminuir la aptitud" de un sujeto se refiere a cualquier alteración desfavorable de la fisiología, o de cualquier actividad llevada a cabo por un organismo sujeto, como consecuencia de la administración de un péptido o polipéptido descrito en la presente, incluyendo, pero no limitado a, uno o más de los siguientes efectos previstos: (1) disminución de la tolerancia al estrés biótico o abiótico en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (2) disminución del rendimiento o la biomasa en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (3) modificación del tiempo de floración en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (4) disminución de la resistencia a plagas o patógenos en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (4) disminución de la resistencia a herbicidas en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (5) disminución de una población de un organismo sujeto (por ejemplo, un insecto de importancia agrícola) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (6) disminución de la tasa reproductiva de un organismo sujeto (por ejemplo, un insecto, por ejemplo, una abeja o un gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (7) disminución de la movilidad de un organismo sujeto (por ejemplo, un insecto, por ejemplo, abeja o gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (8) disminución del peso corporal de un organismo sujeto (por ejemplo, insecto, por ejemplo, abeja o gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (9) disminución de la tasa o actividad metabólica de un organismo sujeto (por ejemplo, insecto, por ejemplo, abeja o gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (10) disminución de la polinización (por ejemplo, número de plantas polinizadas en un período de tiempo determinado) por un organismo sujeto (por ejemplo, insecto, por ejemplo, abeja o gusano de seda) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (11) disminución de la producción del organismo sujeto (por ejemplo, insecto, por ejemplo, abeja o gusano de seda) en

aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; (12) disminución del contenido de nutrientes del organismo sujeto (por ejemplo, insecto) (por ejemplo, proteínas, ácidos grasos o aminoácidos) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más; o (13) disminución de la resistencia de un organismo sujeto a pesticidas (por ejemplo, un neonicotinoide (por ejemplo, imidacloprid) o un insecticida organofosforado (por ejemplo, un fosforotioato, por ejemplo, fenitrotión)) en aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% o más, (14) disminución de la salud o reducción de la enfermedad de un organismo sujeto, como un animal humano o no humano. Una disminución de la aptitud del huésped puede determinarse en comparación con un organismo sujeto al que no se ha administrado el agente modulador. Para los expertos en la técnica será evidente que ciertos cambios en la fisiología, fenotipo o actividad de un sujeto, por ejemplo, la modificación del tiempo de floración en una planta, pueden considerarse un aumento de la aptitud del sujeto o una disminución de la aptitud del sujeto, dependiendo del contexto (por ejemplo, para adaptarse a un cambio en el clima u otras condiciones ambientales). Por ejemplo, un retraso en el tiempo de floración (por ejemplo, de aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 100% menos plantas en una población que florece en una fecha determinada) puede ser una adaptación beneficiosa a primaveras más tardías o frías y, por lo tanto, puede considerarse que aumenta la aptitud de una planta; por el contrario, en el contexto de primaveras más tempranas o cálidas puede considerarse que el mismo retraso en el tiempo de floración disminuye la aptitud de una planta.

Como se usa en la presente, los términos "ARN lineal" o "polirribonucleótido lineal" o "molécula de polirribonucleótido lineal" se usan indistintamente y significan molécula de polirribonucleótido que tiene un extremo 5' y 3'. Uno o ambos extremos 5' y 3' pueden ser extremos libres o unidos a otra fracción. El ARN lineal incluye el ARN que no se ha sometido a circularización (por ejemplo, que está precircularizado) y que puede usarse como material de partida para la circularización.

Como se usa en la presente, el término "ribonucleótido modificado" significa un nucleótido con por lo menos una modificación en el azúcar, la nucleobase o el enlace internucleosídico.

Como se usa en la presente, el término "administración desnuda" es una formulación para la administración a una célula sin la ayuda de un portador y sin modificación covalente de una fracción que ayude a la administración a una célula. Una formulación de liberación desnuda está libre de reactivos de transfección, portadores catiónicos, portadores de carbohidratos, portadores de nanopartículas ni portadores de proteínas. Por ejemplo, una formulación de liberación desnuda de un polirribonucleótido circular es una formulación que comprende un polirribonucleótido circular sin modificación covalente y está libre de un portador.

Se pretende que el término "composición farmacéutica" divulgue también que el polirribonucleótido circular o lineal incluido dentro de una composición farmacéutica puede usarse para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

El término "polinucleótido", como se usa en la presente, significa una molécula que incluye una o más subunidades de ácido nucleico, o nucleótidos, y puede usarse indistintamente con "ácido nucleico" u "oligonucleótido". Un polinucleótido puede incluir uno o más nucleótidos seleccionados entre adenosina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U), o variantes de los mismos. Un nucleótido puede incluir un nucleósido y por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más grupos fosfato (PO3). Un nucleótido puede incluir una nucleobase, un azúcar de cinco carbonos (ribosa o desoxirribosa) y uno o más grupos fosfato. Los ribonucleótidos son nucleótidos en los que el azúcar es ribosa. Los polirribonucleótidos o ácidos ribonucleicos, o ARN, pueden referirse a macromoléculas que incluyen múltiples ribonucleótidos polimerizados mediante enlaces fosfodiéster. Los desoxirribonucleótidos son nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa. Como se usa en la presente, se entiende que una secuencia de polirribonucleótidos que enumera timina (T) representa uracilo (U).

Como se usa en la presente, el término "carga de polirribonucleótido" en la presente incluye cualquier secuencia que incluya por lo menos un polirribonucleótido. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una o varias secuencias de expresión, en donde cada secuencia de expresión codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una o varias secuencias no codificantes, como un polirribonucleótido que tiene funciones reguladoras o catalíticas. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una combinación de secuencias de expresión y no codificantes. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una o más secuencias de polirribonucleótidos descritas en la presente, como uno o varios elementos reguladores, elementos del sitio de entrada ribosómica interna (IRES) o secuencias espaciadoras.

Como se usan indistintamente en la presente, los términos "poliA" o "secuencia poliA" se refieren a una región contigua no traducida de una molécula de ácido nucleico de por lo menos 5 nucleótidos de longitud y que consiste en residuos de adenosina. En algunas realizaciones, una secuencia poliA tiene por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 30, por lo menos 40 o por lo menos 50 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, una secuencia poliA está situada 3' a (por ejemplo, en sentido descendente de) un marco de lectura abierto (por ejemplo, un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido), y la secuencia poliA está 3' a un elemento de terminación

(por ejemplo, un codón de parada) de tal manera que el poliA no se traduce. En algunas realizaciones, una secuencia poliA está situada 3' a un elemento de terminación y a una región no traducida 3'.

Como se usa en la presente, los elementos de un ácido nucleico están "conectados operativamente" si están colocados en el vector de tal manera que puedan transcribirse para formar un ARN lineal que, a continuación, pueda circularizarse en un ARN circular usando los métodos proporcionados en la presente.

Los polideoxirribonucleótidos o ácidos desoxirribonucleicos, o ADN, son macromoléculas que incluyen múltiples desoxirribonucleótidos que están polimerizados mediante enlaces fosfodiéster. Un nucleótido puede ser un nucleósido monofosfato o un nucleósido polifosfato. Un nucleótido es un desoxirribonucleósido polifosfato, como por ejemplo un desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP), que puede seleccionarse entre desoxiadenosina trifosfato (dATP), desoxicitidina trifosfato (dCTP), desoxiguanosina trifosfato (dGTP), uridina trifosfato (dUTP) y desoxitimidina trifosfato (dTTP) dNTPs, que incluyen etiquetas detectables, como etiquetas o marcadores luminiscentes (por ejemplo, fluoróforos). Un nucleótido puede incluir cualquier subunidad que pueda incorporarse a una cadena de ácido nucleico en crecimiento. Dicha subunidad puede ser una A, C, G, T o U, o cualquier otra subunidad que sea específica de una o más A, C, G, T o U complementarias, o complementaria de una purina (es decir, A o G, o variante de las mismas) o una pirimidina (es decir, C, T o U, o variante de las mismas). En algunos ejemplos, un polinucleótido es ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), o derivados o variantes de los mismos. En algunos casos, un polinucleótido es un ARN de interferencia corto (ARNip), un microARN (miARN), un ADN plasmídico (ADNp), un ARN de horquilla corta (ARNhc), un ARN nuclear pequeño (ARNnp), un ARN mensajero (ARNm), un ARNm precursor (ARNpre-m), ARN antisentido (ARNas), por nombrar algunos, y abarca tanto la secuencia nucleotídica como cualquier realización estructural de la misma, como de cadena sencilla, de cadena doble, de cadena triple, helicoidal, en horquilla, etc. En algunos casos, una molécula de polinucleótido es circular. Un polinucleótido puede tener varias longitudes. Una molécula de ácido nucleico puede tener una longitud de por lo menos aproximadamente 10 bases, 20 bases, 30 bases, 40 bases, 50 bases, 100 bases, 200 bases, 300 bases, 400 bases, 500 bases, 1 kilobase (kb), 2 kb, 3, kb, 4 kb, 5 kb, 10 kb, 50 kb, o más. Un polinucleótido puede aislarse de una célula o un tejido. Las realizaciones de polinucleótidos incluyen moléculas de ADN/ARN aisladas y purificadas, moléculas de ADN/ARN sintéticas y análogos sintéticos de ADN/ARN.

Las realizaciones de polinucleótidos, por ejemplo, polirribonucleótidos o polidesoxirribonucleótidos, incluyen polinucleótidos que contienen una o más variantes de nucleótidos, incluyendo nucleótidos no estándar, nucleótidos no naturales, análogos de nucleótidos o nucleótidos modificados. Ejemplos de nucleótidos modificados incluyen, entre otros, diaminopurina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-D46-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético(v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3- N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y similares. En algunos casos, los nucleótidos incluyen modificaciones en sus fracciones de fosfato, incluyendo modificaciones en una fracción de trifosfato. Ejemplos no limitativos de tales modificaciones incluyen cadenas de fosfato de mayor longitud (por ejemplo, una cadena de fosfato que tenga, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moléculas de fosfato) y modificaciones con moléculas de tiol (por ejemplo, alfa-tiotrifosfato y beta-tiotrifosfatos). En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico se modifican en la fracción de base (por ejemplo, en uno o más átomos que típicamente están disponibles para formar un enlace de hidrógeno con un nucleótido complementario o en uno o más átomos que típicamente no son capaces de formar un enlace de hidrógeno con un nucleótido complementario), en la fracción de azúcar o en la estructura principal de fosfato. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico contienen grupos modificados con aminas, como aminoalil 1-dUTP (aa-dUTP) y aminohexilacrilamida-dCTP (aha-dCTP) para permitir la unión covalente de fracciones reactivas con aminas, como ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS). Las alternativas a los pares de bases de ADN o los pares de bases de ARN estándar en los oligonucleótidos de la presente divulgación pueden proporcionar una mayor densidad en bits por mm cúbico, una mayor seguridad (resistente a la síntesis accidental o intencionada de toxinas naturales), una discriminación más fácil en polimerasas fotoprogramadas, o una estructura secundaria más baja. Tales pares de bases alternativos compatibles con polimerasas naturales y mutantes para síntesis de novo o de amplificación se describen en Betz K, Malyshev DA, Lavergne T, Welte W, Diederichs K, Dwyer TJ, Ordoukhanian P, Romesberg FE, Marx A. Nat. Chem. Biol. julio 2012;8(7):612-4.

Como se usa en la presente, "polipéptido" significa un polímero de residuos de aminoácidos (naturales o no naturales) enlazados entre sí la mayoría de las veces por enlaces peptídicos. El término, como se usa en la presente, se refiere a proteínas, polipéptidos y péptidos de cualquier tamaño, estructura o función. Los polipéptidos pueden incluir productos génicos, polipéptidos de origen natural, polipéptidos sintéticos, homólogos, ortólogos, paralogos, fragmentos y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores. Un polipéptido puede ser una molécula individual o un complejo multimolecular como un dímero, trímero o tetrámero. También pueden incluir polipéptidos de cadena sencilla o multicadena, como los anticuerpos o la insulina, y pueden estar asociados o enlazados. Lo más

habitual es encontrar enlaces disulfuro en los polipéptidos multicadena. El término polipéptido también puede aplicarse a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente.

Como se usa en la presente, el término "polipéptido modificador de plantas" se refiere a un polipéptido que puede alterar las propiedades genéticas (por ejemplo, aumentar la expresión génica, disminuir la expresión génica o alterar de otro modo la secuencia de nucleótidos del ADN o ARN), las propiedades epigenéticas o las propiedades bioquímicas o fisiológicas de una planta de tal manera que se produzca un cambio en la fisiología o el fenotipo de la planta, por ejemplo, un aumento o una disminución de la aptitud de la planta.

Como se usa en la presente, el término "elemento regulador" es una fracción, como una secuencia de ácido nucleico, que modifica la expresión de una secuencia de expresión dentro del polirribonucleótido circular o lineal.

Como se usa en la presente, un "espaciador" se refiere a cualquier secuencia contigua de nucleótidos (por ejemplo, de uno o más nucleótidos) que proporciona distancia o flexibilidad entre dos regiones de polinucleótidos adyacentes.

Como se usa en la presente, el término "identidad de secuencia" se determina mediante el alineamiento de dos secuencias peptídicas o dos secuencias nucleotídicas usando un algoritmo de alineamiento global o local. Las secuencias se denominan "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando comparten por lo menos un determinado porcentaje mínimo de identidad de secuencia cuando se alinean óptimamente (por ejemplo, cuando se alinean mediante programas como GAP o BESTFIT usando los parámetros predeterminados). El GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias en toda su longitud, maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de huecos. En general, se usan los parámetros predeterminados de GAP, con una penalización por creación de huecos = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y una penalización por extensión de huecos = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para los nucleótidos la matriz de puntuación predeterminada usada es nwsgapdna, y para las proteínas la matriz de puntuación predeterminada es Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Los alineamientos de secuencias y las puntuaciones para el porcentaje de identidad de secuencias se determinan, por ejemplo, usando programas informáticos, como el GCG Wisconsin Package, Version 10.3, disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA, o EmbossWin versión 2.10.0 (usando el programa "needle"). Alternativa o adicionalmente, el porcentaje de identidad se determina mediante la búsqueda en bases de datos, por ejemplo, usando algoritmos como FASTA, BLAST, etc. La identidad de secuencia se refiere a la identidad de secuencia en toda la longitud de la secuencia.

Como se usa en la presente, "estructurado" con respecto al ARN se refiere a una secuencia de ARN que el software RNAFold o herramientas de predicción similares predicen que formará una estructura (por ejemplo, un bucle de horquilla) consigo misma o con otras secuencias de la misma molécula de ARN.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a un organismo, como un animal, una planta o un microbio. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal vertebrado (por ejemplo, mamífero, ave, pez, reptil o anfibio). En algunas realizaciones, el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano, como un primate no humano (por ejemplo, monos, simios), un ungulado (por ejemplo, vacuno, búfalo, bisonte, oveja, cabra, cerdo, camello, llama, alpaca, ciervo, caballo, burro), carnívoro (por ejemplo, perro, gato), roedor (por ejemplo, rata, ratón) o lagomorfo (por ejemplo, conejo). En algunas realizaciones, el sujeto es un ave, como un miembro de los taxones aviares Galliformes (por ejemplo, pollos, pavos, faisanes, codornices), Anseriformes (por ejemplo, patos, gansos), Paleaognathae (por ejemplo, avestruces, emúes), Columbiformes (por ejemplo, palomos, palomas) o Psittaciformes (por ejemplo, loros). En algunas realizaciones, el sujeto es un invertebrado, como un artrópodo (por ejemplo, insectos, arácnidos, crustáceos), un nematodo, un anélido, un helminto o un molusco. En algunas realizaciones, el sujeto es una plaga agrícola invertebrada o un invertebrado parásito de un huésped invertebrado o vertebrado. En algunas realizaciones, el sujeto es una planta, como una planta angiosperma (que puede ser dicotiledónea o monocotiledónea) o una planta gimnosperma (por ejemplo, una conífera, una cicadácea, un gnetófito, un Ginkgo), un helecho, una cola de caballo, un musgo o un briofito. En algunas realizaciones, el sujeto es un alga eucariota (unicelular o pluricelular). En algunas realizaciones, el sujeto es una planta de importancia agrícola u hortícola, como plantas de cultivo en hilera, plantas y árboles frutales, hortalizas, árboles y plantas ornamentales, incluyendo flores ornamentales, arbustos, árboles, plantas tapizantes y céspedes.

Como se usa en la presente, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a un tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, una enfermedad infecciosa, un cáncer, una toxicidad o una reacción alérgica) en un sujeto. El efecto del tratamiento puede incluir la reversión, el alivio, la reducción de la gravedad, la curación, la inhibición de la progresión, la reducción de la probabilidad de recurrencia de la enfermedad o de uno o más síntomas o manifestaciones de la enfermedad o trastorno, la estabilización (es decir, el no empeoramiento) del estado de la enfermedad o trastorno, o la prevención de la propagación de la enfermedad o trastorno en comparación con el estado o la condición de la enfermedad o trastorno en ausencia del tratamiento terapéutico. Las realizaciones incluyen el tratamiento de plantas para controlar una enfermedad o condición adversa provocada por o asociada con una plaga invertebrada o un patógeno microbiano (por ejemplo, bacteriano, fúngico,

oomiceto o viral). Las realizaciones incluyen el tratamiento de una planta para aumentar la defensa innata de la planta o la capacidad inmune para tolerar la presión de plagas o patógenos.

Como se usa en la presente, el término "elemento de terminación" es una fracción, como una secuencia de ácido nucleico, que termina la traducción de la secuencia de expresión en el polirribonucleótido circular o lineal.

Como se usa en la presente, el término "eficiencia de traducción" es una tasa o cantidad de producción de proteínas o péptidos a partir de un transcrito de ribonucleótido. En algunas realizaciones, la eficiencia de traducción puede expresarse como la cantidad de proteína o péptido producida por una cantidad dada de transcrito que codifica para la proteína o péptido, por ejemplo, en un periodo de tiempo dado, por ejemplo, en un sistema de traducción dado, por ejemplo, un sistema de traducción libre de células como el lisado de reticulocitos de conejo.

Como se usa en la presente, el término "secuencia de inicio de la traducción" es una secuencia de ácido nucleico que inicia la traducción de una secuencia de expresión en el polirribonucleótido circular o lineal.

Como se usa en la presente, el término "polipéptido terapéutico" se refiere a un polipéptido que, cuando se administra o se expresa en un sujeto, proporciona algún beneficio terapéutico. En algunas realizaciones, un polipéptido terapéutico se usa para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto mediante la administración del péptido terapéutico a un sujeto o mediante la expresión en un sujeto del polipéptido terapéutico. En realizaciones alternativas, un polipéptido terapéutico se expresa en una célula y la célula se administra a un sujeto para proporcionar un beneficio terapéutico.

Como se usa en la presente, un "vector" es un fragmento de ADN que está sintetizado (por ejemplo, usando PCR) o tomado de un virus, plásmido o célula de un organismo superior en el que puede insertarse o se ha insertado un fragmento de ADN extraño con propósitos de clonación o expresión. En algunas realizaciones, un vector puede mantenerse de forma estable en un organismo. Un vector puede incluir, por ejemplo, un origen de replicación, un marcador seleccionable o gen reportero, como resistencia a antibióticos o GFP, o un sitio de clonación múltiple (MCS). El término incluye fragmentos lineales de ADN (por ejemplo, productos de PCR, fragmentos de plásmidos linealizados), vectores plasmídicos, vectores virales, cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) y similares. En una realización, los vectores proporcionados en la presente incluyen un sitio de clonación múltiple (MCS). En otra realización, los vectores aquí proporcionados no incluyen un MCS.

Breve descripción de los dibujos

Las **FIGS. 1A** y **1B** son dibujos esquemáticos que muestran un intrón-exón permutado ejemplar de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (FIG. 1A) y un intrón-exón permutado ejemplar de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (FIG. 1B).

Las **FIG. 2A** y **2B** son dibujos esquemáticos que muestran las estructuras de un intrón-exón permutado ejemplar de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (FIG. 2A) y un intrón-exón permutado ejemplar de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (FIG. 2B).

Las **FIG. 3A** y **3B** son gráficos que muestran la eficiencia de circularización del intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1), el intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2) y Anabaena 3 con un ARN de 1,2 Kb (FIG. 3A) o un ARN de 4,5 Kb (FIG. 3B).

La **FIG. 4** es un gráfico que muestra la expresión relativa de Gluc a partir de ARN circular generado con intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1), intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2), o Anabaena 3 en tres puntos temporales diferentes.

La **FIG. 5** es un gráfico que muestra la expresión relativa de la proteína espiga del SARS-CoV-2 a partir de ARN circular generado con intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1), intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2), o Anabaena 3 en tres puntos temporales diferentes.

La **FIG. 6** es un dibujo esquemático que muestra diseños ejemplares de intrón-exón permutado de Anabaena con varias regiones de apareamiento extendidas entre E2 y E1.

La **FIG. 7** es un gráfico que muestra la eficiencia de circularización con el intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2), y el intrón-exón permutado de Anabaena con extensiones adicionales de 5, 10 o 15 nucleótidos de la región de apareamiento.

La **FIG. 8** es un gráfico que muestra la expresión con el intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2), y el intrón-exón permutado de Anabaena con extensiones adicionales de 5, 10 o 15 nucleótidos de la región de apareamiento en tres puntos temporales diferentes.

Las **FIGS. 9A** y **9B** son dibujos esquemáticos que muestran un intrón-exón permutado ejemplar de Tetrahymena con una región de apareamiento de 6 nucleótidos (FIG. 9A) y un intrón-exón permutado ejemplar de Tetrahymena con una región de apareamiento ampliada (FIG. 9B).

Las **FIG. 10A** y **10B** son dibujos esquemáticos que muestran las estructuras de un intrón-exón permutado ejemplar

de Tetrahymena con una región de apareamiento de 6 nucleótidos (FIG. 9A) y un intrón-exón permutado ejemplar de Tetrahymena con una región de apareamiento ampliada (FIG. 9B).

La **FIG. 11** es un gráfico que muestra la eficacia de circularización del intrón-exón permutado de Tetrahymena con una región de apareamiento de 6 nucleótidos (Tetrahymena 1) y del intrón-exón permutado de Tetrahymena con una región de apareamiento ampliada (Tetrahymena 2).

Las **FIGS. 12A** y **12B** son dibujos esquemáticos que muestran un intrón-exón permutado ejemplar de fago T4 con una región de apareamiento de 2 nucleótidos (FIG. 12A) y un intrón-exón permutado ejemplar de fago T4 con una región de apareamiento ampliada (FIG. 12B).

La **FIG. 13** es un gráfico que muestra la eficiencia de circularización del intrón-exón permutado de fago T4 con una región de apareamiento de 2 nucleótidos (fago T4 1) y el intrón-exón permutado de fago T4 con una región de apareamiento ampliada (fago T4 2).

Las **FIGS. 14A** y **14B** son dibujos esquemáticos que muestran un intrón-exón permutado ejemplar con una región de apareamiento (FIG. 14A) y un intrón-exón permutado ejemplar con una región de apareamiento ampliada (FIG. 14B).

Las **FIGS. 15A** y **15B** son dibujos esquemáticos que muestran las estructuras de un intrón-exón permutado ejemplar de Synechococcus con una región de apareamiento de 7 nucleótidos (FIG. 15A) y un intrón-exón permutado ejemplar de Synechococcus con una región de apareamiento modificada y ampliada (FIG. 15B).

Las **FIGS. 16A** y **16B** son dibujos esquemáticos que muestran las estructuras de un intrón-exón permutado ejemplar de Anabaena azollae con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (FIG. 16A) y un intrón-exón permutado ejemplar de Anabaena azollae con una región de apareamiento modificada y ampliada (FIG. 16B).

Las **FIGS. 17A** y **17B** son dibujos esquemáticos que muestran las estructuras de una Anabaena cylindrica ejemplar con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (FIG. 17A) y un intrón-exón permutado ejemplar de Anabaena cylindrica con una región de apareamiento modificada y ampliada (FIG. 17B).

Las **FIGS. 18A** y **18B** son dibujos esquemáticos que muestran las estructuras de un intrón-exón permutado ejemplar de Scytonema con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (FIG. 18A) y un intrón-exón permutado ejemplar de Scytonema con una región de apareamiento modificada y ampliada (FIG. 18B).

La **FIG. 19** es una tabla que muestra modificaciones ejemplares para varios intrones-exones permutados con una región de apareamiento. La negrita identifica la región de apareamiento original; la cursiva y el subrayado identifican modificaciones ejemplares para el apareamiento ampliado.

La **FIG. 20** es un gráfico que muestra el aumento de veces de circularización de varios intrón-exón permutados modificados con un ARN de 4,5 Kb con respecto al intrón-exón permutado no modificado (original) con un ARN de 4,5 Kb. Se observa una mayor eficiencia de circularización con intrones del grupo I con intrón-exón permutado con región de apareamiento E2-E1 ampliada.

La **FIG. 21A** es un dibujo esquemático que muestra la estructura secundaria del intrón de auto-corte y empalme de Anabaena. La región de permutación en P6b está resaltada. La **FIG. 21B** son dibujos esquemáticos que muestran las estructuras de diseños ejemplares de intrón-exón permutado de Anabaena con un tallo P6b ampliado (Anabaena 4) o con cambio de protuberancia de P6b a tallo (Anabaena 5).

La **FIG. 22** es un gráfico que muestra la eficiencia de circularización con el intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2), el intrón-exón permutado de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1), Anabaena 4 y Anabaena 5.

Descripción detallada

La presente invención presenta composiciones y métodos para producir un polirribonucleótido circular (ARN circular). Los polirribonucleótidos circulares descritos en la presente son particularmente útiles para administrar una carga de polinucleótidos (por ejemplo, la codificación de un gen o una proteína) a una célula diana.

Un polirribonucleótido circular puede producirse a partir de un polirribonucleótido lineal en el que los extremos se auto-cortan y empalman juntos, formando de este modo el polirribonucleótido circular. Las moléculas de ARN lineales descritas en la presente incluyen, de 5' a 3', (A) una mitad 3' de fragmento de intrón catalítico del Grupo I; (B) un sitio de corte y empalme 3'; (C) un fragmento de exón 3'; (D) una carga de polirribonucleótido; (E) un fragmento de exón 5'; (F) un sitio de corte y empalme 5'; y (G) una mitad 5' de fragmento de intrón catalítico del Grupo I. El polirribonucleótido incluye una primera región de apareamiento que tiene de 2 a 50, por ejemplo, de 8 a 50 ribonucleótidos y está presente dentro de (A) la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I; (B) el sitio de corte y empalme 3'; o (C) el fragmento de exón 3'. El polirribonucleótido también incluye una segunda región de apareamiento que tiene de 2 a 50, por ejemplo, de 8 a 50 ribonucleótidos y está presente dentro de (E) el fragmento de exón 5'; (F) el sitio de corte y empalme 5'; o (G) la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I. La primera región de apareamiento tiene una complementariedad del 80% al 100% con la segunda región de apareamiento o tiene de cero a 10 pares de bases mal apareadas. Estas características permiten que la primera región de apareamiento hibride con la segunda región de apareamiento, acercando de este modo los sitios de corte y empalme cerca de los extremos 5' y 3' del polirribonucleótido lineal. Una vez que los sitios de corte y empalme están cerca, el polirribonucleótido es capaz de auto-cortar y empalmar los sitios de corte y empalme 3' y 5', formando de este modo el polirribonucleótido circular.

Al incluir la primera región de apareamiento dentro de, por ejemplo, (A) la mitad 3' del fragmento de intrón

catalítico del Grupo I; (B) el sitio de corte y empalme 3'; o (C) el fragmento de exón 3', y la segunda región de apareamiento dentro de, por ejemplo, (E) el fragmento de exón 5'; (F) el sitio de corte y empalme 5'; o (G) la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I, la molécula lineal presenta una mayor eficiencia de circularización y fidelidad de corte y empalme en comparación con otros constructos de polirribonucleótidos que carecen de estas características. Además, al utilizar un intrón de auto-corte y empalme catalítico, la molécula lineal no necesita ser tratada con una enzima exógena, como una ligasa, para producir el polirribonucleótido circular. Esto es particularmente ventajoso para producir un producto circular en una única reacción. A continuación se describen con más detalle las moléculas, los métodos de producción y los usos de las mismas.

Polinucleótidos

La divulgación presenta composiciones de polirribonucleótidos circulares y métodos para elaborar polirribonucleótidos circulares. En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular se produce a partir de un polirribonucleótido lineal (por ejemplo, por auto-corte y empalme de extremos compatibles del polirribonucleótido lineal). En algunas realizaciones, un polirribonucleótido lineal se transcribe a partir de una plantilla de desoxirribonucleótido (por ejemplo, un vector, un vector linealizado o un ADNc). Por consiguiente, la divulgación presenta desoxirribonucleótidos, polirribonucleótidos lineales y polirribonucleótidos circulares y composiciones de los mismos útiles en la producción de polirribonucleótidos circulares.

Desoxirribonucleótidos plantilla

La presente invención presenta un desoxirribonucleótido plantilla para elaborar ARN circular. El desoxirribonucleótido incluye lo siguiente, enlazado operativamente en una orientación de 5' a 3': (A) una mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I; (B) un sitio de corte y empalme 3'; (C) un fragmento de exón 3'; (D) una carga de polirribonucleótido; (E) un fragmento de exón 5'; (F) un sitio de corte y empalme 5'; y (G) una mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I. En algunas realizaciones, el desoxirribonucleótido incluye elementos adicionales, por ejemplo, fuera de o entre cualquiera de los elementos (A), (B), (C), (D), (E), (F), o (G). En algunas realizaciones, cualquiera de los elementos (A), (B), (C), (D), (E), (F), o (G) está separado entre sí por una secuencia espaciadora, como se describe en la presente.

En algunas realizaciones, el desoxirribonucleótido es, por ejemplo, un vector de ADN circular, un vector de ADN linealizado o un ADN lineal (por ejemplo, un ADNc, por ejemplo, producido a partir de un vector de ADN).

En algunas realizaciones, el desoxirribonucleótido incluye además un promotor de ARN polimerasa enlazado operativamente con una secuencia que codifica un ARN lineal descrito en la presente. En algunas realizaciones, el promotor de la ARN polimerasa es heterólogo a la secuencia que codifica el ARN lineal. En algunas realizaciones, el promotor de la ARN polimerasa es un promotor T7, un promotor T6, un promotor T4, un promotor T3, un promotor del virus SP6 o un promotor SP3.

En algunas realizaciones, el desoxirribonucleótido incluye un sitio de clonación múltiple (MCS).

En algunas realizaciones, el desoxirribonucleótido se usa para producir ARN circular con un intervalo de tamaño de aproximadamente 100 a aproximadamente 20.000 nucleótidos. En algunas realizaciones, el ARN circular tiene por lo menos 100, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 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, 3.500, 4.000, 4.500 o 5.000 nucleótidos. En algunas realizaciones, el ARN circular no tiene más de 20.000, 15.000, 10.000, 9.000, 8.000, 7.000, 6.000, 5.000 o 4.000 nucleótidos.

Polirribonucleótidos lineales

La presente invención también presenta polirribonucleótidos lineales que incluyen lo siguiente, enlazados operativamente en una orientación de 5' a 3': (A) una mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I; (B) un sitio de corte y empalme 3'; (C) un fragmento de exón 3'; (D) una carga de polirribonucleótido; (E) un fragmento de exón 5'; (F) un sitio de corte y empalme 5'; y (G) una mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I. En realizaciones, el polirribonucleótido lineal incluye elementos adicionales, por ejemplo, fuera de o entre cualquiera de los elementos (A), (B), (C), (D), (E), (F), o (G). Por ejemplo, cualquiera de los elementos (A), (B), (C), (D), (E), (F) o (G) puede estar separado por una secuencia espaciadora, como se describe en la presente.

En ciertas realizaciones, se proporciona en la presente un método para generar ARN lineal realizando la transcripción en un sistema libre de células (por ejemplo, transcripción in vitro) usando un desoxirribonucleótido (por ejemplo, un vector, vector linealizado o ADNc) proporcionado en la presente como plantilla (por ejemplo, un vector, vector linealizado o ADNc proporcionado en la presente con un promotor de ARN polimerasa situado en sentido ascendente de la región que codifica para el ARN lineal).

En algunas realizaciones, se transcribe una plantilla de desoxirribonucleótidos para producir un ARN lineal que contenga los componentes descritos en la presente. Tras la expresión, el polirribonucleótido lineal produce un

polirribonucleótido compatible con el corte y empalme, que puede auto-cortarse y empalmarse para producir un polirribonucleótido circular.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal tiene de 50 a 20.000, de 100 a 20.000, de 200 a 20.000, de 300 a 20.000 (por ejemplo, 50, 100, 200, 300, 400, 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, 3,500, 4,000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 11.000, 12.000, 13.000, 14.000, 15.000, 16.000, 17.000, 18.000, 19.000 o 20.000) ribonucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal tiene, por ejemplo, por lo menos 500, por lo menos 1.000, por lo menos 2.000, por lo menos 3.000, por lo menos 4.000 o por lo menos 5.000 ribonucleótidos de longitud.

Polirribonucleótidos circulares

En algunas realizaciones, la invención presenta un polirribonucleótido circular (por ejemplo, un polirribonucleótido circular cerrado covalentemente). En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye una unión de corte y empalme que une un fragmento de exón 5' y un fragmento de exón 3'. En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' incluye la primera región de apareamiento que tiene de 2 a 50, por ejemplo, de 8 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos, y el fragmento de exón 5' incluye la segunda región de apareamiento que tiene de 2 a 50, por ejemplo, de 8 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos. En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento incluyen una complementariedad del 80% al 100% (por ejemplo, del 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%). En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento incluyen de cero a 10 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) pares de bases mal apareadas.

En algunas realizaciones, el polinucleótido circular incluye además una carga de polirribonucleótido. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una secuencia de expresión (o codificante), una secuencia no codificante, o una combinación de una secuencia de expresión (codificante) y una secuencia no codificante. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una secuencia de expresión (codificante) que codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye un IRES enlazado operativamente a una secuencia de expresión que codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, el IRES está situado en sentido ascendente de la secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el IRES está situado en sentido descendente de la secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye además una región espaciadora entre el IRES y el fragmento de exón 3' o el fragmento de exón 5'. La región espaciadora puede tener, por ejemplo, por lo menos 5 (por ejemplo, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20) ribonucleótidos de longitud. La región espaciadora puede tener, por ejemplo, de 5 a 500 (por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, o 500) ribonucleótidos. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia poliA. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia poliA-C. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia poliA-G. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia poliA-T. En algunas realizaciones, la región espaciadora incluye una secuencia aleatoria. En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento se unen, formando de este modo un polirribonucleótido circular.

En algunas realizaciones, el ARN circular se produce mediante una plantilla de desoxirribonucleótidos o un ARN lineal descrito en la presente. En algunas realizaciones, el ARN circular se produce mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular tiene por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 40 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 75 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 200 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 400 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 500 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 1.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 2.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 5,000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 6.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 7.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 8.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 9.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 10.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 12.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 14,000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 15.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 16.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 17.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 18.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 19.000 nucleótidos o por lo menos aproximadamente 20.000 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular tiene un tamaño suficiente para alojar un sitio de unión para un ribosoma. En algunas realizaciones, el tamaño de un polirribonucleótido circular es una longitud suficiente para codificar polipéptidos útiles, por ejemplo, pueden producirse por lo menos 20.000 nucleótidos, por lo menos

15.000 nucleótidos, por lo menos 10.000 nucleótidos, por lo menos 7.500 nucleótidos, por lo menos 5.000 nucleótidos, por lo menos 4.000 nucleótidos, por lo menos 3.000 nucleótidos, por lo menos 2.000 nucleótidos, por lo menos 1.000 nucleótidos, por lo menos 500 nucleótidos, por lo menos 1.400 nucleótidos, por lo menos 300 nucleótidos, por lo menos 200 nucleótidos o por lo menos 100 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye uno o más elementos descritos en otra parte de la presente. En algunas realizaciones, los elementos están separados entre sí por una secuencia espaciadora. En algunas realizaciones, los elementos están separados entre sí por 1 ribonucleótido, 2 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 15 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 150 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 900 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, hasta aproximadamente 1 kb, por lo menos aproximadamente 1000 nucleótidos, o cualquier cantidad de nucleótidos intermedia. En algunas realizaciones, uno o más elementos son contiguos entre sí, por ejemplo, carecen de un elemento espaciador.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye uno o más elementos repetitivos descritos en otra parte de la presente. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye una o más modificaciones descritas en otra parte de la presente. En una realización, el ARN circular contiene por lo menos una modificación nucleosídica. En una realización, hasta el 100% de los nucleósidos del ARN circular están modificados. En una realización, por lo menos una modificación de nucleósido es una modificación de uridina o una modificación de adenosina.

Como resultado de su circularización, el polirribonucleótido circular puede incluir ciertas características que lo distinguen del ARN lineal. Por ejemplo, el polirribonucleótido circular es menos susceptible a la degradación por la exonucleasa en comparación con el ARN lineal. Como tal, el polirribonucleótido circular es más estable que un ARN lineal, especialmente cuando se incuba en presencia de una exonucleasa. La estabilidad aumentada del polirribonucleótido circular en comparación con el ARN lineal hace que el polirribonucleótido circular sea más útil como reactivo de transformación celular para producir polipéptidos y pueda almacenarse más fácilmente y durante más tiempo que el ARN lineal. La estabilidad del polirribonucleótido circular tratado con exonucleasa puede comprobarse usando métodos estándar de la técnica que determinan si se ha producido la degradación del ARN (por ejemplo, mediante electroforesis en gel). Además, a diferencia del ARN lineal, el polirribonucleótido circular es menos susceptible a la desfosforilación cuando el polirribonucleótido circular se incuba con fosfatasa, como la fosfatasa de intestino de ternera.

Regiones de apareamiento

Las composiciones de polinucleótidos descritas en la presente pueden incluir dos o más regiones de apareamiento, por ejemplo, dos o más regiones de apareamiento descritas en la presente. Una región de apareamiento, o un par de regiones de apareamiento, son aquellas que contienen una porción con un alto grado de complementariedad que promueve la hibridación en condiciones adecuadas.

Una región de apareamiento incluye por lo menos una región de complementariedad como se describe en la presente. El alto grado de complementariedad de la región complementaria promueve la asociación de pares de regiones de apareamiento. Cuando una primera región de apareamiento (por ejemplo, una región de apareamiento 5') está localizada en o cerca del extremo 5' de un ARN lineal y una segunda región de apareamiento (por ejemplo, una región de apareamiento 3') está localizada en o cerca del extremo 3' de un ARN lineal, la asociación de las regiones de apareamiento acerca los fragmentos 5' y 3' y los fragmentos de intrón correspondientes. En algunas realizaciones, esto favorece la circularización del ARN lineal por corte y empalme de los sitios de corte y empalme 3' y 5'. En algunas realizaciones, las regiones de apareamiento descritas en la presente refuerzan las regiones de apareamiento que se producen de manera natural, por ejemplo, para favorecer el auto-corte y empalme.

Una región de apareamiento puede alterarse introduciendo una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más) mutaciones en la secuencia de polirribonucleótidos. Por ejemplo, una región de apareamiento puede ampliarse introduciendo una o más mutaciones puntuales en una primera región de apareamiento y/o una segunda región de apareamiento para aumentar la longitud de complementariedad entre la primera y la segunda regiones de apareamiento. La región de apareamiento también puede alterarse insertando uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más) nucleótidos en el polirribonucleótido. En algunas realizaciones, una región de apareamiento se amplía insertando uno o más nucleótidos en una primera región de apareamiento y/o una segunda región de apareamiento para aumentar la longitud de complementariedad entre la primera y la segunda regiones de apareamiento. En algunas realizaciones, la región de apareamiento se amplía introduciendo una o más mutaciones puntuales en una primera región de apareamiento y/o una segunda región e insertando uno o más nucleótidos en la primera región de apareamiento y/o la segunda región

de apareamiento para aumentar la longitud de complementariedad. La alteración de la región de apareamiento puede alterar la estructura secundaria del polirribonucleótido favoreciendo una protuberancia o región mal apareada con la secuencia original para formar preferentemente una estructura de tallo o bucle de tallo con la secuencia alterada.

El polirribonucleótido incluye una primera región de apareamiento que tiene de 2 a 50, de 5 a 50, de 6 a 50, de 7 a 50, o de 8 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, por lo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos y está presente dentro de (A) la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I; (B) el sitio de corte y empalme 3'; o (C) el fragmento de exón 3'. El polirribonucleótido también incluye una segunda región de apareamiento que tiene de 2 a 50, de 5 a 50, de 6 a 50, de 7 a 50, o de 8 a 50 (por ejemplo, de 10 a 30, de 10 a 20, o de 10 a 15, por ejemplo, por lo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50) ribonucleótidos y está presente dentro de (E) el fragmento de exón 5'; (F) el sitio de corte y empalme 5'; o (G) la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I. La primera región de apareamiento tiene del 80% al 100% (por ejemplo, del 85% al 100%, por ejemplo, del 90% al 100%, por ejemplo, el 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de complementariedad con la segunda región de apareamiento o tiene de cero a 10 por ejemplo, (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) pares de bases mal apareadas.

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento son 100% complementarias.

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- TCCGT -3' (SEQ ID NO: 1), y la segunda región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- ACGGA -3' (SEQ ID NO: 2).

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- TCCGTAGCGTCT -3' (SEQ ID NO: 5), y la segunda región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'- AGACGCTACGGA -3' (SEQ ID NO: 6).

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- TCCGTAGCGTCTAAACG -3' (SEQ ID NO: 22), y la segunda región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'- CGTTTAGACGCTACGGA -3' (SEQ ID NO: 23).

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- TCCGTAGCGTCTAAACGGTCGT -3' (SEQ ID NO: 24), y la segunda región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'- ACGACCGTTTAGACGCTACGGA -3' (SEQ ID NO: 25).

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- TCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGG -3' (SEQ ID NO: 26), y la segunda región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'- CCCACACGACCGTTTAGACGCTACGGA -3' (SEQ ID NO: 27).

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- AAGGTA -3' (SEQ ID NO: 13), y la segunda región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- TACCTT -3' (SEQ ID NO: 14).

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- AAGGTAAATATT -3' (SEQ ID NO: 16), y la segunda región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- AATATTTACCTT -3' (SEQ ID NO: 17).

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento tiene la secuencia 5'- CT -3', y la segunda región de apareamiento tiene la secuencia 5'- AG -3'.

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- CTCAATT -3' (SEQ

ID NO: 20), y la segunda región de apareamiento tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- AATTGAG -3' (SEQ ID NO: 21).

En algunas realizaciones, (A) o (C) incluye la primera región de apareamiento y (E) o (G) incluye la segunda región de apareamiento.

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) incluye la primera región de apareamiento y el fragmento de exón 5' de (E) incluye la segunda región de apareamiento.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) incluye la primera región de apareamiento y el fragmento de exón 5' de (E) incluye la segunda región de apareamiento.

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) incluye la primera región de apareamiento y la mitad 5' del fragmento intrón catalítico del Grupo I incluye la segunda región de apareamiento.

En algunas realizaciones, la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento incluyen ninguna o un par de bases mal apareadas.

En algunas realizaciones, una región de apareamiento incluye además una región no complementaria como se describe a continuación. Una región no complementaria puede añadirse a la región complementaria para permitir que los extremos del ARN permanezcan flexibles, no estructurados o menos estructurados que la región complementaria.

En algunas realizaciones, cada región de apareamiento incluye de 2 a 100, de 5 a 100, o de 6 a 100 ribonucleótidos (por ejemplo, de 6 a 80, de 6 a 50, de 6 a 30, de 6 a 20, de 10 a 100, de 10 a 80, de 10 a 50, o de 10 a 30 ribonucleótidos). En algunas realizaciones, una región de apareamiento 5' incluye de 2 a 100, de 5 a 100, de 6 a 100 ribonucleótidos (por ejemplo, de 6 a 80, de 6 a 50, de 6 a 30, de 6 a 20, de 10 a 100, de 10 a 80, de 10 a 50, o de 10 a 30 ribonucleótidos). En algunas realizaciones, una región de apareamiento 3' incluye de 6 a 100 ribonucleótidos (por ejemplo, de 6 a 80, de 6 a 50, de 6 a 30, de 6 a 20, de 10 a 100, de 10 a 80, de 10 a 50, o de 10 a 30 ribonucleótidos).

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido no incluye una región de apareamiento 3' para (A) que incluya complementariedad de ácido nucleico parcial o completa con una región de apareamiento 5' para (G).

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido no incluye una región de apareamiento adicional, por ejemplo, además de la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento.

Regiones complementarias

Una región complementaria es una región que favorece la asociación con una región complementaria correspondiente, en condiciones adecuadas. Por ejemplo, un par de regiones complementarias puede compartir un alto grado de complementariedad de secuencia (por ejemplo, una primera región complementaria es el complemento inverso de una segunda región complementaria, por lo menos en parte). Cuando dos regiones complementarias se asocian (por ejemplo, se hibridan), pueden formar una estructura secundaria altamente estructurada, como un tallo o un bucle de tallo.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye una región complementaria 5' y una región complementaria 3'. En algunas realizaciones, la región complementaria 5' tiene de 2 a 50, por ejemplo, de 5 a 50 ribonucleótidos (por ejemplo, 5-40, 5-30, 5-20, 5-10, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, o 20-50, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 ribonucleótidos). En algunas realizaciones, la región complementaria 3' tiene de 2 a 50, por ejemplo, de 5 a 50 ribonucleótidos (por ejemplo, 5-40, 5-30, 5-20, 5-10, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, o 20-50, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 ribonucleótidos).

En algunas realizaciones, la región complementaria 5' y la región complementaria 3' tienen de un 50% a un 100% de complementariedad de secuencia (por ejemplo, de un 60% a un 100%, de un 70% a un 100%, de un 80% a un 100%, de un 90% a un 100% o un 100%, por ejemplo, un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% de complementariedad de secuencia).

En algunas realizaciones, la región complementaria 5' y la región complementaria 3' tienen una energía libre de unión de menos de -5 kcal/mol (por ejemplo, de menos de -10 kcal/mol, de menos de -20 kcal/mol o de menos de -30 kcal/mol).

En algunas realizaciones, la región complementaria 5' y la región complementaria 3' tienen una Tm de unión

de por lo menos 10ºC, por lo menos 15ºC, por lo menos 20ºC, por lo menos 30ºC, por lo menos 40ºC, por lo menos 50ºC, por lo menos 60ºC, por lo menos 70ºC, por lo menos 80ºC, o por lo menos 90ºC.

En algunas realizaciones, la región complementaria 5' y la región complementaria 3' incluyen por lo menos uno pero no más de 10 mal apareamientos, por ejemplo, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 mal apareamientos, o 1 mal apareamiento (es decir, cuando la región complementaria 5' y la región complementaria 3' hibridan entre sí). Un mal apareamiento puede ser, por ejemplo, un nucleótido en la región complementaria 5' y un nucleótido en la región complementaria 3' que son opuestos entre sí (es decir, cuando la región complementaria 5' y la región complementaria 3' se hibridan) pero que no forman un par de bases Watson-Crick. Un mal apareamiento puede ser, por ejemplo, un nucleótido no apareado que forma un pliegue o protuberancia en la región complementaria 5' o en la región complementaria 3'. En algunas realizaciones, la región complementaria 5' y la región complementaria 3' no incluyen ningún mal apareamiento.

Regiones no complementarias

Una región no complementaria es una región que desfavorece la asociación con una región no complementaria correspondiente, en condiciones adecuadas. Por ejemplo, un par de regiones no complementarias puede compartir un bajo grado de complementariedad de secuencia (por ejemplo, una primera región no complementaria no es un complemento inverso de una segunda región no complementaria). Cuando dos regiones no complementarias están próximas, no forman una estructura secundaria altamente estructurada, como un tallo o un bucle de tallo.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye una región no complementaria 5' y una región no complementaria 3'. En algunas realizaciones, la región no complementaria 5' tiene de 5 a 50 ribonucleótidos (por ejemplo, 5-40, 5-30, 5-20, 5-10, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, o 20-50 ribonucleótidos). En algunas realizaciones, la región no complementaria 3' tiene de 5 a 50 ribonucleótidos (por ejemplo, 5-40, 5-30, 5-20, 5-10, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, o 20-50 ribonucleótidos).

En algunas realizaciones, la región no complementaria 5' está situada 5' a la región complementaria 5' (por ejemplo, entre el fragmento de intrón catalítico 5' y la región complementaria 5'). En algunas realizaciones, la región no complementaria 3' está situada 3' a la región complementaria 3' (por ejemplo, entre la región complementaria 3' y el fragmento de intrón catalítico 3').

En algunas realizaciones, la región no complementaria 5' y la región no complementaria 3' tienen del 0% al 50% de complementariedad de secuencia (por ejemplo, del 0%-40%, 0%-30%, 0%-20%, 0%-10%, o un 0% de complementariedad de secuencia).

En algunas realizaciones, la región no complementaria 5' y la región no complementaria 3' tienen una energía libre de unión de más de -5 kcal/mol.

En algunas realizaciones, la región complementaria 5' y la región complementaria 3' tienen una Tm de unión de menos de 10ºC.

En algunas realizaciones, la región no complementaria 5' y la región no complementaria 3' incluyen por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mal apareamientos.

Intrones catalíticos

Los polirribonucleótidos descritos en la presente incluyen fragmentos de intrones catalíticos, como (A) un fragmento de intrón catalítico de la mitad 3' del Grupo I y (G) un fragmento de intrón catalítico de la mitad 5' del Grupo I. La primera y la segunda regiones de apareamiento pueden situarse dentro de los fragmentos de intrón catalítico. Los intrones catalíticos del Grupo I son ribozimas de auto-corte y empalme que catalizan su propia escisión a partir de precursores de ARNm, ARNt y ARNr mediante un mecanismo de transferencia de forforilo de dos iones metálicos. Es importante destacar que el propio ARN autocataliza la eliminación del intrón sin necesidad de una enzima exógena, como una ligasa.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) proceden de un gen pre-ARNt-Leu de la cianobacteria Anabaena, o de un pre-ARNt de Tetrahymena.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) proceden de un gen de pre-ARNt-Leu de Cyanobacterium Anabaena, y el fragmento de exón 3' de (C) incluye la primera región de apareamiento y el fragmento de exón 5' de (E) incluye la segunda región de apareamiento. La primera región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 5 a 50, por ejemplo, de 10 a 15 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, o 15) ribonucleótidos y la segunda región de apareamiento puede

incluir, por ejemplo, de 5 a 50, por ejemplo, de 10 a 15 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, o 15) ribonucleótidos.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) proceden de un pre-ARNr de Tetrahymena, y la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) incluye la primera región de apareamiento y el fragmento de exón 5' de (E) incluye la segunda región de apareamiento. En algunas realizaciones, el exón 3' de (B) incluye la primera región de apareamiento y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) incluye la segunda región de apareamiento. La primera región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 6 a 50, por ejemplo, de 10 a 16 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16) ribonucleótidos, y la segunda región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 6 a 50, por ejemplo, de 10 a 16 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16) ribonucleótidos.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) proceden de un gen pre-ARNt-Leu de la cianobacteria Anabaena, un pre-ARNt de Tetrahymena o un gen td del fago T4.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) proceden de un gen td de fago T4. El fragmento de exón 3' de (C) puede incluir la primera región de apareamiento y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) puede incluir la segunda región de apareamiento. La primera región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 2 a 16, por ejemplo, de 10 a 16 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16) ribonucleótidos, y la segunda región de apareamiento puede incluir, por ejemplo, de 2 a 16, por ejemplo, de 10 a 16 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16) ribonucleótidos.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (A) es el extremo terminal 5' del polinucleótido lineal.

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento intrón catalítico del Grupo I de (G) es el extremo terminal 3' del polirribonucleótido lineal.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-AACAACAGATAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAG ACGAGGGTAAAGAGTCCAATTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAATG-3' (SEQ ID NO: 28).

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-AAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGACAAGCA ATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3' (SEQ ID NO: 29).

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 28 y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 29.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'-.CTTCTGTTGATATGGATGCAGTTCACAGACTAAATGTCGGTCGGGGAAGATGTATTCTTCATAAGA TATAGTCGGACCTCCTTAATGGGAGCTAGCGGATGAAGTGATGCAACACTGGAGCCGCTGGGAA CTAATTTGTATGCGAAAGTATATTGATTAGTTGGAGTACTCG-3' (SEQ ID NO: 30).

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'-.AAATAGCAATATTTACCTTTGGAGGGAAAAGTTATCAGGCATGCACCTGGTAGCTAGTCTTTAAACCA ATAGATTGCATCGGTTTAAAAGGCAAGACCGTCAAATTGCGGGAAAGGGGTCAACAGCCGTTCAGTA CCAAGTCTCAGGGGAAACTTTGAGATGGCCTTGCAAAGGGTATGGTAATAAGCTGACGGACATGGT CCTAACCACGCAGCCAAGTCCTAAGTCAACAGAT-.3' (SEQ ID NO: 31).

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 30 y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 31.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-GGTTCTACATAAATGCCTAACGACTATCCCTTTGGGGGAGTAGGGTCAAGTGACTCGAAACGATAGAC AACTTGCTTTAACAAGTTGGAGATATAGTCTGCTGCATGGTACATGCAGCTGGATAATTCCGG

GGTAAGATTAACGACCTTCTGAACATAATG-3' (SEQ ID NO: 32).

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-TAATTGAGGCCTGAGTATAAGGTGACTTATACTTGTAATCTATCTAAACGGGAACCTCTCTAGTAGA CAATCCCGTGCTAAATTGTAGGACT-3' (SEQ ID NO: 33).

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 32 y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 33.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'-.TAAACAACTAACAGCTTTAGAAGGTGCAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGATTCAGCCGAG GGTAAAGGGATAGTCCAATTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGCGAAAGTTGCAGAGAATGA AAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGTGAGGGTTCGAGTCCCTCCGCCCCCCCCCCCA-3' (SEQ ID NO: 80).

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-ACGGTAGACGCAGCGGACTTAGAAAACTGGGGCCTCGATCGCGAAAGGGATCGAGTGGCAGCTCTCA AACTCAGGGAAACCTAAAACTTTAAACATTMAAGTCATGGCAATCCTGAGCCAAGCTAAAGC-3' (SEQ ID NO: 81).

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 80 y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 81.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'-.TTAAACTCAAAATTTAAAATCCCAAATTCAAAATTCCGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC CCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGTCCAATTCTCAAAGCCTGAAGTTGCTGAAGCAACAA GGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCGTTGACTGTAAAAAGTCGTGGGGGTTCAAGTC CCCCCACCCCCCCCC-3' (SEQ ID NO: 82).

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTTAAGTGGAAGCTCTCAAA TTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCAAGCCCAGAATTTAGACTTGA GATTTGATTTTGGAG-3' (SEQ ID NO: 83).

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 82 y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 83.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'-.GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCT AACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGTCCAATTTAAAGCCTGAAGTTGTGCAAGCAACAAGGC AACAGTGAAAGCTGTGGAAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGGGTTCAAGTCCCCC CACCCCC-3' (SEQ ID NO: 84).

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTCAAGTGGAAGCTCAA ATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCAAGCCCGGAAATTTTAGAATCA AGATTTTATTTT-3' (SEQ ID NO: 85).

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del grupo I de (A) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 84 y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del grupo I de (G) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 85.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTGTTAAAGGCAGGGTGA CAGTCCAGACCACAAACCAGCAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGGGTAAGCAACCCGAAGG TCAGTGGTTCAAATCCCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3' (SEQ ID NO: 86).

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTGTTAAAGGCAGGGTGA CAGTCCAGACCACAAACCAGCAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGGGTAAGCAACCCGAAGG TCAGTGGTTCAAATCCCCACCAAATTAAAAAAACAATAA-3' (SEQ ID NO: 87).

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 86 y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 87.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'-ACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAAC GTCAAGACGAGTAAAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGA GAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCCCCA-3' (SEQ ID NO: 88).

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTCTTTAAGTGGATGCTCAAACTCAG GGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGATTAGTAAGTTAG TAAGTT-3' (SEQ ID NO: 89).

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del grupo I de (A) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 88 y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del grupo I de (G) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 89.

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I de (A) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'-AACAACAGATAACTTACTAGTTACTAGTCGGAAGGTGCAGACTCGACGGGAGCTACTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAA TGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCCCA-3' (SEQ ID NO: 90).

En algunas realizaciones, la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia 5'-AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTCTTTAAGTGGATGCTCAAACTCAG GGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT-3' (SEQ ID NO: 91).

En algunas realizaciones, la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 90 y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 91.

Sitios de corte y empalme

Los polirribonucleótidos descritos en la presente incluyen sitios de corte y empalme, como (B) un sitio de corte y empalme 3'; y (F) un sitio de corte y empalme 5'. El sitio de corte y empalme puede ser de un gen pre-ARNt-Leu de la cianobacteria Anabaena, un pre-ARNt de Tetrahymena, o un gen td del fago T4.

En algunas realizaciones, el sitio de corte y empalme 3' (por ejemplo, entre la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I y el fragmento del exón 3' tiene la secuencia de **AGAATG** ↓ AAAATC (SEQ ID NO: 34) donde la flecha denota el sitio de corte. En algunas realizaciones, el sitio de corte y empalme 5' (por ejemplo, entre el fragmento de exón 5' y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I tiene la secuencia de GGACTT ↓ **AAATAA** (SEQ ID NO: 35) donde la flecha denota el sitio de corte.

En algunas realizaciones, el sitio de corte y empalme 3' (por ejemplo, entre la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I y el fragmento del exón 3' tiene la secuencia **TACTCG** ↓ TAAGGT (SEQ ID NO: 36) donde la flecha denota el sitio de corte. En algunas realizaciones, el sitio de corte y empalme 5' (por ejemplo, entre el fragmento de exón 5' y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I tiene la secuencia CTCTCT ↓ **AAATAG** (SEQ ID NO: 37) donde la flecha denota el sitio de corte.

En algunas realizaciones, el sitio de corte y empalme 3' (por ejemplo, entre la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I y el fragmento del exón 3' tiene la secuencia de **ATAATG** ↓ CTACCG (SEQ ID NO: 38) donde la flecha denota el sitio de corte. En algunas realizaciones, el sitio de corte y empalme 5' (por ejemplo, entre el fragmento de exón 5' y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del Grupo I tiene la secuencia de TTGGGT ↓ **TAATTG** (SEQ

ID NO: 39) donde la flecha denota el sitio de corte.

Fragmentos de exón

Los polirribonucleótidos descritos en la presente incluyen un fragmento de exón, como (C) un fragmento de exón 3'; y (E) un fragmento de exón 5'.

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-AAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGTGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3' (SEQ ID NO: 40).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-AAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA-3' (SEQ ID NO: 41).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 5' de (E) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-AGACGCTACGGACTT-3' (SEQ ID NO: 42).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 5' de (E) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-CGTTTAGACGCTACGGACTT-3' (SEQ ID NO: 43).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 5' de (E) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-ACGACCGTTTAGACGCTACGGACTT-3' (SEQ ID NO: 44).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 5' de (E) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-CCCACACGACCGTTTAGACGCTACGGACTT-3' (SEQ ID NO: 45).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- TAAGGTAGC-3' (SEQ ID NO: 46).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-TAAGGTAAATATTGC-3' (SEQ ID NO: 47).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 5' de (E) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'- ATGACTCTCT-3' (SEQ ID NO: 48).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-CTACCGTTTAATATT-3' (SEQ ID NO: 49).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 3' de (C) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-CTCAATTTTAATATT-3' (SEQ ID NO: 50).

En algunas realizaciones, el fragmento de exón 5' de (E) tiene por lo menos un 80% (por ejemplo, por lo menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100%) de identidad de secuencia con la secuencia de 5'-ATGTTTTCTTGGGT-3' (SEQ ID NO: 51).

Carga de polirribonucleótido

Una carga de polirribonucleótido descrita en la presente incluye cualquier secuencia que incluya por lo menos un polirribonucleótido. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido de (D) incluye una secuencia de expresión, una secuencia no codificante, o una secuencia de expresión y una secuencia no codificante. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido de (D) incluye una secuencia de expresión que codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido de (D) incluye un IRES enlazado operativamente a una secuencia de expresión que codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido de (D) incluye una secuencia de expresión que codifica un polipéptido que tiene un efecto biológico en un sujeto.

Una carga de polirribonucleótido puede, por ejemplo, incluir por lo menos aproximadamente 40 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 75 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 200 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 400 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 500 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 1.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 2.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 5.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 6,000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 7.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 8.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 9.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 10.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 12.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 14.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 15.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 16.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 17.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 18.000 nucleótidos, por lo menos aproximadamente 19.000 nucleótidos, o por lo menos aproximadamente 20.000 nucleótidos. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye de 1-20.000 nucleótidos, 1-10.000 nucleótidos, 1-5.000 nucleótidos, 100-20.000 nucleótidos, 100-10.000 nucleótidos, 100-5.000 nucleótidos, 500-20.000 nucleótidos, 500-10.000 nucleótidos, 500-5.000 nucleótidos, 1.000-20.000 nucleótidos, 1.000-10.000 nucleótidos o 1.000-5.000 nucleótidos.

En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una o múltiples secuencias de expresión (o codificantes), en donde cada secuencia de expresión (o codificante) codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una o varias secuencias no codificantes. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido consiste enteramente en secuencia o secuencias no codificantes. En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye una combinación de secuencias de expresión (o codificantes) y no codificantes.

En algunas realizaciones, los polirribonucleótidos elaborados como se describe en la presente se usan como efectores en terapia o agricultura. Por ejemplo, un polirribonucleótido circular elaborado por los métodos descritos en la presente (por ejemplo, los métodos sin células descritos en la presente) puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, en una composición farmacéutica, veterinaria o agrícola). En otro ejemplo, un polirribonucleótido circular elaborado por los métodos descritos en la presente (por ejemplo, los métodos sin células descritos en la presente) puede administrarse a una célula.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye cualquier característica, o cualquier combinación de características según se divulga en la Publicación de Patente Internacional Nº WO2019/118919.

Secuencias de expresión de polipéptidos

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido circular) incluye una o más secuencias de expresión (o codificación), en donde cada secuencia de expresión codifica un polipéptido. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más secuencias de expresión (o codificación).

Cada polipéptido codificado puede ser lineal o ramificado. En diversas realizaciones, el polipéptido tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 40.000 aminoácidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 35.000 aminoácidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30.000 aminoácidos, de aproximadamente 25 a aproximadamente 25.000 aminoácidos, de aproximadamente 50 a aproximadamente 20.000 aminoácidos, de aproximadamente 100 a aproximadamente 15.000 aminoácidos, de aproximadamente 200 a aproximadamente 10.000 aminoácidos, de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 aminoácidos, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 2.500 aminoácidos, o cualquier intervalo entre los mismos. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene una longitud de menos de aproximadamente 40.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 35.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 30.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 25.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 20.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 15.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 10.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 9.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 8.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 7.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 6.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 5.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 4.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 3.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 2.500 aminoácidos, menos de aproximadamente 2.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 1.500 aminoácidos, menos de aproximadamente 1.000 aminoácidos, menos de aproximadamente 900 aminoácidos, menos de aproximadamente 800 aminoácidos, menos de aproximadamente 700 aminoácidos, menos de aproximadamente 600 aminoácidos, menos de aproximadamente 500 aminoácidos, menos de aproximadamente 400 aminoácidos, menos de aproximadamente 300 aminoácidos, o menos pueden ser útiles.

Los polipéptidos incluidos en la presente pueden ser polipéptidos de origen natural o polipéptidos de origen no natural. En algunas realizaciones, el polipéptido es o incluye un fragmento o variante funcional de un polipéptido de referencia (por ejemplo, un fragmento o variante enzimáticamente activo de una enzima). Por ejemplo, el polipéptido puede ser una variante funcionalmente activa de cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente con por lo menos un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad, por ejemplo, en una región

específica o en toda la secuencia, con una secuencia de un polipéptido descrito en la presente o un polipéptido de origen natural. En algunos casos, el polipéptido puede tener por lo menos un 50% (por ejemplo, por lo menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o más) de identidad con una proteína de interés.

Algunos ejemplos de polipéptido incluyen, entre otros, una etiqueta o marcador fluorescente, un antígeno, un polipéptido terapéutico o un polipéptido para aplicaciones agrícolas.

Un polipéptido terapéutico puede ser una hormona, un neurotransmisor, un factor de crecimiento, una enzima (por ejemplo, oxidorreductasa, enzima metabólica, enzima mitocondrial, oxigenasa, deshidrogenasa, enzima independiente de ATP, enzima lisosomal, desaturasa), una citoquina, un polipéptido de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo de unión a antígeno o fragmentos similares a anticuerpos, como anticuerpos de cadena sencilla, nanocuerpos u otros polipéptidos que contienen cadena pesada o ligera de Ig), una proteína de fusión Fc, un anticoagulante, un factor sanguíneo, una proteína morfogenética ósea, un interferón, una interleucina y un trombolítico.

Un polipéptido para aplicaciones agrícolas puede ser una bacteriocina, una lisina, un polipéptido antimicrobiano, un polipéptido antifúngico, un péptido rico en C de nódulos, un péptido regulador de bacteriocitos, una toxina peptídica, un polipéptido pesticida (por ejemplo, un polipéptido insecticida o un polipéptido nematocida), un polipéptido de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo de unión a antígeno o fragmentos similares a anticuerpos, como anticuerpos de cadena sencilla, nanocuerpos u otros polipéptidos que contienen cadenas pesadas o ligeras de Ig), una enzima (por ejemplo, nucleasa, amilasa, celulasa, peptidasa, lipasa, quitinasa), una feromona peptídica y un factor de transcripción.

En algunos casos, el polirribonucleótido circular expresa una proteína no humana.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular expresa un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, o una porción del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo expresado por el polirribonucleótido circular puede ser de cualquier isotipo, como IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular expresa una porción de un anticuerpo, como una cadena ligera, una cadena pesada, un fragmento Fc, una CDR (región determinante de la complementariedad), un fragmento Fv, o un fragmento Fab, otra porción del mismo. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular expresa una o más porciones de un anticuerpo. Por ejemplo, el polirribonucleótido circular puede incluir más de una secuencia de expresión (o codificante), cada una de las cuales expresa una porción de un anticuerpo, y la suma de las cuales puede constituir el anticuerpo. En algunos casos, el polirribonucleótido circular incluye una secuencia de expresión que codifica la cadena pesada de un anticuerpo, y otra secuencia de expresión que codifica la cadena ligera del anticuerpo. En algunos casos, cuando el polirribonucleótido circular se expresa en una célula o en un entorno libre de células, la cadena ligera y la cadena pesada pueden someterse a una modificación, plegamiento u otra modificación postraducción apropiados para formar un anticuerpo funcional.

En algunas realizaciones, los polipéptidos incluyen múltiples polipéptidos, por ejemplo, múltiples copias de una secuencia polipeptídica, o múltiples secuencias polipeptídicas diferentes. En algunas realizaciones, los polipéptidos múltiples están conectados por aminoácidos conectores o aminoácidos espaciadores.

En algunas realizaciones, la carga de polinucleótidos incluye una secuencia que codifica un péptido señal. Se han descrito muchas secuencias de péptidos señal, por ejemplo, la secuencia señal Tat (translocación de argininas gemelas es típicamente una secuencia de péptido N-terminal que contiene un motivo consenso SRRxFLK "arginina gemela", que sirve para translocar una proteína plegada que contiene tal péptido señal Tat a través de una bicapa lipídica. Véase también, por ejemplo, la base de datos de péptidos señal disponible públicamente en www[dot]signalpeptide[dot]de. Los péptidos señal también son útiles para dirigir una proteína a orgánulos específicos; véanse, por ejemplo, los péptidos señal determinados experimentalmente y predichos computacionalmente divulgados en la base de datos de péptidos señal Spdb, disponible públicamente en proline[dot]bic[dot]nus[dot]edu[dot]sg/spdb.

En algunas realizaciones, la carga de polinucleótidos incluye una secuencia que codifica un péptido penetrante de células (CPP). Se han descrito cientos de secuencias de CPP; véase, por ejemplo, la base de datos de péptidos penetrantes de células, CPPsite, disponible públicamente en crdd[dot]osdd[dot]net/raghava/cppsite/. Un ejemplo de secuencia CPP usada comúnmente es una secuencia de poli-arginina, por ejemplo, octoarginina o nonoarginina, que puede fusionarse con el extremo C-terminal del péptido CGI.

En algunas realizaciones, la carga de polinucleótidos incluye una secuencia que codifica un péptido autoensamblable; véase, por ejemplo, Miki et al. (2021) Nature Communications, 21:3412, DOI: 10.1038/s41467-021-23794-6.

En algunas realizaciones, la secuencia de expresión (o codificante) incluye una secuencia poli-A (por ejemplo, en el extremo 3' de una secuencia de expresión). En algunas realizaciones, la longitud de una secuencia poli-A tiene más de 10 nucleótidos de longitud. En una realización, la secuencia poli-A tiene más de 15 nucleótidos de longitud (por ejemplo, por lo menos o más de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 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 algunas realizaciones, la secuencia poli-A se diseña de acuerdo con las descripciones de la secuencia poli-A en [0202]-[0204] de la Publicación de Patente Internacional Nº WO2019/118919A1. En algunas realizaciones, la secuencia de expresión carece de una secuencia poli-A (por ejemplo, en el extremo 3' de una secuencia de expresión).

En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular incluye un poliA, carece de un poliA o tiene un poliA modificado para modular una o más características del polirribonucleótido circular. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular que carece de un poliA o que tiene un poliA modificado mejora una o más características funcionales, por ejemplo, la inmunogenicidad (por ejemplo, el nivel de uno o más marcadores de una respuesta inmunitaria o inflamatoria), la semivida y/o la eficacia de expresión.

Polipéptidos terapéuticos

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido circular) incluye por lo menos una secuencia de expresión que codifica un polipéptido terapéutico. Un polipéptido terapéutico es un polipéptido que cuando se administra a un sujeto o se expresa en un sujeto proporciona algún beneficio terapéutico. La administración a un sujeto o la expresión en un sujeto de un polipéptido terapéutico puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o afección o un síntoma de los mismos. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular codifica dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más polipéptidos terapéuticos.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye una secuencia de expresión que codifica una proteína terapéutica. La proteína puede tratar la enfermedad en el sujeto que la necesita. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica puede compensar una proteína mutada, infraexpresada o ausente en el sujeto que la necesita. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica puede dirigirse, interactuar o unirse a una célula, tejido o virus en el sujeto que la necesita.

Un polipéptido terapéutico puede ser un polipéptido que puede ser secretado por una célula, o estar localizado en el citoplasma, núcleo o compartimento de membrana de una célula.

Un polipéptido terapéutico puede ser una hormona, un neurotransmisor, un factor de crecimiento, una enzima (por ejemplo, oxidorreductasa, enzima metabólica, enzima mitocondrial, oxigenasa, deshidrogenasa, enzima independiente de ATP, enzima lisosomal, desaturasa), una citoquina, un factor de transcripción, un polipéptido de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo de unión a antígeno o fragmentos similares a anticuerpos, como anticuerpos de cadena sencilla, nanocuerpos u otros polipéptidos que contienen cadenas pesadas o ligeras de Ig), una proteína de fusión Fc, un anticoagulante, un factor sanguíneo, una proteína morfogenética ósea, un interferón, una interleucina, un trombolítico, un antígeno (por ejemplo, un antígeno tumoral, vírico o bacteriano), una nucleasa (por ejemplo, una endonucleasa como una proteína Cas, por ejemplo, Cas9), una proteína de membrana (por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor transmembrana, un receptor acoplado a proteína G (GPCR), un receptor de tirosina quinasa (RTK), un receptor de antígeno, un canal iónico o un transportador de membrana), una proteína secretada, una proteína de edición de genes (por ejemplo, una CRISPR-Cas, TALEN o dedo de zinc) o una proteína de escritura de genes (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional Nº WO2020/047124).

En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa, un fragmento de anticuerpo o una porción del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo expresado por el polirribonucleótido circular puede ser de cualquier isotipo, como de IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular expresa una porción de un anticuerpo, como una cadena ligera, una cadena pesada, un fragmento Fc, una CDR (región determinante de la complementariedad), un fragmento Fv, o un fragmento Fab, una porción adicional del mismo. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular expresa una o más porciones de un anticuerpo. Por ejemplo, el polirribonucleótido circular puede incluir más de una secuencia de expresión, cada una de las cuales expresa una porción de un anticuerpo, y la suma de las cuales puede constituir el anticuerpo. En algunos casos, el polirribonucleótido circular incluye una secuencia de expresión que codifica la cadena pesada de un anticuerpo, y otra secuencia de expresión que codifica la cadena ligera del anticuerpo. Cuando el polirribonucleótido circular se expresa en una célula, la cadena ligera y la cadena pesada pueden someterse a una modificación, plegamiento u otra modificación postraducción apropiados para formar un anticuerpo funcional.

En algunas realizaciones, los polirribonucleótidos circulares elaborados como se describe en la presente se usan como efectores en terapia o agricultura. Por ejemplo, un polirribonucleótido circular elaborado por los métodos descritos en la presente (por ejemplo, los métodos libres de células descritos en la presente) puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, en una composición farmacéutica, veterinaria o agrícola). En algunas realizaciones, el sujeto es un animal vertebrado (por ejemplo, mamífero, ave, pez, reptil o anfibio). En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto del método es un mamífero no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano, como un primate no humano (por ejemplo, monos, simios), un ungulado (por ejemplo, vacuno, búfalo, oveja, cabra, cerdo, camello, llama, alpaca, ciervo, caballo, burro), carnívoro (por ejemplo,

perro, gato), roedor (por ejemplo, rata, ratón) o lagomorfo (por ejemplo, conejo). En algunas realizaciones, el sujeto es un ave, como un miembro de los taxones aviares Galliformes (por ejemplo, pollos, pavos, faisanes, codornices), Anseriformes (por ejemplo, patos, gansos), Paleaognathae (por ejemplo, avestruces, emúes), Columbiformes (por ejemplo, palomos, palomas) o Psittaciformes (por ejemplo, loros). En algunas realizaciones, el sujeto es un invertebrado, como un artrópodo (por ejemplo, insectos, arácnidos, crustáceos), un nematodo, un anélido, un helminto o un molusco. En algunas realizaciones, el sujeto es una plaga agrícola invertebrada o un invertebrado parásito de un huésped invertebrado o vertebrado. En algunas realizaciones, el sujeto es una planta, como una planta angiosperma (que puede ser dicotiledónea o monocotiledónea) o una planta gimnosperma (por ejemplo, una conífera, una cicadácea, un gnetófito, un Ginkgo), un helecho, una cola de caballo, un musgo o un briofito. En algunas realizaciones, el sujeto es un alga eucariota (unicelular o pluricelular). En algunas realizaciones, el sujeto es una planta de importancia agrícola u hortícola, como plantas de cultivo en hilera, plantas y árboles frutales, hortalizas, árboles y plantas ornamentales, incluyendo flores ornamentales, arbustos, árboles, plantas tapizantes y céspedes.

Efectores polipeptídicos secretados

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido circular) incluye por lo menos una secuencia codificante que codifica un efector polipeptídico secretado. Los efectores polipeptídicos secretados o proteínas ejemplares que pueden expresarse incluyen, por ejemplo, citoquinas y receptores de citoquinas, hormonas polipeptídicas y receptores, factores de crecimiento, factores de coagulación, enzimas terapéuticas de sustitución y efectores terapéuticos no enzimáticos, factores de regeneración, reparación y fibrosis, factores de transformación y proteínas que estimulan la regeneración celular, ejemplos no limitativos de los cuales se describen en la presente, por ejemplo, en las tablas siguientes.

Citoquinas y receptores de citoquinas

En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende una citoquina de la Tabla 1, o una variante funcional o fragmento de la misma, por ejemplo, una proteína que tiene por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de proteína descrita en la Tabla 1 por referencia a su ID de UniProt. En algunas realizaciones, la variante funcional se une al receptor de citoquina correspondiente con una Kd de no más del 10%, 20%, 30%, 40% o 50% mayor o menor que la Kd de la citoquina de tipo salvaje correspondiente para el mismo receptor en las mismas condiciones. En algunas realizaciones, el efector comprende una proteína de fusión que comprende una primera región (por ejemplo, un polipéptido de citoquina de la Tabla 1 o una variante funcional o fragmento del mismo) y una segunda región heteróloga. En algunas realizaciones, la primera región es un primer polipéptido de citoquina de la Tabla 1. En algunas realizaciones, la segunda región es un segundo polipéptido de citoquina de la Tabla 1, en donde el primer y el segundo polipéptidos de citoquina forman un heterodímero de citoquina entre ellos en una célula de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido de la Tabla 1 o variante funcional del mismo comprende una secuencia señal, por ejemplo, una secuencia señal que es endógena al efector, o una secuencia señal heteróloga.

En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a una citoquina de la Tabla 1. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo comprende una secuencia señal.

Tabla 1. Citoquinas y receptores de citoquinas ejemplares

Citoquina	Receptor(es) de citoquinas	ID Gen Entrez[1]	ID UniProt[2]
IL-1α, IL-1β, o un heterodímero de las mismas.	Receptor IL-1 tipo 1, receptor IL-1 tipo 2	3552, 3553	P01583, P01584
IL-1Ra	Receptor IL-1 tipo 1, receptor IL-1 tipo 2	3454, 3455	P17181, P48551
IL-2	IL-2R	3558	P60568
IL-3	Receptor IL-3 α + β c (CD131)	3562	P08700
IL-4	IL-4R tipo I, IL-4R tipo II	3565	P05112
IL-5	IL-5R	3567	P05113
IL-6	IL-6R (sIL-6R) gp130	3569	P05231
IL-7	IL-7R y sIL-7R	3574	P13232
IL-8	CXCR1 y CXCR2	3576	P10145
IL-9	IL-9R	3578	P15248
IL-10	Complejo IL-10R1/IL-10R2	3586	P22301
IL-11	IL-11Ra 1 gp130	3589	P20809

(continuación)

Citoquina	Receptor(es) de citoquinas	ID Gen Entrez[1]	ID UniProt[2]
IL-12 (por ejemplo, p35, p40 o un heterodímero de las mismas)	IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2	3593, 3592	P29459, P29460
IL-13	IL-13R1α1 e IL-13R1α2	3596	P35225
IL-14	IL-14R	30685	P40222
IL-15	IL-15R	3600	P40933
IL-16	CD4	3603	Q14005
IL-17A	IL-17RA	3605	Q16552
IL-17B	IL-17RB	27190	Q9UHF5
IL-17C	IL-17RA a IL-17RE	27189	Q9P0M4
IL-17D	SEF	53342	Q8TAD2
IL-17F	IL-17RA, IL-17RC	112744	Q96PD4
IL-18	Receptor de IL-18	3606	Q14116
IL-19	IL-20R1/IL-20R2	29949	Q9UHD0
IL-20	L-20R1/IL-20R2 e IL-22R1/ IL-20R2	50604	Q9NYY1
IL-21	IL-21R	59067	Q9HBE4
IL-22	IL-22R	50616	Q9GZX6
IL-23 (por ejemplo, p19, p40, o un heterodímero del mismo)	IL-23R	51561	Q9NPF7
IL-24	IL-20R1/IL-20R2 e IL-22R1/ IL-20R2	11009	Q13007
IL-25	IL-17RA e IL-17RB	64806	Q9H293
IL-26	Cadena IL-10R2 y cadena IL-20R1	55801	Q9NPH9
IL-27 (por ejemplo, p28, EBI3 o un heterodímero de los mismos)	WSX-1 y gp130	246778	Q8NEV9
IL-28A, IL-28B e IL29	IL-28R1/IL-10R2	282617,282618	Q8IZI9, Q8IU54
IL-30	IL6R/gp130	246778	Q8NEV9
IL-31	IL-31RA/OSMRβ	386653	Q6EBC2
IL-32		9235	P24001
IL-33	ST2	90865	O95760
IL-34	Receptor del factor estimulante de colonias 1	146433	Q6ZMJ4
IL-35 (por ejemplo, p35, EBI3, o un heterodímero del mismo)	IL-12Rβ2/gp130; IL-12Rβ2/IL-12Rβ2; gp130/gp130	10148	Q14213
IL-36	IL-36Ra	27179	Q9UHA7
IL-37	IL-18Rα e IL-18BP	27178	Q9NZH6
IL-38	IL-1R1, IL-36R	84639	Q8WWZ1
IFN-α	IFNAR	3454	P17181
IFN-β	IFNAR	3454	P17181
IFN-γ	IFNGR1/IFNGR2	3459	P15260
TGF-β	TβR-I y TβR-II	7046, 7048	P36897, P37173
TNF-α	TNFR1, TNFR2	7132, 7133	P19438, P20333

[1] Secuencia disponible en la base de datos del NCBI en el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/gene"; Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.
[2] Secuencia disponible en la base de datos Uniprot en el sitio web "uniprot.org/uniprot/"; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021).

Hormonas polipeptídicas y receptores

En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende una hormona de la Tabla 2, o una variante funcional de la misma, por ejemplo, una proteína que tiene por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de proteína divulgada en la Tabla 2 por referencia a su ID de UniProt. En algunas realizaciones, la variante funcional se une al receptor correspondiente con una Kd de no más del 10%, 20%, 30%, 40% o 50% mayor que la Kd de la hormona de tipo salvaje correspondiente para el mismo receptor en las mismas

condiciones. En algunas realizaciones, el polipéptido de la Tabla 2 o la variante funcional del mismo comprende una secuencia señal, por ejemplo, una secuencia señal que es endógena al efector, o una secuencia señal heteróloga.

En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende una molécula de anticuerpo (por ejemplo, un scFv) que se une a una hormona de la Tabla 2. En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende una molécula de anticuerpo (por ejemplo, un scFv) que se une a un receptor hormonal de la Tabla 2. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo comprende una secuencia señal.

Tabla 2. Ejemplos de hormonas polipeptídicas y receptores

Hormona	**Receptor**	**ID Gen Entrez[1]**	**ID UniProt[2]**
Péptido natriurético, por ejemplo, péptido natriurético auricular (PNA)	NPRA, NPRB, NPRC	4878	P01160
Péptido natriurético cerebral (BNP)	NPRA, NPRB	4879	P16860
Péptido natriurético de tipo C (CNP)	NPRB	4880	P23582
Hormona del crecimiento (GH)	GHR	2690	P10912
Prolactina (PRL)	PRLR	5617	P01236
Hormona estimulante del tiroides (TSH)	Receptor de TSH	7253	P16473
Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)	Receptor de ACTH	5443	P01189
Hormona foliculoestimulante (FSH)	FSHR	2492	P23945
Hormona luteinizante (LH)	LHR	3973	P22888
Hormona antidiurética (ADH)	Receptores de vasopresina, por ejemplo, V2; AVPR1A; AVPR1B; AVPR3; AVPR2	554	P30518
Oxitocina	OXTR	5020	P01178
Calcitonina	Receptor de calcitonina (CT)	796	P01258
Hormona paratiroidea (PTH)	PTH1R y PTH2R	5741	P01270
Insulina	Receptor de insulina (IR)	3630	P01308
Glucagón	Receptor de glucagón	2641	P01275
GIP	GIPR	2695	P09681
Factor de crecimiento de fibroblastos 19 (FGF19)	FGFR4	9965	O95750
Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21)	FGFR1c, 2c, 3c	26291	Q9NSA1
Factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23)	FGFR1, 2, 4	8074	Q9GZV9
Hormona estimulante de los melanocitos (MSH alfa)	MC1R, MC4R, MC5R		
Hormona estimulante de los melanocitos (beta- MSH)	MC4R		
Hormona estimulante de los melanocitos (gamma- MSH)	MC1R, MC3R, MC4R, MC5R		
Proopiomelanocortina POMC (alfa- beta-, gamma-, precursor de MSH)	MC1R, MC3R, MC4R, MC5R	5443	P01189
Glicoproteína hormona de cadena alfa (CGA)		1081	P01215
Hormona foliculoestimulante beta (FSHB)	FSHR	2488	P01225
Leptina	LEPR	3952	P41159
Ghrelin	GHSR	51738	Q9UBU3

[1] Secuencia disponible en la base de datos del NCBI en el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/gene", Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.
[2] Secuencia disponible en la base de datos Uniprot en el sitio web "uniprot.org/uniprot/"; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021).

Factores de crecimiento

En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende un factor de crecimiento de la Tabla 3, o una variante funcional del mismo, por ejemplo, una proteína que tiene por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de proteína divulgada en la Tabla 3 por referencia a su ID de UniProt. En algunas realizaciones, la variante funcional se une al receptor correspondiente con una Kd de no más del 10%, 20%, 30%, 40% o 50% mayor que la Kd del factor de crecimiento de tipo salvaje correspondiente para el mismo

receptor en las mismas condiciones. En algunas realizaciones, el polipéptido de la Tabla 3 o la variante funcional del mismo comprende una secuencia señal, por ejemplo, una secuencia señal que es endógena al efector, o una secuencia señal heteróloga.

En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un factor de crecimiento de la Tabla 3. En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende una molécula de anticuerpo (por ejemplo, un scFv) que se une a un receptor de factor de crecimiento de la Tabla 3. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo comprende una secuencia señal.

Tabla 3. Factores de crecimiento ejemplares

Familia PDGF		**ID Gen Entrez[1]**	**ID UniProt[2]**
PDGF (por ejemplo, PDGF-1, PDGF-2, o un heterodímero del mismo)	Receptor PDGF, por ejemplo, PDGFRα, PDGFRβ	5156	P16234
CSF-1	CSF1R	1435	P09603
SCF	CD117	3815	P10721
Familia VEGF			
VEGF (por ejemplo, las isoformas VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 y VEGF 206)	VEGFR-1, VEGFR-2	2321	P17948
VEGF-B	VEGFR-1	2321	P17949
VEGF-C	VEGFR-2 y VEGFR -3	2324	P35916
PIGF	VEGFR-1	5281	Q07326
Familia EGF			
FEAG	EGFR	1950	P01133
TGF-α	EGFR	7039	P01135
anfiregulina	EGFR	374	P15514
HB-EGF	EGFR	1839	Q99075
betacelulina	EGFR, ErbB-4	685	P35070
epiregulina	EGFR, ErbB-4	2069	014944
Heregulin	EGFR, ErbB-4	3084	Q02297
Familia FGF			
FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9	FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4	2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254	P05230, P09038, P11487, P08620, P12034, P10767, P21781, P55075, P31371
Familia de la insulina			
Insulina	IR	3630	P01308
IGF-I	Receptor IGF-I, receptor IGF-II	3479	P05019
IGF-II	Receptor IGF-II	3481	P01344
Familia HGF			
HGF	Receptor MET	3082	P14210
MSP	RON	4485	P26927
Familia de neurotrofinas			
NGF	LNGFR, trkA	4803	P01138
BDNF	trkB	627	P23560
NT-3	trkA, trkB, trkC	4908	P20783
NT-4	trkA, trkB	4909	P34130
NT-5	trkA, trkB	4909	P34130
Familia de la angiopoyetina			
ANGPT1	HPK-6/TEK	284	Q15389
ANGPT2	HPK-6/TEK	285	015123
ANGPT3	HPK-6/TEK	9068	095841
ANGPT4	HPK-6/TEK	51378	Q9Y264
Familia PDGF		**ID Gen Entrez[1]**	**ID UniProt[2]**
ANGPTL2	LILRB2 e integrina α5β1	23452	Q9UKU9

(continuación)

ANGPTL3	LPL	27329	Q9Y5C1
ANGPTL4		51129	Q9BY76
ANGPTL8	PirB	55908	Q6UXH0
[1] Secuencia disponible en la base de datos del NCBI en el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/gene", Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055. [2] Secuencia disponible en la base de datos Uniprot en el sitio web "uniprot.org/uniprot/"; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021).			

Factores de coagulación

En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende un polipéptido de la Tabla 4, o una variante funcional del mismo, por ejemplo, una proteína que tiene por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de proteína divulgada en la Tabla 4 por referencia a su ID de UniProt. En algunas realizaciones, la variante funcional cataliza la misma reacción que la proteína de tipo salvaje correspondiente, por ejemplo, a una velocidad de no menos del 10%, 20%, 30%, 40% o 50% menor o superior a la de la proteína de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el polipéptido de la Tabla 4 o variante funcional del mismo comprende una secuencia señal, por ejemplo, una secuencia señal que es endógena al efector, o una secuencia señal heteróloga.

Tabla 4. Factores asociados a la coagulación

Efector	**Indicación**	**ID Gen Entrez[1]**	**ID UniProt[2]**
Factor I (fibrinógeno)	Afibrinogenomia	2243, 2266, 2244	P02671, P02679, P02675
Factor II	Deficiencia de factor II	2147	P00734
Factor IX	Hemofilia B	2158	P00740
Factor V	Enfermedad de Owren	2153	P12259
Factor VIII	Hemofilia A	2157	P00451
Factor X	Deficiencia del factor Stuart-Prower	2159	P00742
Factor XI	Hemofilia C	2160	P03951
Factor XIII	Deficiencia del factor estabilizador de la fibrina	2162, 2165	P00488, P05160
vWF	enfermedad de von Willebrand	7450	P04275
[1] Secuencia disponible en la base de datos del NCBI en el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/gene", Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055. [2] Secuencia disponible en la base de datos Uniprot en el sitio web "uniprot.org/uniprot/"; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021).			

Enzimas terapéuticas de sustitución

En algunas realizaciones, un efector descrito en la presente comprende una enzima de la Tabla 5, o una variante funcional de la misma, por ejemplo, una proteína que tiene por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de proteína divulgada en la Tabla 5 por referencia a su ID de UniProt. En algunas realizaciones, la variante funcional cataliza la misma reacción que la proteína de tipo salvaje correspondiente, por ejemplo, a una velocidad de no menos o no más del 10%, 20%, 30%, 40% o 50% menor a la de la proteína de tipo salvaje.

Tabla 5. Efectores enzimáticos ejemplares para la deficiencia enzimática

Efector	**Deficiencia**	**ID Gen Entrez[1]**	**ID UniProt[2]**
3-metilcrotonil-CoA carboxilasa	Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa	56922, 64087	Q96RQ3, Q9HCC0
Acetil-CoA-glucosaminida N-acetiltransferasa	Mucopolisacaridosis MPS III (síndrome de Sanfilippo) tipo III-C	138050	Q68CP4
ADAMTS13	Púrpura trombótica trombocitopénica	11093	Q76LX8
adenina fosforibosiltransferasa	Deficiencia de adenina fosforribosiltransferasa	353	P07741
Adenosina deaminasa	Deficiencia de adenosina deaminasa	100	P00813
ADP-ribosa proteína hidrolasa	Enfermedad por almacenamiento de glutamil ribosa-5-fosfato	26119, 54936	Q5SW96, Q9NX46
alfa glucosidasa	Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo 2 (enfermedad de Pompe)	2548	P10253

(continuación)

Efector	Deficiencia	ID Gen Entrez[1]	ID UniProt[2]
Arginasa	Hiperarginemia familiar	383, 384	P05089, P78540
Arilsulfatasa A	Leucodistrofia metacromática	410	P15289
Catepsina K	Picnodisostosis	1513	P43235
Ceramidasa	Enfermedad de Farber (lipogranulomatosis)	125981,340485, 55331	Q8TDN7, Q5QJU3, Q9NUN7
Cistationina B sintasa	Homocistinuria	875	P35520
Dolicol-P-manosa sintasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Ie	8813,54344	O60762, Q9P2X0
Dolicho-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-dolichol glucosiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Ic	84920	Q5BKT4
Dolicho-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-dolichol mannosiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Id	10195	Q92685
Dolicil-P-glucosa:Glc-1-Man-9-GlcNAc-2-PP-dolicil-α-3-glucosiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Ih	79053	Q9BVK2
Dolicil-P-manosa:Man-7-GlcNAc-2-PP-dolicil-α-6-manosiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Ig	79087	Q9BV10
Factor II	Deficiencia de factor II	2147	P00734
Factor IX	Hemofilia B	2158	P00740
Factor V	Enfermedad de Owren	2153	P12259
Factor VIII	Hemofilia A	2157	P00451
Factor X	Deficiencia del factor Stuart-Prower	2159	P00742
Factor XI	Hemofilia C	2160	P03951
Factor XIII	Deficiencia del factor estabilizador de la fibrina	2162, 2165	P00488, P05160
Galactosamina-6-sulfato sulfatasa	Mucopolisacaridosis MPS IV (síndrome de Morquio) Tipo IV-A	2588	P34059
Galactosilceramida β-galactosidasa	Enfermedad de Krabbe	2581	P54803
Gangliósido β-galactosidasa	Gangliosidosis GM1 generalizada	2720	P16278
Gangliósido β-galactosidasa	Gangliosidosis GM2	2720	P16278
Gangliósido β-galactosidasa	Esfingolipidosis tipo I	2720	P16278
Gangliósido β-galactosidasa	Esfingolipidosis tipo II (tipo juvenil)	2720	P16278
Gangliósido β-galactosidasa	Esfingolipidosis tipo III (tipo adulto)	2720	P16278
Glucosidasa I	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG IIb	2548	P10253
Glucosilceramida β-glucosidasa	Enfermedad de Gaucher	2629	P04062
Heparán-S-sulfato sulfamidasa	Mucopolisacaridosis MPS III (síndrome de Sanfilippo) Tipo III-A	6448	P51688
homogentisato oxidasa	Alcaptonuria	3081	Q93099
Hialuronidasa	Mucopolisacaridosis MPS IX (deficiencia de hialuronidasa)	3373, 8692, 8372, 23553	Q12794, Q12891, O43820, Q2M3T9
Iduronato sulfato sulfatasa	Mucopolisacaridosis MPS II (síndrome de Hunter)	3423	P22304
Lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT)	Deficiencia completa de LCAT, enfermedad del ojo de pez, aterosclerosis, hipercolesterolemia	3931	606967
Lisina oxidasa	Acidemia glutárica tipo I	4015	P28300
Lipasa ácida lisosomal	Enfermedad por almacenamiento de ésteres de colesterol (CESD)	3988	P38571
Lipasa ácida lisosomal	Deficiencia de lipasa ácida lisosomal	3988	P38571
Lipasa ácida lisosomal	Enfermedad de Wolman	3988	P38571

continuación)

Efector	Deficiencia	ID Gen Entrez[1]	ID UniProt[2]
Peptidasa lisosomal insensible a la pepstatina	Lipofuscinosis ceroide Forma infantil tardía (CLN2, enfermedad de Jansky-Bielschowsky)	1200	014773
Manosa (Man) fosfato (P) isomerasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Ib	4351	P34949
Manosil-α-1,6-glicoproteína-β-1,2-N-acetilglucosminiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG IIa	4247	Q10469
Metaloproteinasa-2	Síndrome de Winchester	4313	P08253
metilmalonil-CoA mutasa	Acidemia metilmalónica (sin respuesta a la vitamina b12)	4594	P22033
N-acetil galactosamina α-4-sulfato sulfatasa (arilsulfatasa B)	Mucopolisacaridosis MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy)	411	P15848
N-acetil-D-glucosaminidasa	Mucopolisacaridosis MPS III (síndrome de Sanfilippo) tipo III-B	4669	P54802
N-acetil-galactosaminidasa	Enfermedad de Schindler tipo I (forma infantil grave)	4668	P17050
N-acetil-galactosaminidasa	Enfermedad de Schindler tipo II (enfermedad de Kanzaki, forma de aparición en la edad adulta)	4668	P17050
N-acetil-galactosaminidasa	Enfermedad de Schindler tipo III (forma intermedia)	4668	P17050
N-acetil-glucosaminina-6-sulfato sulfatasa	Mucopolisacaridosis MPS III (síndrome de Sanfilippo) tipo III-D	2799	P15586
N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa	Mucolipidosis ML III (pseudo-polidistrofia de Hurler)	79158	Q3T906
Subunidad catalítica de la N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa	Mucolipidosis ML II (enfermedad de células I)	79158	Q3T906
N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa, subunidad de reconocimiento de sustrato	Mucolipidosis ML III (pseudo-polidistrofia de Hurler) tipo III-C	84572	Q9UJJ9
N-Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosaminuria	175	P20933
Neuraminidasa 1 (sialidasa)	Sialidosis	4758	Q99519
Palmitoil-proteína tioesterasa-1	Lipofuscinosis ceroide Forma adulta (CLN4, enfermedad de Kufs)	5538	P50897
Palmitoil-proteína tioesterasa-1	Forma infantil de la lipofuscinosis ceroidea (CLN1, enfermedad de Santavuori-Haltia)	5538	P50897
Fenilalanina hidroxilasa	Fenilcetonuria	5053	P00439
Fosfomanomutasa-2	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Ia (formas únicamente neurológicas y neurológicas-multiviscerales)	5373	015305
Porfobilinógeno deaminasa	Porfiria aguda intermitente	3145	P08397
Purina nucleósido fosforilasa	Deficiencia de purina nucleósido fosforilasa	4860	P00491
pirimidina 5' nucleotidasa	Anemia hemolítica y/o deficiencia de pirimidina 5' nucleotidasa	51251	Q9H0P0
Esfingomielinasa	Enfermedad de Niemann-Pick tipo A	6609	P17405
Esfingomielinasa	Enfermedad de Niemann-Pick tipo B	6609	P17405
Esterol 27-hidroxilasa	Xantomatosis cerebrotendinosa (lipidosis por colestanol)	1593	Q02318
Timidina fosforilasa	Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE)	1890	P19971
Trihexosilceramida α-galactosidasa	Enfermedad de Fabry	2717	P06280

(continuación)

Efector	Deficiencia	ID Gen Entrez[1]	ID UniProt[2]
tirosinasa, por ejemplo, OCA1	albinismo, por ejemplo, albinismo ocular	7299	P14679
UDP-GlcNAc:dolicil-P NAcGlc fosfotransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Ij	1798	Q9H3H5
UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa/N-acetilmanosamina cinasa, sialina	Sialuria Tipo francés	10020	Q9Y223
Uricasa	Síndrome de Lesch-Nyhan, gota	391051	Sin proteínas
uridina difosfato glucuronil-transferasa (por ejemplo, UGT1A1)	Síndrome de Crigler-Najjar	54658	P22309
α-1,2-Manosiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG II (608776)	79796	Q9H6U8
α-1,2-Manosiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación, tipo I (defectos de glicosilación pre-Golgi)	79796	Q9H6U8
α-1,3-Manosiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Ii	440138	Q2TAA5
α-D-manosidasa	α-Mannosidosis, tipo I (grave) o II (leve)	10195	Q92685
α-L-Fucosidasa	Fucosidosis	4123	Q9NTJ4
α-I-Iduronidasa	Mucopolisacaridosis MPS I H/S (síndrome de Hurler-Scheie)	2517	P04066
α-I-Iduronidasa	Mucopolisacaridosis MPS I-H (síndrome de Hurler)	3425	P35475
α-I-Iduronidasa	Mucopolisacaridosis MPS I-S (síndrome de Scheie)	3425	P35475
β-1,4-Galactosiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG IId	3425	P35475
β-1,4-Manosiltransferasa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG Ik	2683	P15291
β-D-Mannosidasa	β-Mannosidosis	56052	Q9BT22
β-Galactosidasa	Mucopolisacaridosis MPS IV (síndrome de Morquio) tipo IV-B	4126	O00462
β-Glucuronidasa	Mucopolisacaridosis MPS VII (síndrome de Sly)	2720	P16278
β-Hexosaminidasa A	Enfermedad de Tay-Sachs	2990	P08236
β-Hexosaminidasa B	Enfermedad de Sandhoffs	3073	P06865

[1] Secuencia disponible en la base de datos del NCBI en el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/gene", Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.
[2] Secuencia disponible en la base de datos Uniprot en el sitio web "uniprot.org/uniprot/"; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021).

Otros efectores no enzimáticos

En algunas realizaciones, un polipéptido terapéutico descrito en la presente comprende un polipéptido de la Tabla 6, o una variante funcional del mismo, por ejemplo, una proteína que tiene por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de proteína divulgada en la Tabla 6 por referencia a su ID de UniProt.

Tabla 6. Efectores no enzimáticos ejemplares e indicaciones correspondientes

Efector	Indicación	ID Gen Entrez[1]	ID UniProt[2]
Proteína de la motoneurona de supervivencia (SMN)	atrofia muscular espinal	6606	Q16637
Distrofina	distrofia muscular (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker)	1756	P11532

(continuación)

Efector	Indicación	ID Gen Entrez[1]	ID UniProt[2]
Proteína del complemento, por ejemplo, factor C1 del complemento	Deficiencia del factor I del complemento	3426	P05156
Factor H del complemento	Síndrome urémico hemolítico atípico	3075	P08603
Cistinosina (transportador lisosomal de cistina)	Cistinosis	1497	060931
Proteína secretora epididimaria 1 (HE1; proteína NPC2)	Enfermedad de Niemann-Pick tipo C2	10577	P61916
Transportador-1 de GDP-fucosa	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG IIc (síndrome de Rambam-Hasharon)	55343	Q96A29
Proteína activadora GM2	Deficiencia de la proteína activadora GM2 (variante AB de la enfermedad de Tay-Sachs, GM2A)	2760	Q17900
Proteína transmembrana lisosomal CLN3	Lipofuscinosis ceroide Forma juvenil (CLN3, enfermedad de Batten, enfermedad de Vogt-Spielmeyer)	1207	Q13286
Proteína transmembrana lisosomal CLN5	Lipofuscinosis ceroide Forma infantil tardía variante, tipo finlandés (CLN5)	1203	O75503
Cotransportador de fosfato de Na, sialina	Trastorno infantil por almacenamiento de ácido siálico	26503	Q9NRA2
Cotransportador de fosfato de Na, sialina	Sialuria tipo finlandés (enfermedad de Salla)	26503	Q9NRA2
Proteína NPC1	Enfermedad de Niemann-Pick Tipo C1/Tipo D	4864	015118
Complejo oligomérico de Golgi-7	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG IIe	91949	P83436
Prosaposina	Deficiencia de prosaposina	5660	P07602
Proteína protectora/catepsina A (PPCA)	Galactosialidosis (síndrome de Goldberg, deficiencia combinada de neuraminidasa y β-galactosidasa)	5476	P10619
Proteína implicada en la utilización de manosa-P-dolichol	Trastornos congénitos de la N-glicosilación CDG If	9526	O75352
Saposina B	Deficiencia de saposina B (deficiencia del activador de sulfátidos)	5660	P07602
Saposina C	Deficiencia de saposina C (deficiencia del activador de Gaucher)	5660	P07602
Factor modificador de la sulfatasa	Mucosulfatidosis (deficiencia múltiple de sulfatasa)	285362	Q8NBK3
Proteína transmembrana CLN6	Lipofuscinosis ceroide Forma infantil tardía variante (CLN6)	54982	Q9NWW5
Proteína transmembrana CLN8	Lipofuscinosis ceroide Epilepsia progresiva con discapacidad intelectual	2055	Q9UBY8
vWF	enfermedad de von Willebrand	7450	P04275
Factor I (fibrinógeno)	Afibrinogenomia	2243, 2244, 2266	P02671, P02675, P02679
eritropoyetina (hEPO)			

[1] Secuencia disponible en la base de datos del NCBI en el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/gene", Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. pii: gku1055.
[2] Secuencia disponible en la base de datos Uniprot en el sitio web "uniprot.org/uniprot/"; UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021).

Factores de regeneración, reparación y fibrosis

Los polipéptidos terapéuticos descritos en la presente también incluyen factores de crecimiento, por ejemplo, como se divulga en la Tabla 7, o variantes funcionales de los mismos, por ejemplo, una proteína que tenga por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% de identidad con una secuencia de proteína divulgada en la Tabla 7 por referencia a su número de acceso de proteína NCBI. También se incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos contra dichos factores de crecimiento, o miARN que promueven la regeneración y reparación.

Tabla 7. Factores ejemplares de regeneración, reparación y fibrosis

Diana	Nº de registro gen NCBI [1]	Nº de registro proteína NCBI[2]
VEGF-A	NG_008732	NP_001165094
NRG-1	NG_012005	NP_001153471
FGF2	NG_029067	NP_001348594
FGF1	Gen ID: 2246	NP_001341882
miR199-3p	MIMAT0000232	n/a
miR590-3p	MIMAT0004801	n/a
miR17-92	MI0000071	En el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732113/figure/F1/"
miR222	MI0000299	n/a
miR302-367	MIR302A Y MIR367	En el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400607/"
[1] Secuencia disponible en el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/gene" (Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. Pii: gku1055.) [2] Secuencia disponible en el sitio de internet de la red mundial "ncbi.nlm.nih.gov/protein/"		

Factores de transformación

Los polipéptidos terapéuticos descritos en la presente también incluyen factores de transformación, por ejemplo, factores proteicos que transforman los fibroblastos en células diferenciadas, por ejemplo, factores divulgados en la Tabla 8 o variantes funcionales de los mismos, por ejemplo, una proteína que tenga por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% de identidad con una secuencia proteica divulgada en la Tabla 8 por referencia a su ID de UniProt.

Tabla 8: Polipéptidos indicados para la reparación de órganos mediante la transformación de fibroblastos

Diana	Nº de registro gen NCBI [1]	Nº de registro proteína NCBI [2]
MESP1	Gen ID: 55897	EAX02066
ETS2	Gen ID: 2114	NP_005230
MANO2	Gen ID: 9464	NP_068808
MIOCARDINA	Gen ID: 93649	NP_001139784
ESRRA	Gen ID: 2101	AAH92470
miR1	MI0000651	n/a
miR133	MI000450	n/a
TGFb	Gen ID: 7040	NP_000651.3
WNT	Gen ID: 7471	NP_005421
JAK	Gen ID: 3716	NP_001308784
NOTCH	Gen ID: 4851	XP_011517019
[1] Secuencia disponible en el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/gene" (Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. Pii: gku1055.) [2] Secuencia disponible en el sitio de internet de la red mundial "ncbi.nlm.nih.gov/protein/"		

Proteínas que estimulan la regeneración celular

Los polipéptidos terapéuticos descritos en la presente también incluyen proteínas que estimulan la regeneración celular, por ejemplo, proteínas divulgadas en la Tabla 9 o variantes funcionales de las mismas, por ejemplo, una proteína que tenga por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 967%, 98%, 99% de identidad con una secuencia proteica divulgada en la Tabla 9 por referencia a su ID de UniProt.

Tabla 9. Proteínas ejemplares que estimulan la regeneración celular

Diana	Nº de registro gen [1]	Nº de registro a la proteína [2]
MST1	NG_016454	NP_066278
STK30	Gen ID: 26448	NP_036103
MST2	Gen ID: 6788	NP_006272
SAV1	Gen ID: 60485	NP_068590
LATS1	Gen ID: 9113	NP_004681
LATS2	Identificador genético: 26524	NP_055387
YAP1	NG_029530	NP_001123617
CDKN2b	NG_023297	NP_004927
CDKN2a	NG_007485	NP_478102

(continuación)

[1] Secuencia disponible en el sitio web "ncbi.nlm.nih.gov/gene" (Maglott D, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. Nucleic Acids Res. 2014. Pii: gku1055.)
[2] Secuencia disponible en el sitio de internet de la red mundial "ncbi.nlm.nih.gov/protein/"

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular comprende una o más secuencias de expresión (secuencias codificantes) y está configurado para la expresión persistente en una célula de un sujeto *in vivo.* En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular está configurado para que la expresión de una o más secuencias de expresión en la célula en un momento posterior sea igual o mayor que en un momento anterior. En tales realizaciones, la expresión de la una o más secuencias de expresión puede mantenerse a un nivel relativamente estable o puede aumentar con el tiempo. La expresión de las secuencias de expresión puede ser relativamente estable durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, en algunos casos, la expresión de la una o más secuencias de expresión en la célula durante un periodo de tiempo de por lo menos 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 23 o más días no disminuye en un 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5%. En algunos casos, en algunos casos, la expresión de la una o más secuencias de expresión en la célula se mantiene a un nivel que no varía en más del 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o 5% durante por lo menos 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 23 o más días.

Polipéptidos modificadores de plantas

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido) incluye por lo menos una secuencia de expresión que codifica un polipéptido modificador de plantas. Un polipéptido modificador de plantas se refiere a un polipéptido que puede alterar las propiedades genéticas (por ejemplo, aumentar la expresión génica, disminuir la expresión génica, o alterar de otro modo la secuencia nucleotídica de ADN o ARN), las propiedades epigenéticas, o las propiedades fisiológicas o bioquímicas de una planta de manera que se produzca un cambio en la fisiología o fenotipo de la planta, por ejemplo, un aumento o disminución de la aptitud de la planta. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido codifica dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más polipéptidos modificadores de plantas diferentes, o múltiples copias de uno o más polipéptidos modificadores de plantas. Un polipéptido modificador de plantas puede cambiar la fisiología o el fenotipo, o aumentar o disminuir la aptitud de una variedad de plantas, o puede ser uno que efectúe dicho cambio o cambios en una o más plantas específicas (por ejemplo, una especie o género específico de plantas).

Ejemplos de polipéptidos que pueden usarse en la presente pueden incluir una enzima (por ejemplo, una recombinasa metabólica, una helicasa, una integrasa, una ARNasa, una ADNasa o una proteína de ubiquitinación), una proteína formadora de poros, un ligando de señalización, un péptido de penetración celular, un factor de transcripción, un receptor, un anticuerpo, un nanocuerpo, una proteína de edición de genes (por ejemplo, CRISPR-Cas, TALEN o dedo de zinc), una riboproteína, un aptámero proteico o una chaperona.

Polipéptidos agrícolas

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido) incluye por lo menos una secuencia de expresión que codifica un polipéptido agrícola. Un polipéptido agrícola es un polipéptido adecuado para un uso agrícola. En algunas realizaciones, un polipéptido agrícola se aplica a una planta o semilla (por ejemplo, mediante pulverización foliar, espolvoreado, inyección o recubrimiento de semillas) o al entorno de la planta (por ejemplo, mediante empapado del suelo o aplicación granular al suelo), dando como resultado una alteración de la fisiología, fenotipo o aptitud de la planta. Las realizaciones de un polipéptido agrícola incluyen polipéptidos que alteran un nivel, la actividad o el metabolismo de uno o más microorganismos residentes en o sobre una planta o animal no humano huésped, alteración que resulta en un aumento de la aptitud del huésped. En algunas realizaciones, el polipéptido agrícola es un polipéptido vegetal. En algunas realizaciones, el polipéptido agrícola es un polipéptido de insecto. En algunas realizaciones, el polipéptido agrícola tiene un efecto biológico cuando entra en contacto con un animal vertebrado no humano, un animal invertebrado, un microbio o una célula vegetal.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido codifica dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más polipéptidos agrícolas, o múltiples copias de uno o más polipéptidos agrícolas.

Las realizaciones de polipéptidos útiles en aplicaciones agrícolas incluyen, por ejemplo, bacteriocinas, lisinas, péptidos antimicrobianos, péptidos ricos en nódulos C y péptidos reguladores de bacteriocitos. Tales polipéptidos pueden usarse para alterar el nivel, la actividad o el metabolismo de microorganismos diana para aumentar la aptitud de los insectos, como las abejas y los gusanos de seda. Las realizaciones de polipéptidos útiles para la agricultura incluyen toxinas peptídicas, como las producidas de manera natural por bacterias entomopatógenas (por ejemplo, Bacillus thuringiensis, Photorhabdus luminescens, Serratia entomophila o Xenorhabdus nematophila), como se conoce en la técnica. Las realizaciones de polipéptidos de utilidad agrícola incluyen polipéptidos (incluyendo péptidos pequeños como ciclodipéptidos o diketopiperazinas) para controlar plagas o patógenos de importancia agrícola, por

ejemplo polipéptidos antimicrobianos o polipéptidos antifúngicos para controlar enfermedades en plantas, o polipéptidos pesticidas (por ejemplo, polipéptidos insecticidas o polipéptidos nematicidas) para controlar plagas de invertebrados como insectos o nematodos. Las realizaciones de polipéptidos de utilidad agrícola incluyen anticuerpos, nanocuerpos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos o nanocuerpos que retienen por lo menos parte (por ejemplo, por lo menos el 10%) de la actividad de unión específica del anticuerpo o nanocuerpo intacto. Las realizaciones de polipéptidos de utilidad agrícola incluyen factores de transcripción, por ejemplo, factores de transcripción de plantas; véase, por ejemplo, la base de datos "AtTFDB" que enumera las familias de factores de transcripción identificadas en la planta modelo Arabidopsis thaliana), disponible públicamente en agris-knowledgebase[dot]org/AtTFDB/. Las realizaciones de polipéptidos de utilidad agrícola incluyen nucleasas, por ejemplo, exonucleasas o endonucleasas (por ejemplo, nucleasas Cas como Cas9 o Cas12a). Las realizaciones de polipéptidos de utilidad agrícola incluyen además péptidos de penetración celular, enzimas (por ejemplo, amilasas, celulasas, peptidasas, lipasas, quitinasas), feromonas peptídicas (por ejemplo, feromonas de apareamiento de levaduras, feromonas de señalización reproductiva y larvaria de invertebrados, véase, por ejemplo, Altstein (2004) Peptides, 25:1373-1376).

Sitios de entrada ribosómica interna

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido) incluye uno o más elementos de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). En algunas realizaciones, el IRES está enlazado operativamente a una o más secuencias de expresión (por ejemplo, cada IRES está enlazado operativamente a una o más secuencias de expresión). En algunas realizaciones, el IRES está situado entre un promotor heterólogo y el extremo 5' de una secuencia codificante.

Un elemento IRES adecuado para incluir en un polirribonucleótido incluye una secuencia de ARN capaz de acoplarse con un ribosoma eucariota. En algunas realizaciones, el elemento IRES tiene por lo menos aproximadamente 5 nt, por lo menos aproximadamente 8 nt, por lo menos aproximadamente 9 nt, por lo menos aproximadamente 10 nt, por lo menos aproximadamente 15 nt, por lo menos aproximadamente 20 nt, por lo menos aproximadamente 25 nt, por lo menos aproximadamente 30 nt, por lo menos aproximadamente 40 nt, por lo menos aproximadamente 50 nt, por lo menos aproximadamente 100 nt, por lo menos aproximadamente 200 nt, por lo menos aproximadamente 250 nt, por lo menos aproximadamente 350 nt, o por lo menos aproximadamente 500 nt.

En algunas realizaciones, el elemento IRES se deriva del ADN de un organismo que incluye, entre otros, un virus, un mamífero y una Drosophila. Dicho ADN viral puede derivarse de, pero no se limita a, ADN complementario (ADNc) de picornavirus, con ADNc de virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y ADNc de poliovirus. En una realización, el ADN de Drosophila del que se deriva un elemento IRES incluye, pero no se limita a, un gen Antennapedia de Drosophila melanogaster.

En algunas realizaciones, si la hay, la secuencia IRES es una secuencia IRES del virus del síndrome de Taura, del virus Triatoma, del virus de la encefalomielitis de Theiler, del virus simio 40, del virus Solenopsis invicta 1, del virus Rhopalosiphum padi, del virus de la reticuloendoteliosis, del poliovirus fumano 1, del virus del intestino de Plautia stall, virus de la abeja de Cachemira, rinovirus humano 2, virus Homalodisca coagulata 1, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, virus Homalodisca coagulata- 1, virus Himetobi P, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis GB, virus de la fiebre aftosa, enterovirus humano 71, virus de la rinitis equina, virus similar al picorna de Ectropis obliqua, virus de la encefalomiocarditis (EMCV), virus C de Drosophila, virus del tóbamo de las crucíferas, virus de la parálisis del grillo, virus de la diarrea vírica bovina 1, virus de la célula reina negra, virus de la parálisis letal de los pulgones, virus de la encefalomielitis aviar, virus de la parálisis aguda de las abejas, virus de la mancha anular clorótica del hibisco, virus de la peste porcina clásica, FGF2 humano, SFTPA1 humano, AML1/RUNX1 humano, antennapedia de Drosophila, AQP4 humano, AT1R humano, BAG-I humano, BCL2 humano, BiP humano, c-IAPI humano, c-myc humano, eIF4G humano, NDST4L de ratón, LEF1 humano, HIF1 alfa de ratón, n.myc humano, Gtx de ratón, p27kipl humano, PDGF2/c-sis humano, p53 humano, Pim-I humano, Rbm3 de ratón, Drosophila reaper, Scamper canino, Drosophila Ubx, UNR humano, UtrA de ratón, VEGF-A humano, XIAP humano, Salivirus, Cosavirus, Parechovirus, Drosophila hairless, TFIID de S. cerevisiae, YAP1 de S. cerevisiae, c-src humano, FGF-I humano, picomavirus de simios, virus de la arruga del nabo, un aptámero para eIF4G, Coxsackievirus B3 (CVB3) o Coxsackievirus A (CVB1/2). En otra realización más, el IRES es una secuencia IRES de Coxsackievirus B3 (CVB3). En una realización adicional, el IRES es una secuencia IRES del virus de la encefalomiocarditis.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye por lo menos un IRES que flanquea por lo menos una (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el IRES flanquea ambos lados de por lo menos una (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye una o más secuencias IRES a uno o ambos lados de cada secuencia de expresión, lo que lleva a la separación del péptido o péptidos y/o polipéptido o polipéptidos resultantes.

En algunas realizaciones, la carga de polirribonucleótido incluye un IRES. Por ejemplo, la carga de polirribonucleótido puede incluir un IRES de ARN circular, por ejemplo, como se describe en Chen et al. Mol. Cell 81:1-19, 2021.

Elementos reguladores

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido) incluye uno o más elementos reguladores. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye un elemento regulador, por ejemplo, una secuencia que modifica la expresión de una secuencia de expresión dentro del polirribonucleótido.

Un elemento regulador puede incluir una secuencia adyacente a una secuencia de expresión que codifica un producto de expresión. Un elemento regulador puede estar enlazado operativamente a la secuencia adyacente. Un elemento regulador puede aumentar la cantidad de producto expresado en comparación con la cantidad de producto expresado cuando no existe ningún elemento regulador. Además, un elemento regulador puede aumentar la cantidad de productos expresados para múltiples secuencias de expresión unidas en tándem. Por lo tanto, un elemento regulador puede aumentar la expresión de una o más secuencias de expresión. Los elementos reguladores múltiples son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, el elemento regulador es un modulador de la traducción. Un modulador de la traducción puede modular la traducción de la secuencia de expresión en el polirribonucleótido. Un modulador de la traducción puede ser un potenciador o supresor de la traducción. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye por lo menos un modulador de la traducción adyacente a por lo menos una secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye un modulador de la traducción adyacente a cada secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el modulador de la traducción está presente en uno o ambos lados de cada secuencia de expresión, lo que lleva a la separación de los productos de expresión, por ejemplo, péptido o péptidos y/o polipéptido o polipéptidos.

En algunas realizaciones, el elemento regulador es un microARN (miARN) o un sitio de unión a miARN.

Otros ejemplos de elementos reguladores se describen, por ejemplo, en los párrafos [0154] - [0161] de la Publicación de Patente Internacional Nº WO2019/118919.

Secuencias de inicio de la traducción

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido) incluye por lo menos una secuencia de inicio de la traducción. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye una secuencia de inicio de la traducción enlazada operativamente a una secuencia de expresión.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido codifica un polipéptido y puede incluir una secuencia de inicio de la traducción, por ejemplo, un codón de inicio. En algunas realizaciones, la secuencia de inicio de la traducción incluye una secuencia Kozak o Shine-Dalgamo. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye la secuencia de inicio de la traducción, por ejemplo, la secuencia de Kozak, adyacente a una secuencia de expresión. En algunas realizaciones, la secuencia de inicio de la traducción es un codón de inicio no codificante. En algunas realizaciones, la secuencia de inicio de la traducción, por ejemplo, la secuencia de Kozak, está presente en uno o ambos lados de cada secuencia de expresión, lo que lleva a la separación de los productos de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye por lo menos una secuencia de inicio de la traducción adyacente a una secuencia de expresión. En algunas realizaciones, la secuencia de inicio de la traducción proporciona flexibilidad conformacional al polirribonucleótido. En algunas realizaciones, la secuencia de inicio de la traducción se encuentra dentro de una región sustancialmente de cadena sencilla del polirribonucleótido. Ejemplos adicionales de secuencias de inicio de la traducción se describen en los párrafos [0163] - [0165] de la Publicación de Patente Internacional Nº WO2019/118919.

El polirribonucleótido puede incluir más de 1 codón de inicio como, pero no limitado a, por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19, por lo menos 20, por lo menos 25, por lo menos 30, por lo menos 35, por lo menos 40, por lo menos 50, por lo menos 60 o más de 60 codones de inicio. La traducción puede iniciarse en el primer codón de inicio o puede iniciarse en sentido descendente del primer codón de inicio.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido puede iniciarse en un codón que no es el primer codón de inicio, por ejemplo, AUG. La traducción del polirribonucleótido puede iniciarse en una secuencia de inicio de la traducción alternativa, como, por ejemplo, ACG, AGG, AAG, CTG/CUG (SEQ ID NO: 74), GTG/GUG (SEQ ID NO: 75), ATA/AUA (SEQ ID NO: 76), ATT/AUU (SEQ ID NO: 77), TTG/UUG (SEQ ID NO: 78). En algunas realizaciones, la traducción comienza en una secuencia alternativa de inicio de la traducción en condiciones selectivas, por ejemplo, condiciones inducidas por estrés. Como ejemplo no limitativo, la traducción del polirribonucleótido puede comenzar en una secuencia de inicio de traducción alternativa, como ACG. Como otro ejemplo no limitativo, la traducción del polirribonucleótido puede comenzar en la secuencia de inicio de traducción alternativa, CTG/CUG (SEQ ID NO: 74).

Como otro ejemplo no limitativo, la traducción del polirribonucleótido puede comenzar en la secuencia de inicio de traducción alternativa, GTG/GUG (SEQ ID NO: 75). Como otro ejemplo no limitativo, el polirribonucleótido puede comenzar la traducción en una secuencia no-AUG asociada a repetición (RAN), tal como una secuencia de inicio de traducción alternativa que incluye tramos cortos de ARN repetitivo, por ejemplo, CGG, GGGGCC (SEQ DI NO: 79), CAG, CTG.

Elementos de terminación

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido) incluye por lo menos un elemento de terminación. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye un elemento de terminación enlazado operativamente a una secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el polinucleótido carece de un elemento de terminación.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye una o más secuencias de expresión, y cada secuencia de expresión puede tener o no un elemento de terminación. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye una o más secuencias de expresión, y las secuencias de expresión carecen de un elemento de terminación, de tal manera que el polirribonucleótido se traduce continuamente. La exclusión de un elemento de terminación puede dar como resultado la traducción en círculo rodante o a la expresión continua del producto de expresión.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye una o más secuencias de expresión, y cada secuencia de expresión puede tener o no un elemento de terminación. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye una o más secuencias de expresión, y las secuencias de expresión carecen de un elemento de terminación, de tal manera que el polirribonucleótido circular se traduce continuamente. La exclusión de un elemento de terminación puede dar como resultado la traducción en círculo rodante o a la expresión continua del producto de expresión, por ejemplo, péptidos o polipéptidos, debido a la falta de estancamiento o caída del ribosoma. En tal realización, la traducción en círculo rodante expresa un producto de expresión continuo a través de cada secuencia de expresión. En otras realizaciones, un elemento de terminación de una secuencia de expresión puede formar parte de un elemento de escalonamiento. En algunas realizaciones, una o más secuencias de expresión en el polirribonucleótido circular comprenden un elemento de terminación. Sin embargo, se lleva a cabo la traducción del círculo rodante o la expresión de una secuencia de expresión sucesiva (por ejemplo, segunda, tercera, cuarta, quinta, etc.) en el polirribonucleótido circular. En tales casos, el producto de expresión puede caerse del ribosoma cuando éste encuentra el elemento de terminación, por ejemplo, un codón de parada, y termina la traducción. En algunas realizaciones, la traducción se termina mientras el ribosoma, por ejemplo, por lo menos una subunidad del ribosoma, permanece en contacto con el polirribonucleótido circular.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye un elemento de terminación al final de una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, una o más secuencias de expresión comprenden dos o más elementos de terminación en sucesión. En tales realizaciones, se termina la traducción y se termina la traducción del círculo rodante. En algunas realizaciones, el ribosoma se desacopla completamente del polirribonucleótido circular. En algunas de tales realizaciones, la producción de una secuencia de expresión sucesiva (por ejemplo, segunda, tercera, cuarta, quinta, etc.) en el polirribonucleótido circular puede requerir que el ribosoma vuelva a acoplarse con el polirribonucleótido circular antes del inicio de la traducción. Generalmente, los elementos de terminación incluyen un triplete de nucleótidos en el marco que señala la terminación de la traducción, por ejemplo, UAA, UGA, UAG. En algunas realizaciones, uno o más elementos de terminación en el polirribonucleótido circular son elementos de terminación desplazados de marco como, pero no limitados a, marcos de lectura desplazados fuera de marco o -1 y + 1 (por ejemplo, parada oculta) que pueden terminar la traducción. Los elementos de terminación desplazados de marco incluyen los tripletes de nucleótidos TAA, TAG y TGA que aparecen en el segundo y tercer marco de lectura de una secuencia de expresión. Los elementos de terminación desplazados de marco pueden ser importantes para evitar lecturas erróneas del ARNm, que a menudo son perjudiciales para la célula. En algunas realizaciones, el elemento de terminación es un codón de parada.

Ejemplos adicionales de elementos de terminación se describen en los párrafos [0169] - [0170] de la Publicación de Patente Internacional Nº WO2019/118919.

Regiones no traducidas

En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular incluye regiones no traducidas (UTR). Las UTR de una región genómica que incluye un gen pueden transcribirse pero no traducirse. En algunas realizaciones, una UTR puede incluirse en sentido ascendente de la secuencia de inicio de la traducción de una secuencia de expresión descrita en la presente. En algunas realizaciones, una UTR puede incluirse en sentido descendente de una secuencia de expresión descrita en la presente. En algunas realizaciones, una UTR para la primera secuencia de expresión es la misma que o continua con o está solapada con otra UTR para una segunda secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el intrón es un intrón humano. En algunas realizaciones, el intrón es un intrón humano de longitud completa, por ejemplo, ZKSCAN1.

Regiones no traducidas ejemplares se describen en los párrafos [0197] - [201] de la Publicación de Patente Internacional Nº WO2019/118919.

En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular incluye una secuencia poli-A. Las secuencias poli-A ejemplares se describen en los párrafos [0202] - [0205] de la Publicación de Patente Internacional Nº WO2019/118919. En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular carece de una secuencia poli-A.

En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular incluye una UTR con uno o más tramos de Adenosinas y Uridinas incorporados en su interior. Estas firmas ricas en AU pueden aumentar las tasas de recambio del producto de expresión.

La introducción, eliminación o modificación de elementos ricos en AU (ARE) de la UTR puede ser útil para modular la estabilidad o inmunogenicidad (por ejemplo, el nivel de uno o más marcadores de una respuesta inmunitaria o inflamatoria) del polirribonucleótido circular. Cuando se manipulan polirribonucleótidos circulares específicos, en el polirribonucleótido circular pueden introducirse una o más copias de un ARE y las copias de un ARE pueden modular la traducción y/o la producción de un producto de expresión. De igual manera, los ARE pueden ser identificados y eliminados o manipulados en el polirribonucleótido circular para modular la estabilidad intracelular y afectar por tanto a la traducción y producción de la proteína resultante.

Debe entenderse que puede incorporarse cualquier UTR de cualquier gen en las regiones flanqueantes respectivas del polirribonucleótido circular.

En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular carece de una 5'-UTR y es competente para la expresión de proteínas a partir de su una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de una 3'-UTR y es competente para la expresión de proteínas a partir de su una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de una secuencia poli-A y es competente para la expresión de proteínas a partir de su una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de un elemento de terminación y es competente para la expresión de proteínas a partir de su una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de un sitio de entrada ribosómico interno y es competente para la expresión de proteínas a partir de su una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de una caperuza y es competente para la expresión de proteínas a partir de su una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de una 5'-UTR, una 3'-UTR y un IRES, y es competente para la expresión de proteínas a partir de su una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye una o más de las siguientes secuencias: una secuencia que codifica uno o más miARN, una secuencia que codifica una o más proteínas de replicación, una secuencia que codifica un gen exógeno, una secuencia que codifica un terapéutico, un elemento regulador (por ejemplo, modulador de la traducción, por ejemplo, potenciador o supresor de la traducción), una secuencia de inicio de la traducción, uno o más ácidos nucleicos reguladores dirigidos a genes endógenos (por ejemplo, ARNip, ARNlnc, ARNhc), y una secuencia que codifica un ARNm o proteína terapéuticos.

En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular carece de una 5'-UTR. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de una 3'-UTR. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de una secuencia poli-A. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de un elemento de terminación. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de un sitio de entrada ribosómico interno. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de susceptibilidad a la degradación por exonucleasas. En algunas realizaciones, el hecho de que el polirribonucleótido circular carezca de susceptibilidad a la degradación puede significar que el polirribonucleótido circular no se degrada por una exonucleasa, o sólo se degrada en presencia de una exonucleasa en una medida limitada, por ejemplo, que es comparable o similar a en ausencia de exonucleasa. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular no es degradado por exonucleasas. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular tiene una degradación reducida cuando se expone a la exonucleasa. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de unión a una proteína de unión a caperuza. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular carece de caperuza 5'.

Elementos de escalonamiento

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye por lo menos un elemento de escalonamiento adyacente a una secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye un elemento de escalonamiento adyacente a cada secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el elemento de escalonamiento está presente en uno o ambos lados de cada secuencia de expresión, lo que lleva a la separación de los productos de expresión, por ejemplo, péptido o péptidos y/o polipéptido o polipéptidos. En algunas realizaciones, el elemento de escalonamiento es una porción de una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular comprende una o más secuencias de expresión, y cada una de las una o más secuencias de expresión está separada de una secuencia de expresión sucesiva por un elemento de escalonamiento en el polirribonucleótido circular. En algunas realizaciones, el elemento de escalonamiento impide la generación de un único

polipéptido (a) a partir de dos rondas de traducción de una única secuencia de expresión o (b) a partir de una o más rondas de traducción de dos o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el elemento de escalonamiento es una secuencia separada de una o más secuencias de expresión. En algunas realizaciones, el elemento de escalonamiento comprende una porción de una secuencia de expresión de la una o más secuencias de expresión.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye un elemento de escalonamiento. Para evitar la producción de un producto de expresión continua, por ejemplo, un péptido o polipéptido, mientras se mantiene la traducción del círculo rodante, puede incluirse un elemento de escalonamiento para inducir la pausa ribosómica durante la traducción. En algunas realizaciones, el elemento de escalonamiento se encuentra en el extremo 3' de por lo menos una de las una o más secuencias de expresión. El elemento de escalonamiento puede configurarse para detener un ribosoma durante la traducción en círculo rodante del polirribonucleótido circular. El elemento de escalonamiento puede incluir, pero no se limita a una secuencia tipo 2A, o CHYSEL (SEQ ID NO: 71) (elemento hidrolasa de acción cis). En algunas realizaciones, el elemento de escalonamiento codifica una secuencia con una secuencia consenso C-terminal que es $X_1X_2X_3EX_5NPGP$ (SEQ ID NO: 72), donde X_1 está ausente o es G o H, X_2 está ausente o es D o G, X_3 es D o V o I o S o M, y X_5 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, esta secuencia comprende una secuencia no conservada de aminoácidos con una fuerte propensión alfa-helicoidal seguida de la secuencia consenso -D(V/I)EXNPGP (SEQ ID NO: 73), donde x= cualquier aminoácido. Algunos ejemplos no limitativos de elementos de escalonamiento incluyen GDVESNPGP (SEQ ID NO: 52), GDIEENPGP (SEQ ID NO: 53), VEPNPGP (SEQ ID NO: 54), IETNPGP (SEQ ID NO: 55), GDIESNPGP (SEQ ID NO: 56), GDVELNPGP (SEQ ID NO: 57), GDIETNPGP (SEQ ID NO: 58), GDVENPGP (SEQ ID NO: 59), GDVEENPGP (SEQ ID NO: 60), GDVEQNPGP (SEQ ID NO: 61), IESNPGP (SEQ ID NO: 62), GDIELNPGP (SEQ ID NO: 63), HDIETNPGP (SEQ ID NO: 64), HDVETNPGP (SEQ ID NO: 65), HDVEMNPGP (SEQ ID NO: 66), GDMESNPGP (SEQ ID NO: 67), GDVETNPGP (SEQ ID NO: 68) GDIEQNPGP (SEQ ID NO: 69), y DSEFNPGP (SEQ ID NO: 70).

En algunas realizaciones, el elemento de escalonamiento descrito en la presente escinde un producto de expresión, como entre G y P de la secuencia consenso descrita en la presente. Como ejemplo no limitativo, el polirribonucleótido circular incluye por lo menos un elemento de escalonamiento para escindir el producto de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye un elemento de escalonamiento adyacente a por lo menos una secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye un elemento de escalonamiento después de cada secuencia de expresión. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye un elemento de escalonamiento presente en uno o ambos lados de cada secuencia de expresión, lo que lleva a la traducción de péptido o péptidos y/o polipéptido o polipéptidos individuales a partir de cada secuencia de expresión.

En algunas realizaciones, un elemento de escalonamiento comprende uno o más nucleótidos modificados o nucleótidos no naturales que inducen la pausa ribosómica durante la traducción. Los nucleótidos no naturales pueden incluir ácido nucleico peptídico (PNA), Morfolino y ácido nucleico bloqueado (LNA), así como ácido nucleico glicólico (GNA) y ácido nucleico de treosa (TNA). Ejemplos como éstos se distinguen del ADN o ARN de origen natural por los cambios en la estructura principal de la molécula. Las modificaciones ejemplares pueden incluir cualquier modificación del azúcar, la nucleobase, el enlace internucleosídico (por ejemplo, a un fosfato de enlace / a un enlace fosfodiéster / a la estructura principal de fosfodiéster), y cualquier combinación de los mismos que pueda inducir la pausa ribosómica durante la traducción. Algunas de las modificaciones ejemplares proporcionadas en la presente se describen en otra parte de la presente.

En algunas realizaciones, el elemento de escalonamiento está presente en el polirribonucleótido circular de otras formas. Por ejemplo, en algunos polirribonucleótidos circulares ejemplares, un elemento de escalonamiento comprende un elemento de terminación de una primera secuencia de expresión en el polirribonucleótido circular, y una secuencia espaciadora de nucleótidos que separa el elemento de terminación de una primera secuencia de inicio de la traducción de una expresión que sucede a la primera secuencia de expresión. En algunos ejemplos, el primer elemento de escalonamiento de la primera secuencia de expresión está en sentido ascendente de (5' a) una primera secuencia de inicio de la traducción de la expresión que sucede a la primera secuencia de expresión en el polirribonucleótido circular. En algunos casos, la primera secuencia de expresión y la secuencia de expresión que sucede a la primera secuencia de expresión son dos secuencias de expresión separadas en el polirribonucleótido circular. La distancia entre el primer elemento de escalonamiento y la primera secuencia de inicio de la traducción puede permitir la traducción continua de la primera secuencia de expresión y su secuencia de expresión sucesiva.

En algunas realizaciones, el primer elemento de escalonamiento comprende un elemento de terminación y separa un producto de expresión de la primera secuencia de expresión de un producto de expresión de sus secuencias de expresión sucesivas, creando de este modo productos de expresión discretos. En algunos casos, el polirribonucleótido circular que comprende el primer elemento de escalonamiento en sentido ascendente de la primera secuencia de inicio de la traducción de la secuencia sucesora en el polirribonucleótido circular se traduce continuamente, mientras que un polirribonucleótido circular correspondiente que comprende un elemento de escalonamiento de una segunda secuencia de expresión que está en sentido ascendente de una segunda secuencia de inicio de la traducción de una secuencia de expresión que sucede a la segunda secuencia de expresión no se traduce continuamente. En algunos casos, sólo hay una secuencia de expresión en el polirribonucleótido circular, y la

primera secuencia de expresión y su secuencia de expresión sucesiva son la misma secuencia de expresión. En algunos polirribonucleótidos circulares ejemplares, un elemento de escalonamiento comprende un primer elemento de terminación de una primera secuencia de expresión en el polirribonucleótido circular, y una secuencia espaciadora de nucleótidos que separa el elemento de terminación de una secuencia de inicio de traducción en sentido descendente. En algunos de tales ejemplos, el primer elemento de escalonamiento se encuentra en sentido ascendente (5' a) de una primera secuencia de inicio de la traducción de la primera secuencia de expresión en el polirribonucleótido circular. En algunos casos, la distancia entre el primer elemento de escalonamiento y la primera secuencia de inicio de la traducción permite la traducción continua de la primera secuencia de expresión y de cualquier secuencia de expresión posterior.

En algunas realizaciones, el primer elemento de escalonamiento separa un producto de expresión de una ronda de la primera secuencia de expresión del siguiente producto de expresión de una ronda de las primeras secuencias de expresión, creando de este modo productos de expresión discretos. En algunos casos, el polirribonucleótido circular que comprende el primer elemento de escalonamiento en sentido ascendente de la primera secuencia de inicio de la traducción de la primera secuencia de expresión en el polirribonucleótido circular se traduce continuamente, mientras que un polirribonucleótido circular correspondiente que comprende un elemento de escalonamiento en sentido ascendente de una segunda secuencia de inicio de la traducción de una segunda secuencia de expresión en el polirribonucleótido circular correspondiente no se traduce continuamente. En algunos casos, la distancia entre el segundo elemento de escalonamiento y la segunda secuencia de inicio de traducción es por lo menos 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, o 10x mayor en el polirribonucleótido circular correspondiente que una distancia entre el primer elemento de escalonamiento y la primera iniciación de traducción en el polirribonucleótido circular. En algunos casos, la distancia entre el primer elemento de escalonamiento y el primer inicio de traducción es de por lo menos 2 nt, 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt, 11 nt, 12 nt, 13 nt, 14 nt, 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt, 20 nt, 25 nt, 30 nt, 35 nt, 40 nt, 45 nt, 50 nt, 55 nt, 60 nt, 65 nt, 70 nt, 75 nt, o mayor. En algunas realizaciones, la distancia entre el segundo elemento de escalonamiento y el segundo inicio de traducción es de por lo menos 2 nt, 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 10 nt, 11 nt, 12 nt, 13 nt, 14 nt, 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt, 20 nt, 25 nt, 30 nt, 35 nt, 40 nt, 45 nt, 50 nt, 55 nt, 60 nt, 65 nt, 70 nt, 75 nt, o mayor que la distancia entre el primer elemento de escalonamiento y el primer inicio de traducción. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular comprende más de una secuencia de expresión.

Ejemplos de elementos de escalonamiento se describen en los párrafos [0172] - [0175] de la Publicación de Patente Internacional Nº WO2019/118919.

Secuencias no codificantes

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido descrito en la presente (por ejemplo, la carga de polirribonucleótido del polirribonucleótido) incluye una o más secuencias no codificantes, por ejemplo, una secuencia que no codifica la expresión del polipéptido. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez secuencias no codificantes. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido no codifica una secuencia de expresión de polipéptido.

Las secuencias no codificantes pueden ser secuencias naturales o sintéticas. En algunas realizaciones, una secuencia no codificante puede alterar el comportamiento celular, como por ejemplo, el comportamiento de los linfocitos. En algunas realizaciones, las secuencias no codificantes son antisentido de las secuencias de ARN celular.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye ácidos nucleicos reguladores que son ARN o estructuras similares al ARN típicamente de aproximadamente 5-500 pares de bases (bp) (dependiendo de la estructura de ARN específica (por ejemplo, miARN 5-30 bp, ARNc 200-500 bp) y pueden tener una secuencia de nucleobases idéntica (complementaria) o casi idéntica (sustancialmente complementaria) a una secuencia codificante en un gen diana expresado dentro de la célula. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye ácidos nucleicos reguladores que codifican un precursor de ARN que puede procesarse a un ARN más pequeño, por ejemplo, un precursor de miARN, que puede tener de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 bp, que puede procesarse a un miARN intermedio más pequeño o a un miARN maduro.

Los ARN no codificantes largos (ARNncL) se definen como transcritos no codificantes de proteínas de más de 100 nucleótidos. Muchos de ellos se caracterizan por ser específicos de un tejido. Los ARNncL divergentes que se transcriben en dirección opuesta a los genes codificantes de proteínas cercanos incluyen una proporción significativa (por ejemplo, aproximadamente el 20% del total de ARNncL en genomas de mamíferos) y posiblemente regulan la transcripción del gen cercano. En una realización, el polirribonucleótido proporcionado en la presente incluye una cadena de sentido de un ARNncL. En una realización, el polirribonucleótido proporcionado en la presente incluye una cadena antisentido de un ARNncL.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido codifica un ácido nucleico regulador que es sustancialmente complementario, o completamente complementario, a todo o por lo menos un fragmento de un gen endógeno o producto génico (por ejemplo, ARNm). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos reguladores complementan

secuencias en el límite entre intrones y exones, entre exones o adyacentes a un exón, para impedir la maduración de transcritos de ARN nuclear recién generados de genes específicos en ARNm para su transcripción. Los ácidos nucleicos reguladores que son complementarios a genes específicos pueden hibridar con el ARNm de ese gen e impedir su traducción. El ácido nucleico regulador antisentido puede ser ADN, ARN o un derivado o híbrido de los mismos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico regulador incluye un sitio de unión a proteínas que puede unirse a una proteína que participa en la regulación de la expresión de un gen endógeno o un gen exógeno.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido codifica un ARN regulador que hibrida con un transcrito de interés en donde el ARN regulador tiene una longitud de aproximadamente 5 a 30 nucleótidos, de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos, o de aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el grado de identidad de secuencia del ARN regulador con el transcrito diana es de por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90% o por lo menos el 95%.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido codifica una molécula de microARN (miARN) idéntica a de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 nucleótidos contiguos de un gen diana o codifica un precursor de ese miARN. En algunas realizaciones, el miARN tiene una secuencia que le permite reconocer y unirse a un ARNm diana específico. En algunas realizaciones, la secuencia de miARN comienza con el dinucleótido AA, incluye un contenido de GC de aproximadamente el 30-70% (aproximadamente el 30-60%, aproximadamente el 40-60%, o aproximadamente el 45%-55%), y no tiene un alto porcentaje de identidad con ninguna secuencia de nucleótidos distinta de la diana en el genoma del sujeto (por ejemplo, un mamífero) en el que se va a introducir, por ejemplo, según lo determinado por una búsqueda BLAST estándar.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye por lo menos un miARN (o precursor de miARN), por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, o más miARN o precursores de miARN. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye una secuencia que codifica un miARN (o su precursor) que tiene por lo menos aproximadamente un 75%, 80%, 85%, 90% 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o 100% de complementariedad de secuencia de nucleótidos con una secuencia diana.

Los ARNip y los ARNhc se asemejan a productos intermedios en la vía de procesamiento de los genes de microARN (miARN) endógenos. En algunas realizaciones, los ARNip pueden funcionar como miARN y viceversa. Los microARN, al igual que los ARNip, usan RISC para regular por disminución los genes diana, pero a diferencia de los ARNip, la mayoría de los miARN animales no escinden el ARNm. En su lugar, los miARN reducen la producción de proteínas mediante la supresión de la traducción o la eliminación de poliA y la degradación del ARNm. Los sitios de unión de miARN conocidos se encuentran dentro de las UTR 3' del ARNm; los miARN parecen dirigirse a sitios con una complementariedad casi perfecta con los nucleótidos 2-8 del extremo 5' del miARN. Esta región se conoce como región semilla. Como los ARNip maduros y los miARN son intercambiables, los ARNip exógenos regulan por diminución los ARNm con complementariedad de semilla con el ARNip.

Listas de secuencias de miARN conocidas pueden encontrarse en bases de datos mantenidas por organizaciones de investigación, como el Wellcome Trust Sanger Institute, el Penn Center for Bioinformatics, el Memorial Sloan Kettering Cancer Center y el European Molecule Biology Laboratory, entre otros. Las secuencias de ARNip eficaces conocidas y los sitios de unión afines también están bien representados en la bibliografía relevante. Las moléculas de ARNi se diseñan y producen fácilmente mediante tecnologías conocidas en la técnica. Además, existen herramientas computacionales que aumentan las posibilidades de encontrar motivos de secuencia eficaces y específicos.

Secuencias de unión a proteínas

En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular incluye uno o más sitios de unión a proteínas que permiten que una proteína, por ejemplo, un ribosoma, se una a un sitio interno de la secuencia de ARN. Mediante la manipulación de sitios de unión a proteínas, por ejemplo, sitios de unión a ribosomas, en el polirribonucleótido circular, el polirribonucleótido circular puede evadir o tener una detección reducida por parte del sistema inmunitario del huésped, tener una degradación modulada, o traducción moduladla, enmascarando el polirribonucleótido circular de los componentes del sistema inmunitario del huésped.

En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular incluye por lo menos un sitio de unión a inmunoproteínas, por ejemplo, para evadir respuestas inmunitarias, por ejemplo, respuestas de CTL (linfocitos T citotóxicos). En algunas realizaciones, el sitio de unión a inmunoproteínas es una secuencia de nucleótidos que se une a una inmunoproteína y ayuda a enmascarar el polirribonucleótido circular como exógeno. En algunas realizaciones, el sitio de unión a inmunoproteína es una secuencia de nucleótidos que se une a una inmunoproteína y ayuda a ocultar el polirribonucleótido circular como exógeno o extraño.

Los mecanismos tradicionales de acoplamiento del ribosoma al ARN lineal implican la unión del ribosoma al extremo 5' con caperuza de un ARN. Desde el extremo 5', el ribosoma migra a un codón de inicio, donde se forma el

primer enlace peptídico. De acuerdo con la presente divulgación, el inicio interno (es decir, independiente de la caperuza) de la traducción del polirribonucleótido circular no requiere un extremo libre o un extremo con caperuza. En su lugar, un ribosoma se une a un sitio interno sin caperuza, por lo que el ribosoma comienza la elongación del polipéptido en un codón de inicio. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular incluye una o más secuencias de ARN que incluyen un sitio de unión al ribosoma, por ejemplo, un codón de inicio.

Las UTR 5' naturales presentan características que desempeñan un papel en el inicio de la traducción. Albergan firmas como las secuencias Kozak, que se sabe que están implicadas en el proceso por el que el ribosoma inicia la traducción de muchos genes. Las secuencias Kozak tienen el consenso CCR(A/G)CCAUGG (SEQ ID NO: 79), donde R es una purina (adenina o guanina) tres bases en sentido ascendente del codón de inicio (AUG), que va seguido de otra 'G'. También se sabe que las'UTR 5 forman estructuras secundarias que intervienen en la unión del factor de elongación.

En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular codifica una secuencia de unión a proteínas que se une a una proteína. En algunas realizaciones, la secuencia de unión a proteínas dirige o localiza el polirribonucleótido circular a una diana específica. En algunas realizaciones, la secuencia de unión a proteínas se une específicamente a una región rica en arginina de una proteína.

En algunas realizaciones, el sitio de unión a la proteína incluye, pero no se limita a, un sitio de unión a la proteína como ACIN1, AGO, APOBEC3F, APOBEC3G, ATXN2, AUH, BCCIP, CAPRIN1, CELF2, CPSF1, CPSF2, CPSF6, CPSF7, CSTF2, CSTF2T, CTCF, DDX21, DDX3, DDX3X, DDX42, DGCR8, EIF3A, EIF4A3, EIF4G2, ELAVL1, ELAVL3, FAM120A, FBL, FIP1L1, FKBP4, FMR1, FUS, FXR1, FXR2, GNL3, GTF2F1, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPC, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPU, HNRNPUL1, IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3, ILF3, KHDRBS1, LARP7, LIN28A, LIN28B, m6A, MBNL2, METTL3, MOV10, MSI1, MSI2, NONO, NONO-, NOP58, NPM1, NUDT21, PCBP2, POLR2A, PRPF8, PTBP1, RBFOX2, RBM10, RBM22, RBM27, RBM47, RNPS1, SAFB2, SBDS, SF3A3, SF3B4, SIRT7, SLBP, SLTM, SMNDC1, SND1, SRRM4, SRSF1, SRSF3, SRSF7, SRSF9, TAF15, TARDBP, TIA1, TNRC6A, TOP3B, TRA2A, TRA2B, U2AF1, U2AF2, UNK, UPF1, WDR33, XRN2, YBX1, YTHDC1, YTHDF1, YTHDF2, YWHAG, ZC3H7B, PDK1, AKT1, y cualquier otra proteína que se una al ARN.

Secuencias espaciadoras

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido descrito en la presente incluye una o más secuencias espaciadoras. Un espaciador se refiere a cualquier secuencia contigua de nucleótidos (por ejemplo, de uno o más nucleótidos) que proporciona distancia o flexibilidad entre dos regiones polinucleotídicas adyacentes. Los espaciadores pueden estar presentes entre cualquiera de los elementos de ácido nucleico descritos en la presente. Los espaciadores también pueden estar presentes dentro de un elemento de ácido nucleico descrito en la presente.

Por ejemplo, en donde un ácido nucleico incluye dos o más de los siguientes elementos: (A) la mitad 3' de un fragmento de intrón catalítico del Grupo I; (B) un sitio de corte y empalme 3'; (C) un fragmento de exón 3'; (D) una carga de polirribonucleótido; (E) un fragmento de exón 5'; (F) un sitio de corte y empalme 5'; y (G) la mitad 5' de un fragmento de intrón catalítico del Grupo I; puede haber una región espaciadora entre uno cualquiera o más de los elementos. Cualquiera de los elementos (A), (B), (C), (D), (E), (F) o (G) puede estar separado por una secuencia espaciadora, tal como se describe en la presente. Por ejemplo, puede haber un espaciador entre (A) y (B), entre (B) y (C), entre (C) y (D), entre (D) y (E), entre (E) y (F), o entre (F) y (G).

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye además una primera región espaciadora entre el fragmento de exón 5' de (C) y la carga de polirribonucleótido de (D). El espaciador puede tener, por ejemplo, por lo menos 5 (por ejemplo, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20) ribonucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye además una segunda región espaciadora entre la carga de polirribonucleótido de (D) y el fragmento de exón 5' de (E). El espaciador puede tener, por ejemplo, por lo menos 5 (por ejemplo, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20) ribonucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, cada región espaciadora tiene por lo menos 5 (por ejemplo, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20) ribonucleótidos de longitud. Cada región espaciadora puede tener, por ejemplo, de 5 a 500 (por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500) ribonucleótidos de longitud. La primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora pueden incluir una secuencia poliA. La primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora pueden incluir una secuencia poliA-C. En algunas realizaciones, la primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora incluyen una secuencia poliA-G. En algunas realizaciones, la primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora incluyen una secuencia poliA-T. En algunas realizaciones, la primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora incluyen una secuencia aleatoria.

Los espaciadores también pueden estar presentes dentro de una región de ácido nucleico descrita en la presente. Por ejemplo, una región de carga de polinucleótidos puede incluir uno o múltiples espaciadores. Los

espaciadores pueden separar regiones dentro de la carga de polinucleótidos.

En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora puede tener, por ejemplo, por lo menos 10 nucleótidos de longitud, por lo menos 15 nucleótidos de longitud o por lo menos 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora tiene por lo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora no tiene más de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora tiene de 20 a 50 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora tiene 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud.

Las secuencias espaciadoras pueden ser secuencias poliA, secuencias poliA-C, secuencias poliC o secuencias poli-U.

En algunas realizaciones, las secuencias espaciadoras pueden ser poliA-T, poliA-C, poliA-G, o una secuencia aleatoria.

Una secuencia espaciadora puede usarse para separar un IRES de los elementos estructurales adyacentes para mantener la estructura y la función del IRES o del elemento adyacente. Un espaciador puede manipularse específicamente dependiendo del IRES. En algunas realizaciones, puede utilizarse un programa informático de plegamiento de ARN, como RNAFold, para guiar los diseños de los varios elementos del vector, incluyendo los espaciadores.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye una secuencia espaciadora 5' (por ejemplo, entre la región de apareamiento 5' y la carga de polirribonucleótido). En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' tiene por lo menos 10 nucleótidos de longitud. En otra realización, la secuencia espaciadora 5' tiene por lo menos 15 nucleótidos de longitud. En una realización adicional, la secuencia espaciadora 5' tiene por lo menos 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' tiene por lo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' no tiene más de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' tiene entre 20 y 50 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' tiene 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud. En una realización, la secuencia espaciadora 5' es una secuencia poliA. En otra realización, la secuencia espaciadora 5' es una secuencia poliA-C. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' incluye una secuencia poliA-G. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' incluye una secuencia poliA-T. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' incluye una secuencia aleatoria.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido incluye una secuencia espaciadora 3' (por ejemplo, entre la región de apareamiento 3' y la carga de polirribonucleótido). En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' tiene por lo menos 10 nucleótidos de longitud. En otra realización, la secuencia espaciadora 3' tiene por lo menos 15 nucleótidos de longitud. En una realización adicional, la secuencia espaciadora 3' tiene por lo menos 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' tiene por lo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' no tiene más de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' tiene de 20 a 50 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' tiene 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud. En una realización, la secuencia espaciadora 3' es una secuencia poliA. En otra realización, la secuencia espaciadora 5' es una secuencia poliA-C. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' incluye una secuencia poliA-G. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' incluye una secuencia poliA-T. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' incluye una secuencia aleatoria.

En una realización, el polirribonucleótido incluye una secuencia espaciadora 5', pero no una secuencia espaciadora 3'. En otra realización, el polirribonucleótido incluye una secuencia espaciadora 3', pero no una secuencia espaciadora 5'. En otra realización, el polirribonucleótido no incluye ni una secuencia espaciadora 5' ni una secuencia espaciadora 3'. En otra realización, el polirribonucleótido no incluye una secuencia IRES. En otra realización, el polirribonucleótido no incluye una secuencia IRES, una secuencia espaciadora 5' ni una secuencia espaciadora 3'.

En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora incluye por lo menos 3 ribonucleótidos, por lo menos 4 ribonucleótidos, por lo menos 5 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 8 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 10 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 12 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 15 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 20 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 25 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 30 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 40 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 50 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 60 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 70 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 80 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 90 ribonucleótidos, por lo menos

aproximadamente 100 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 120 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 150 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 200 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 250 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 300 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 400 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 500 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 600 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 700 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 800 ribonucleótidos, por lo menos aproximadamente 900 ribonucleótidos, o por lo menos aproximadamente 100 ribonucleótidos.

Métodos de producción

Métodos de producción en un sistema libre de células

La divulgación también proporciona métodos para producir un ARN circular. Por ejemplo, una plantilla de desoxirribonucleótido puede transcribirse en un sistema libre de células (por ejemplo, mediante transcripción in vitro) para producir un ARN lineal. El polirribonucleótido lineal produce un polirribonucleótido compatible con el corte y empalme, que puede auto-cortarse y empalmarse para producir un polirribonucleótido circular.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para producir un polirribonucleótido circular (por ejemplo, en un sistema libre de células) proporcionando un polirribonucleótido lineal; y auto-cortando y empalmando el polirribonucleótido lineal en condiciones adecuadas para el corte y empalme de los sitios de corte y empalme 3' y 5' del polirribonucleótido lineal; produciendo de este modo un polirribonucleótido circular.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para producir un polirribonucleótido circular proporcionando un desoxirribonucleótido que codifica el polirribonucleótido lineal; transcribiendo el desoxirribonucleótido en un sistema libre de células para producir el polirribonucleótido lineal; opcionalmente, purificando el polirribonucleótido lineal compatible con el corte y empalme; y auto-cortando y empalmando el polirribonucleótido lineal en condiciones adecuadas para el corte y empalme de los sitios de corte y empalme 3' y 5' del polirribonucleótido lineal, produciendo de este modo un polirribonucleótido circular.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para producir un polirribonucleótido circular proporcionando un desoxirribonucleótido que codifica un polirribonucleótido lineal; transcribiendo el desoxirribonucleótido en un sistema libre de células para producir el polirribonucleótido lineal, en donde la transcripción se produce en una solución en condiciones adecuadas para el corte y empalme de los sitios de corte y empalme 3' y 5' del polirribonucleótido lineal, produciendo de este modo un polirribonucleótido circular. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal comprende un intrón dividido 5' y un intrón dividido 3' (por ejemplo, un constructo de auto-corte y empalme para producir un polirribonucleótido circular). En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal comprende una región de apareamiento 5' y una región de apareamiento 3'.

Las condiciones adecuadas para la transcripción y/o auto-corte y empalme in vitro pueden incluir cualquier condición (por ejemplo, una solución o un tampón, como un tampón o solución acuosa) que imite las condiciones fisiológicas en uno o más aspectos. En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas incluyen entre 0,1-100mM de iones Mg2+ o una sal de los mismos (por ejemplo, 1-100mM, 1-50mM, 1-20mM, 5-50mM, 5-20 mM, o 5-15mM). En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas incluyen entre 1-1000mM de iones K+ o una sal de los mismos como KCl (por ejemplo, 1-1000mM, 1-500mM, 1-200mM, 50- 500mM, 100-500mM, o 100-300mM). En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas incluyen entre 1-1000mM de iones Cl- o una sal de los mismos como KCl (por ejemplo, 1-1000mM, 1-500mM, 1-200mM, 50- 500mM, 100-500mM, o 100-300mM). En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas incluyen entre 0,1-100mM de iones Mn2+ o una sal de los mismos como MnCl2 (por ejemplo, 0,1-100mM, 0,1-50mM, 0,1-20mM, 0,1-10mM, 0,1-5mM, 0,1-2mM, 0,5-50mM, 0,5-20 mM, 0,5-15mM, 0,5-5mM, 0,5-2mM, o 0,1-10mM). En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas incluyen ditiotreitol (DTT) (por ejemplo, 1-1000 µM, 1-500 µM, 1-200µM, 50- 500µM, 100-500µM, 100-300µM, 0,1-100mM, 0,1-50mM, 0,1-20mM, 0,1-10mM, 0,1-5mM, 0,1-2mM, 0,5-50mM, 0,5-20 mM, 0,5-15mM, 0,5-5mM, 0,5-2mM, o 0,1-10mM). En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas incluyen entre 0,1mM y 100mM de ribonucleósido trifosfato (NTP) (por ejemplo, 0,1-100 mM, 0,1-50mM, 0,1-10mM, 1- 100mM, 1-50mM, o 1-10mM). En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas incluyen un pH de 4 a 10 (por ejemplo, pH de 5 a 9, pH de 6 a 9, o pH de 6,5 a 8,5). En algunas realizaciones, las condiciones adecuadas incluyen una temperatura de 4ºC a 50ºC (por ejemplo, de 10ºC a 40ºC, de 15ºC a 40ºC, de 20ºC a 40ºC, o de 30ºC a 40ºC),

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal se produce a partir de un ácido desoxirribonucleico, por ejemplo, un ácido desoxirribonucleico descrito en la presente, como un vector de ADN, un vector de ADN linealizado o un ADNc. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal se transcribe a partir del ácido desoxirribonucleico por transcripción en un sistema libre de células (por ejemplo, transcripción in vitro).

Métodos de producción en célula

La divulgación también proporciona métodos para producir un ARN circular en una célula, por ejemplo, una

célula procariota o una célula eucariota. En algunas realizaciones, se proporciona un polirribonucleótido exógeno a una célula (por ejemplo, un polirribonucleótido lineal descrito en la presente o una molécula de ADN que codifica para la transcripción de un polirribonucleótido lineal descrito en la presente). Los polirribonucleótidos lineales pueden transcribirse en la célula a partir de una molécula de ADN exógena proporcionada a la célula. El polirribonucleótido lineal puede transcribirse en la célula a partir de una molécula de ADN recombinante exógena proporcionada transitoriamente a la célula. En algunas realizaciones, la molécula de ADN exógena no se integra en el genoma de la célula. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal se transcribe en la célula a partir de una molécula de ADN recombinante que se incorpora al genoma de la célula.

En algunas realizaciones, la célula es una célula procariota. En algunas realizaciones, la célula procariota que incluye los polirribonucleótidos descritos en la presente puede ser una célula bacteriana o una célula arquea. Por ejemplo, la célula procariota que incluye los polirribonucleótidos descritos en la presente puede ser E coli, arqueas halófilas (por ejemplo, Haloferax volcaniii), Sphingomonas, cianobacterias (por ejemplo, Synechococcus elongatus, Spirulina (Arthrospira) spp. y Synechocystis spp.), Streptomyces, actinomicetos (por ejemplo, Nonomuraea, Kitasatospora o Thermobifida), Bacillus spp. (por ejemplo, Bacillus subtilis, Bacillus anthracis o Bacillus cereus), betaproteobacterias (por ejemplo, Burkholderia), alfaproteobacterias (por ejemplo, Agrobacterium), Pseudomonas (por ejemplo, Pseudomonas putida) y enterobacterias. Las células procariotas pueden cultivarse en un medio de cultivo. Las células procariotas pueden estar contenidas en un biorreactor.

En algunas realizaciones, la célula es una célula eucariota. En algunas realizaciones, la célula eucariota que incluye los polirribonucleótidos descritos en la presente es una célula eucariota unicelular. En algunas realizaciones, la célula eucariota unicelular es una célula fúngica unicelular como una célula de levadura (por ejemplo, Saccharomyces cerevisiae y otras Saccharomyces spp., Brettanomyces spp., Schizosaccharomyces spp., Torulaspora spp. y Pichia spp.). En algunas realizaciones, la célula eucariota unicelular es una célula animal unicelular. Una célula animal unicelular puede ser una célula aislada de un animal multicelular y cultivada, o las células hijas de la misma. En algunas realizaciones, la célula animal unicelular puede estar desdiferenciada. En algunas realizaciones, la célula eucariota unicelular es una célula vegetal unicelular. Una célula vegetal unicelular puede ser una célula aislada de una planta multicelular y cultivada, o las células hijas de la misma. En algunas realizaciones, la célula vegetal unicelular puede estar desdiferenciada. En algunas realizaciones, la célula vegetal unicelular procede de un callo vegetal. En algunas realizaciones, la célula unicelular es un protoplasto de célula vegetal. En algunas realizaciones, la célula eucariota unicelular es una célula de alga eucariota unicelular, como un alga verde unicelular, una diatomea, un euglénido o un dinoflagelado. Ejemplos no limitativos de algas eucariotas unicelulares de interés incluyen Dunaliella salina, Chlorella vulgaris, Chlorella zofingiensis, Haematococcus pluvialis, Neochloris oleoabundans y otras Neochloris spp, Protosiphon botryoides, Botryococcus braunii, Cryptococcus spp., Chlamydomonas reinhardtii y otras Chlamydomonas spp. En algunas realizaciones, la célula eucariota unicelular es una célula protista. En algunas realizaciones, la célula eucariota unicelular es una célula protozoaria.

En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula de un eucariota multicelular. Por ejemplo, el eucariota multicelular puede seleccionarse del grupo formado por un animal vertebrado, un animal invertebrado, un hongo multicelular, un alga multicelular y una planta multicelular. En algunas realizaciones, el organismo eucariota es un humano. En algunas realizaciones, el organismo eucariota es un animal vertebrado no humano. En algunas realizaciones, el organismo eucariota es un animal invertebrado. En algunas realizaciones, el organismo eucariota es un hongo multicelular. En algunas realizaciones, el organismo eucariota es una planta multicelular. En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula humana o una célula de un mamífero no humano como un primate no humano (por ejemplo, monos, simios), ungulados (por ejemplo, bóvidos, incluyendo vacas, búfalos, bisontes, ovejas, cabras y bueyes almizcleros; cerdos; camélidos, incluyendo camellos, llamas y alpacas; ciervos, antílopes; y équidos, incluyendo caballos y asnos), carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, hámsteres, ardillas) o lagomorfos (por ejemplo, conejos y liebres). En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula de ave, como un miembro de los taxones aviares Galliformes (por ejemplo, pollos, pavos, faisanes, codornices), Anseriformes (por ejemplo, patos, gansos), Paleaognathae (por ejemplo, avestruces, emúes), Columbiformes (por ejemplo, palomos, palomas) o Psittaciformes (por ejemplo, loros). En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula de un artrópodo (por ejemplo, insectos, arácnidos, crustáceos), un nematodo, un anélido, un helminto o un molusco. En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula de una planta pluricelular, como una planta angiosperma (que puede ser dicotiledónea o monocotiledónea) o una planta gimnosperma (por ejemplo, una conífera, una cicadácea, una gnetófita, un Ginkgo), un helecho, una cola de caballo, un musgo o una briofita. En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula de un alga multicelular eucariota.

Las células eucariotas pueden cultivarse en un medio de cultivo. Las células eucariotas pueden estar contenidas en un biorreactor.

Métodos de purificación

En los métodos descritos en la presente pueden incluirse uno o más pasos de purificación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polirribonucleótido lineal está sustancialmente enriquecido o puro (por ejemplo, purificado) antes del auto-corte y empalme del polirribonucleótido lineal. En otras realizaciones, el polirribonucleótido lineal no se

purifica antes del auto-corte y empalme del polirribonucleótido lineal. En algunas realizaciones, se purifica el ARN circular resultante.

La purificación puede incluir la separación o el enriquecimiento del producto de reacción deseado de uno o más componentes no deseados, como cualquier material de reacción que no haya reaccionado, subproductos, enzimas u otros componentes de reacción. Por ejemplo, la purificación del polirribonucleótido lineal después de la transcripción en un sistema libre de células (por ejemplo, transcripción in vitro) puede incluir la separación o el enriquecimiento a partir de la plantilla de ADN antes del auto-corte y empalme del polirribonucleótido lineal. La purificación del producto de ARN circular después del corte y empalme puede usarse para separar o enriquecer el ARN circular de su ARN lineal correspondiente. Los métodos de purificación del ARN son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen la purificación enzimática o por cromatografía.

En algunas realizaciones, los métodos de purificación dan como resultado un polirribonucleótido circular que tiene menos del 50% (por ejemplo, menos del 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1%) de polirribonucleótidos lineales.

Biorreactores

En algunas realizaciones, cualquier método de producción de un polirribonucleótido circular descrito en la presente puede llevarse a cabo en un biorreactor. Un biorreactor se refiere a cualquier recipiente en el que se lleve a cabo un proceso químico o biológico que implique organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de tales organismos. Los biorreactores pueden ser compatibles con los métodos libres de células para la producción del ARN circular descrito en la presente. Un recipiente para un biorreactor puede incluir un matraz de cultivo, un plato o una bolsa que puede ser de un solo uso (desechable), esterilizable en autoclave o esterilizable. Un biorreactor puede ser de vidrio, de polímero o de otros materiales.

Los ejemplos de biorreactores incluyen, sin limitación, biorreactores de tanque agitado (por ejemplo, bien mezclados) y biorreactores tubulares (por ejemplo, de flujo de tapón), biorreactores airlift, tanques agitados de membrana, tanques agitados con filtro de giro, vibromezcladores, reactores de lecho fluidizado y biorreactores de membrana. El modo de funcionamiento del biorreactor puede ser por lotes o continuo. Un biorreactor es continuo cuando las corrientes de reactivo y producto se alimentan y retiran continuamente del sistema. Un biorreactor por lotes puede tener un flujo de recirculación continuo, pero sin alimentación continua de reactivos o recogida de producto.

Algunos métodos de la presente divulgación están dirigidos a la producción a gran escala de polirribonucleótidos circulares. Para los métodos de producción a gran escala, el método puede realizarse en un volumen de 1 litro (L) a 50 L, o más (por ejemplo, 5 L, 10 L, 15 L, 20 L, 25 L, 30 L, 35 L, 40 L, 45 L, 50 L, o más). En algunas realizaciones, el método puede llevarse a cabo en un volumen de 5 L a 10 L, 5 L a 15 L, 5 L a 20 L, 5 L a 25 L, 5 L a 30 L, 5 L a 35 L, 5 L a 40 L, 5 L a 45 L, 10 L a 15 L, 10 L a 20 L, 10 L a 25 L, 20 L a 30 L, 10 L a 35 L, 10 L a 40 L, 10 L a 45 L, 10 L a 50 L, 15 L a 20 L, 15 L a 25 L, 15 L a 30 L, 15 L a 35 L, 15 L a 40 L, 15 L a 45 L, o 15 a 50 L.

En algunas realizaciones, un biorreactor puede producir por lo menos 1 g de ARN circular. En algunas realizaciones, un biorreactor puede producir 1-200g de ARN circular (por ejemplo, 1-10g, 1-20g, 1-50g, 10-50g, 10-100g, 50-100g, de 50-200g de ARN circular). En algunas realizaciones, la cantidad producida se mide por litro (por ejemplo, 1-200 g por litro), por lote o reacción (por ejemplo, 1-200 g por lote o reacción), o por unidad de tiempo (por ejemplo, 1-200 g por hora o por día).

En algunas realizaciones, puede utilizarse más de un biorreactor en serie para aumentar la capacidad de producción (por ejemplo, pueden utilizarse uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve biorreactores en serie).

Métodos de uso

En algunas realizaciones, los polirribonucleótidos circulares elaborados como se describe en la presente se usan como efectores en terapia o agricultura.

Por ejemplo, un polirribonucleótido circular elaborado mediante los métodos descritos en la presente puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, en una composición farmacéutica, veterinaria o agrícola). En algunas realizaciones, el sujeto es un animal vertebrado (por ejemplo, mamífero, ave, pez, reptil o anfibio). En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano, como un primate no humano (por ejemplo, monos, simios), un ungulado (por ejemplo, vacuno, búfalo, oveja, cabra, cerdo, camello, llama, alpaca, ciervo, caballo, burro), carnívoro (por ejemplo, perro, gato), roedor (por ejemplo, rata, ratón) o lagomorfo (por ejemplo, conejo). En algunas realizaciones, el sujeto es un ave, como un miembro de los taxones aviares Galliformes (por ejemplo, pollos, pavos, faisanes, codornices), Anseriformes (por ejemplo, patos, gansos), Paleaognathae (por ejemplo, avestruces, emúes), Columbiformes (por ejemplo, palomos, palomas) o Psittaciformes (por ejemplo, loros). En algunas realizaciones, el

sujeto es un invertebrado, como un artrópodo (por ejemplo, insectos, arácnidos, crustáceos), un nematodo, un anélido, un helminto o un molusco. En algunas realizaciones, el sujeto es una plaga agrícola invertebrada o un invertebrado parásito de un huésped invertebrado o vertebrado. En algunas realizaciones, el sujeto es una planta, como una planta angiosperma (que puede ser dicotiledónea o monocotiledónea) o una planta gimnosperma (por ejemplo, una conífera, una cicadácea, un gnetófito, un Ginkgo), un helecho, una cola de caballo, un musgo o un briofito. En algunas realizaciones, el sujeto es un alga eucariota (unicelular o pluricelular). En algunas realizaciones, el sujeto es una planta de importancia agrícola u hortícola, como plantas de cultivo en hilera, plantas y árboles frutales, hortalizas, árboles y plantas ornamentales, incluidas flores ornamentales, arbustos, árboles, plantas tapizantes y céspedes.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de modificación de un sujeto proporcionando al sujeto una composición o formulación descrita en la presente. En algunas realizaciones, la composición o formulación es o incluye una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN o una molécula de ARN descrita en la presente), y el polinucleótido se proporciona a un sujeto eucariota. En algunas realizaciones, la composición o formulación es o incluye o una célula eucariota o procariota que incluye un ácido nucleico descrito en la presente.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para tratar una afección en un sujeto con necesidad de ello, proporcionando al sujeto una composición o formulación descrita en la presente. En algunas realizaciones, la composición o formulación es o incluye una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN o una molécula de ARN descrita en la presente), y el polinucleótido se proporciona a un sujeto eucariota. En algunas realizaciones, la composición o formulación es o incluye una célula eucariota o procariota que incluye un ácido nucleico descrito en la presente.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para proporcionar un polirribonucleótido circular a un sujeto proporcionando una célula eucariota o procariota que incluye un polinucleótido descrito en la presente al sujeto.

Formulaciones

En algunas realizaciones de la presente divulgación, un polirribonucleótido circular descrito en la presente puede formularse en una composición, por ejemplo, una composición para su administración a una célula, una planta, un animal invertebrado, un animal vertebrado no humano o un sujeto humano, por ejemplo, una composición agrícola, veterinaria o farmacéutica. En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular se formula en una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, una composición incluye un polirribonucleótido circular y un diluyente, un portador, un adyuvante o una combinación de los mismos. En una realización particular, una composición incluye un polirribonucleótido circular descrito en la presente y un portador o un diluyente libre de cualquier portador. En algunas realizaciones, una composición que incluye un polirribonucleótido circular con un diluyente libre de cualquier portador se usa para la administración desnuda del polirribonucleótido circular a un sujeto.

Sales

En algunos casos, una composición o composición farmacéutica proporcionada en la presente comprende una o más sales. Para controlar la tonicidad, en una composición proporcionada en la presente puede incluirse una sal fisiológica como la sal de sodio. Otras sales pueden comprender cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato de potasio, fosfato disódico, y/o cloruro de magnesio, o similares. En algunos casos, la composición se formula con una o más sales farmacéuticamente aceptables. La una o más sales farmacéuticamente aceptables pueden comprender las de los iones inorgánicos como, por ejemplo, iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, y similares. Tales sales pueden comprender sales con ácidos inorgánicos u orgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido acético, ácido fumárico, ácido succínico, ácido láctico, ácido mandélico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico o ácido maleico. El polirribonucleótido puede estar presente en forma lineal o circular.

Tampones/pH

Una composición o composición farmacéutica proporcionada en la presente puede comprender uno o más tampones, como un tampón Tris; un tampón borato; un tampón succinato; un tampón histidina (por ejemplo, con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones, en algunos casos, se incluyen en el intervalo de 5-20 mM.

Una composición o composición farmacéutica proporcionada en la presente puede tener un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,5, entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, o entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,8. La composición o composición farmacéutica puede tener un pH de aproximadamente 7. El polirribonucleótido puede estar presente o en forma lineal o circular.

Detergentes/surfactantes

Una composición o composición farmacéutica proporcionada en la presente puede comprender uno o más detergentes y/o surfactantes, dependiendo de la vía de administración prevista, por ejemplo, surfactantes de ésteres de sorbitán polioxietilenado (comúnmente denominados "Tweens"), por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO) y/u óxido de butileno (BO), vendidos bajo la marca DOWFAX™, como copolímeros en bloque lineales EO/PO; octoxinoles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-l,2-etanodiil) repetidos, por ejemplo, octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos como la fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, como la serie Tergitol™ NP; éteres grasos de polioxietileno derivados de los alcoholes laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como surfactantes Brij), como el éter monolaurílico de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como "SPAN"), como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán, un octoxinol (como octoxinol-9 (Triton X-100) o t-octilfenoxipolietoxietanol), un bromuro de cetil trimetil amonio ("CTAB"), o desoxicolato sódico. El uno o más detergentes y/o surfactantes pueden estar presentes sólo en cantidades traza. En algunos casos, la composición puede incluir menos de 1 mg/ml de cada uno de octoxinol-10 y polisorbato 80. En la presente pueden usarse surfactantes no iónicos. Los surfactantes pueden clasificarse por su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). En algunos casos, los surfactantes tienen un HLB de por lo menos 10, por lo menos 15 y/o por lo menos 16. El polirribonucleótido puede estar presente en forma lineal o circular.

Diluyentes

En algunas realizaciones, una composición de la divulgación incluye un polirribonucleótido circular y un diluyente. En algunas realizaciones, una composición de la divulgación incluye un polirribonucleótido lineal y un diluyente.

Un diluyente puede ser un excipiente no portador. Un excipiente no portador sirve como vehículo o medio para una composición, como un polirribonucleótido circular como se describe en la presente. Un excipiente no portador sirve como vehículo o medio para una composición, como un polirribonucleótido lineal como se describe en la presente. Ejemplos no limitativos de un excipiente no portador incluyen solventes, solventes acuosos, solventes no acuosos, medios de dispersión, diluyentes, dispersiones, auxiliares de suspensión, agentes surfactantes, agentes isotónicos, agentes espesantes, agentes emulsionantes, conservantes, polímeros, péptidos, proteínas, células, hialuronidasas, agentes dispersantes, agentes granulantes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes tamponantes (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS)), agentes lubricantes, aceites y mezclas de los mismos. Un excipiente no portador puede ser cualquiera de los ingredientes inactivos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y enumerados en la Base de Datos de Ingredientes Inactivos que no presente un efecto de penetración celular. Un excipiente no portador puede ser cualquier ingrediente inactivo adecuado para la administración a un animal no humano, por ejemplo, adecuado para uso veterinario. La modificación de composiciones adecuadas para la administración a humanos para hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a varios animales es bien conocida, y el farmacólogo veterinario con conocimientos normales puede diseñar y/o realizar dicha modificación con una experimentación meramente ordinaria, si la hubiese.

En algunas realizaciones, el polirribonucleótido circular puede administrarse como una formulación de administración desnuda, por ejemplo, que incluya un diluyente. Una formulación de administración desnuda administra un polirribonucleótido circular a una célula sin la ayuda de un portador y sin modificación o encapsulación parcial o completa del polirribonucleótido circular, polirribonucleótido con caperuza o complejo del mismo.

Una formulación de administración desnuda es una formulación que no contiene un portador y en donde el polirribonucleótido circular no tiene una modificación covalente que se une a una fracción que ayuda a la administración a una célula o sin encapsulación parcial o completa del polirribonucleótido circular. En algunas realizaciones, un polirribonucleótido circular sin una modificación covalente que se une a una fracción que ayuda a la administración a una célula es un polirribonucleótido que no está unido covalentemente a una proteína, molécula pequeña, partícula, polímero o biopolímero. Un polirribonucleótido circular sin modificación covalente que se une a una fracción que ayuda a la administración a una célula no contiene un grupo fosfato modificado. Por ejemplo, un polirribonucleótido circular sin una modificación covalente que se une a una fracción que ayuda a la administración a una célula no contiene fosforotioato, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosforodiamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo, o fosfotriesteres.

En algunas realizaciones, una formulación de administración desnuda está libre de alguno o todos de los siguientes: reactivos de transfección, portadores catiónicos, portadores de carbohidratos, portadores de nanopartículas o portadores de proteínas. En algunas realizaciones, una formulación de administración desnuda no contiene ftoglicógeno octenil succinato, fitoglicógeno beta-dextrina, fitoglicógeno beta-dextrina modificado con anhídrido, lipofectamina, polietilenimina, poli(trimetilenimina), poli(tetrametilenimina), polipropilenimina, aminoglucósido-poliamina, dideoxi-diamino-b-ciclodextrina, espermina, espermidina, polimetacrilato de 2-(dimetilamino)etilo, poli(lisina), poli(histidina), poli(arginina), gelatina cationizada, dendrímeros, quitosano, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de

l-[2-(oleooiloxi)etil]-2-oleil-3-(2- hidroxietil)imidazolinio (DOTIM), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminecarboxamido)etil]-N,N-dimetil-l-propanaminio (DOSPA), Clorhidrato de 3B-[N-(N\N'-Dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Colesterol HC1), diheptadecilamidoglicilo espermidina (DOGS), bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DMRIE), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), albúmina sérica humana (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) o globulina.

En ciertas realizaciones, una formulación de administración desnuda incluye un excipiente no portador. En algunas realizaciones, un excipiente no portador incluye un ingrediente inactivo que no presenta un efecto de penetración celular. En algunas realizaciones, un excipiente no portador incluye un tampón, por ejemplo PBS. En algunas realizaciones, un excipiente no portador es un solvente, un solvente no acuoso, un diluyente, un auxiliar de suspensión, un agente surfactante, un agente isotónico, un agente espesante, un agente emulsionante, un conservante, un polímero, un péptido, una proteína, una célula, una hialuronidasa, un agente dispersante, un agente de granulación, un agente disgregador, un agente aglutinante, un agente tampón, un agente lubricante o un aceite.

En algunas realizaciones, una formulación de administración desnuda incluye un diluyente. El diluyente puede ser líquido o sólido. En algunas realizaciones, un diluyente es un agente solubilizante de ARN, un tampón o un agente isotónico. Los ejemplos de un agente solubilizante de ARN incluyen agua, etanol, metanol, acetona, formamida y 2-propanol. Los ejemplos de tampón incluyen el ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), Bis-Tris, ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)-(carboximetil)amino]acético (ADA), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]etanosulfónico (TES), ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), Tris, Tricina, Gly-Gly, Bicina o fosfato. Algunos ejemplos de agentes isotónicos son la glicerina, el manitol, el polietilenglicol, el propilenglicol, la trehalosa o la sacarosa.

Portadores

En algunas realizaciones, una composición de la divulgación incluye un polirribonucleótido circular y un portador. En algunas realizaciones, una composición de la divulgación incluye un polirribonucleótido lineal y un portador.

En ciertas realizaciones, una composición incluye un polirribonucleótido circular como se describe en la presente en una vesícula u otro portador basado en membrana. En ciertas realizaciones, una composición incluye un polirribonucleótido lineal como se describe en la presente en una vesícula u otro portador basado en membrana.

En otras realizaciones, una composición incluye el polirribonucleótido circular en o a través de una célula, vesícula u otro portador basado en membrana. En otras realizaciones, una composición incluye el polirribonucleótido lineal en o a través de una célula, vesícula u otro portador basado en membrana. En una realización, una composición incluye el polirribonucleótido circular en liposomas u otras vesículas similares. En una realización, una composición incluye el polirribonucleótido lineal en liposomas u otras vesículas similares. Los liposomas son estructuras vesiculares esféricas compuestas por una bicapa lipídica uni- o multilaminar que rodea compartimentos acuosos internos y una bicapa fosfolipídica lipófila externa relativamente impermeable. Los liposomas pueden ser aniónicos, neutros o catiónicos. Los liposomas son biocompatibles, no tóxicos, pueden administrar moléculas de fármacos tanto hidrófilas como lipófilas, proteger su carga de la degradación por enzimas plasmáticas y transportar su carga a través de membranas biológicas y de la barrera hematoencefálica (BBB) (véase, por ejemplo, una revisión de Spuch y Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011).

Las vesículas pueden elaborarse a partir de distintos tipos de lípidos; sin embargo, los fosfolípidos son los más usados para generar liposomas como portadores de fármacos. Los métodos para la preparación de lípidos vesiculares multilamelares son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.693.086). Aunque la formación de vesículas puede ser espontánea cuando se mezcla una película lipídica con una solución acuosa, también puede acelerarse aplicando fuerza en forma de agitación usando un homogeneizador, un sonicador o un aparato de extrusión (véase, por ejemplo, Spuch y Navarro, Journal of Drug Delivery, vol. 2011, Identificación del artículo 469679, 12 páginas, 2011. doi:10.1155/2011/469679 para su revisión). Los lípidos extruidos pueden prepararse extruyendo a través de filtros de tamaño decreciente, como se describe en Templeton et al., Nature Biotech, 15:647-652, 1997.

En ciertas realizaciones, una composición de la divulgación incluye un polirribonucleótido circular y nanopartículas lipídicas, por ejemplo nanopartículas lipídicas descritas en la presente. En ciertas realizaciones, una composición de la divulgación incluye un polirribonucleótido lineal y nanopartículas lipídicas. Las nanopartículas lipídicas son otro ejemplo de portador que proporciona un sistema de administración biocompatible y biodegradable para una molécula de polirribonucleótido circular como se describe en la presente. Las nanopartículas lipídicas son otro ejemplo de portador que proporciona un sistema de administración biocompatible y biodegradable para una molécula de polirribonucleótido lineal como se describe en la presente. Los portadores lipídicos nanoestructurados (NLC) son nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) modificadas que conservan las características de la SLN, mejoran la

estabilidad del fármaco y la capacidad de carga, y evitan la fuga del fármaco. Las nanopartículas poliméricas (PNP) son un componente importante de la administración de fármacos. Estas nanopartículas pueden dirigir eficazmente la administración de fármacos a dianas específicas y mejorar la estabilidad y la liberación controlada de fármacos. También pueden emplearse nanopartículas lipídico-poliméricas (PLN), un nuevo tipo de portador que combina liposomas y polímeros. Estas nanopartículas poseen las ventajas complementarias de las PNP y los liposomas. Una PLN se compone de una estructura de núcleo-cubierta; el núcleo de polímero proporciona una estructura estable, y la cubierta de fosfolípido ofrece una buena biocompatibilidad. Como tales, los dos componentes aumentan la tasa de eficacia de la encapsulación del fármaco, facilitan la modificación de la superficie y evitan la fuga de fármacos solubles en agua. Para una revisión, véase, por ejemplo, Li et al. 2017, Nanomaterials 7, 122; doi:10.3390/nano7060122.

Ejemplos adicionales no limitativos de portadores son los portadores de carbohidratos (por ejemplo, un fitoglicógeno modificado con anhídrido o un material de tipo glucógeno), los portadores de proteínas (por ejemplo, una proteína enlazada covalentemente al polirribonucleótido circular o una proteína enlazada covalentemente al polirribonucleótido lineal) o los portadores catiónicos (por ejemplo, un lipopolímero catiónico o un reactivo de transfección). Los ejemplos no limitativos de portadores carbohidratos incluyen el octenil succinato de ftoglicógeno, la beta-dextrina de fitoglicógeno y la beta-dextrina de fitoglicógeno modificada con anhídrido. Los ejemplos no limitativos de portadores catiónicos incluyen lipofectamina, polietilenimina, poli(trimetilenimina), poli(tetrametilenimina), polipropilenimina, aminoglucósido-poliamina, dideoxi-diamino-b-ciclodextrina, espermina, espermidina, polimetacrilato de 2-(dimetilamino)etilo, poli(lisina), poli(histidina), poli(arginina), gelatina cationizada, dendrímeros, quitosano, I,2-Dioleoil-3- Trimetilamonio-Propano(DOTAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propyl]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), cloruro de I-[2-(oleooiloxi)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxietil)imidazolinio (DOTIM), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminecarboxamido)etil]-N,N-dimetil-I-propanaminio (DOSPA), clorhidrato de 3B-[N-(N\N'-Dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-Colesterol HC1), diheptadecilamidoglil espermidina (DOGS), bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), bromuro de N-(I,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil amonio (DMRIE) y cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC). Ejemplos no limitativos de portadores proteicos son la albúmina sérica humana (HSA), la lipoproteína de baja densidad (LDL), la lipoproteína de alta densidad (HDL) o la globulina.

Como vehículos de administración de fármacos para una composición o preparación de ARN circular descrita en la presente también pueden usarse exosomas. Los exosomas pueden usarse como vehículos de administración de fármacos para una composición o preparación de polirribonucleótidos lineales descrita en la presente. Para una revisión, véase Ha et al. Julio de 2016. Acta Pharmaceutica.

Como portador de una composición o preparación de ARN circular descrita en la presente también pueden usarse los glóbulos rojos diferenciados ex vivo. Los glóbulos rojos diferenciados ex vivo también pueden usarse como portadores de una composición o preparación de polirribonucleótidos lineales descrita en la presente. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente Internacional Nº WO2015/073587; WO2017/123646; WO2017/123644; WO2018/102740; WO2016/183482; WO2015/153102; WO2018/151829; WO2018/009838; Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136; Patente de Estados Unidos 9.644.180; Huang et al. 2017. Nature Communications 8: 423; Shi et al. 2014. Proc Natl Acad Sci USA. 111(28): 10131-10136.

Como portadores para administrar una molécula de polirribonucleótido circular descrita en la presente también pueden usarse las composiciones fusosómicas, por ejemplo, como se describe en la Publicación de Patente Internacional Nº WO2018/208728. Como portadores para administrar una molécula de polirribonucleótido lineal descrita en la presente también pueden usarse las composiciones fusosómicas, por ejemplo, como se describe en la WO2018/208728,.

Como portadores para administrar a las células diana una molécula de polirribonucleótidos circular descrita en la presente también pueden usarse los virosomas y las partículas similares a virus (VLP). Los virosomas y las partículas similares a virus (VLP) también pueden usarse como portadores para administrar a las células diana una molécula de polirribonucleótido lineal descrita en la presente.

Como portadores para administrar la composición o preparación de ARN circular descrita en la presente también pueden usarse las nanovesículas vegetales y los paquetes mensajeros vegetales (PMP), por ejemplo, como se describen en las Publicaciones de Patente Internacional Nº WO2011/097480, WO2013/070324, WO2017/004526, o WO2020/041784. Las nanovesículas vegetales y los paquetes mensajeros vegetales (PMP) también pueden usarse como portadores para administrar una composición o preparación de polirribonucleótidos lineales descrita en la presente.

Como portadores para administrar una molécula de polirribonucleótido circular descrita en la presente también pueden usarse las microburbujas. Las microburbujas también pueden usarse como portadores para administrar una molécula de polirribonucleótido lineal descrita en la presente. Véase, por ejemplo, US7115583; Beeri, R. et al., Circulation. 2002; Bez, M. et al., Nat Protoc. abril de 2019; 14(4): 1015-1026; Hernot, S. et al., Adv Drug Deliv Rev. 2008; Rychak, J.J. et al., Adv Drug Deliv Rev. junio de 2014; 72: 82-93. En algunas realizaciones, las microburbujas son microburbujas de perfluorocarbono recubiertas de albúmina.

El portador que incluye los polirribonucleótidos circulares descritos en la presente puede incluir una pluralidad de partículas. Las partículas pueden tener un tamaño mediano de artículo de 30 a 700 nanómetros (por ejemplo, de 30 a 50, de 50 a 100, de 100 a 200, de 200 a 300, de 300 a 400, de 400 a 500, de 500 a 600, de 600 a 700, de 100 a 500, de 50 a 500, o de 200 a 700 nanómetros). El tamaño de la partícula puede optimizarse para favorecer el depósito de la carga útil, incluido el polirribonucleótido circular, en una célula. El depósito del polirribonucleótido circular en ciertos tipos de células puede favorecer diferentes tamaños de partícula. Por ejemplo, el tamaño de la partícula puede optimizarse para el depósito del polirribonucleótido circular en células presentadoras de antígeno. El tamaño de partícula puede optimizarse para el depósito del polirribonucleótido circular en células dendríticas. Además, el tamaño de las partículas puede optimizarse para depositar el polirribonucleótido circular en las células de los ganglios linfáticos de drenaje.

Nanopartículas lipídicas

Las composiciones, métodos y sistemas de administración proporcionados por la presente divulgación pueden emplear cualquier portador o modalidad de administración adecuados descritos en la presente, incluyendo, en ciertas realizaciones, nanopartículas lipídicas (LNP). Las nanopartículas lipídicas, en algunas realizaciones, comprenden uno o más lípidos iónicos, como lípidos no catiónicos (por ejemplo, lípidos neutros o aniónicos, o zwitteriónicos); uno o más lípidos conjugados (como los lípidos conjugados con PEG o los lípidos conjugados con polímeros descritos en la Tabla 5 de la WO2019217941); uno o más esteroles (por ejemplo, colesterol).

Los lípidos que pueden usarse en formaciones de nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) incluyen, por ejemplo, los descritos en la Tabla 4 de la WO2019217941 -por ejemplo, una nanopartícula que contiene lípidos puede comprender uno o más de los lípidos de la Tabla 4 de la WO2019217941. Las nanopartículas lipídicas pueden incluir elementos adicionales, como polímeros, como los polímeros descritos en la Tabla 5 de la WO2019217941.

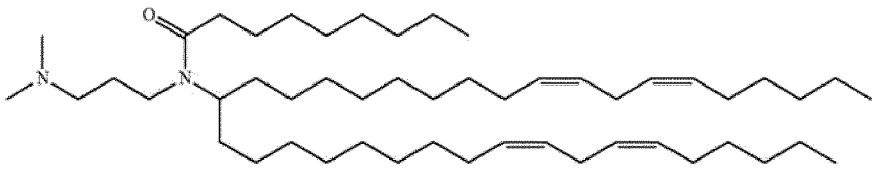
En algunas realizaciones, los lípidos conjugados, cuando los hay, pueden incluir uno o más de PEG-diacilglicerol (DAG) (como l-(monometoxi-polietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol (PEG-DMG)), PEG-dialquiloxipropilo (DAA), PEG-fosfolípido, PEG-ceramida (Cer), una fosfatidiletanoloamina pegilada (PEG-PE), PEG succinato de diacilglicerol (PEGS-DAG) (como 4-0-(2',3'-di(tetradecanoiloxi)propil-l-0-(w-metoxi(polietoxi)etil)butanodioato (PEG-S-DMG)), PEG dialcoxipropilcarbam, sal sódica de N-(carbonil-metoxi-poli etilenglicol 2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, y los descritos en la Tabla 2 de la WO2019051289, y combinaciones de los anteriores.

En algunas realizaciones, los esteroles que pueden incorporarse en nanopartículas lipídicas incluyen uno o más de colesterol o derivados del colesterol, como los de la WO2009/127060 o la US2010/0130588. Esteroles adicionales ejemplares incluyen los fitoesteroles, incluyendo los descritos en Eygeris et al. (2020), dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386.

En algunas realizaciones, la partícula lipídica comprende un lípido ionizable, un lípido no catiónico, un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas y un esterol. Las cantidades de estos componentes pueden variarse independientemente y para lograr las propiedades deseadas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la nanopartícula lipídica comprende un lípido ionizable en una cantidad de aproximadamente el 20% molar a aproximadamente el 90% molar de los lípidos totales (en otras realizaciones puede ser del 20-70% (molar), 30-60% (molar) o 40-50% (molar); de aproximadamente el 50% molar a aproximadamente el 90% molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica), un lípido no catiónico en una cantidad de aproximadamente el 5% molar a aproximadamente el 30% molar del total de lípidos, un lípido conjugado en una cantidad de aproximadamente el 0,5% molar a aproximadamente el 20% molar del total de lípidos, y un esterol en una cantidad de aproximadamente el 20% molar a aproximadamente el 50% molar de los lípidos totales. La proporción entre lípidos totales y ácido nucleico puede variar según se desee. Por ejemplo, la proporción lípido total/ácido nucleico (masa o peso) puede ser de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 30:1.

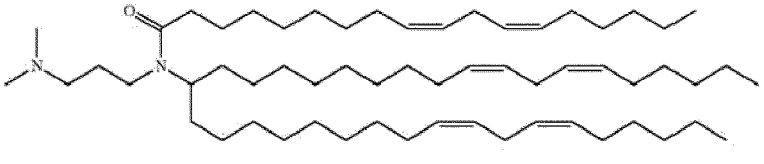
En algunas realizaciones, la proporción lípido/ácido nucleico (proporción masa/masa; proporción p/p) puede estar en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 25:1, de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 14:1, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 9:1, o de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1. Las cantidades de lípidos y ácido nucleico pueden ajustarse para proporcionar la proporción N/P deseada, por ejemplo, proporción N/P de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o superior. En general, el contenido total de lípidos de la formulación de nanopartículas lipídicas puede variar de aproximadamente 5 mg/ml ya aproximadamente 30 mg/ml.

Algunos ejemplos no limitativos de compuestos lipídicos que pueden usarse (por ejemplo, en combinación con otros componentes lipídicos) para formar nanopartículas lipídicas para la administración de las composiciones descritas en la presente, por ejemplo, ácido nucleico (por ejemplo, ARN (por ejemplo, polirribonucleótido circular, polirribonucleótido lineal)) descritas en la presente incluyen,



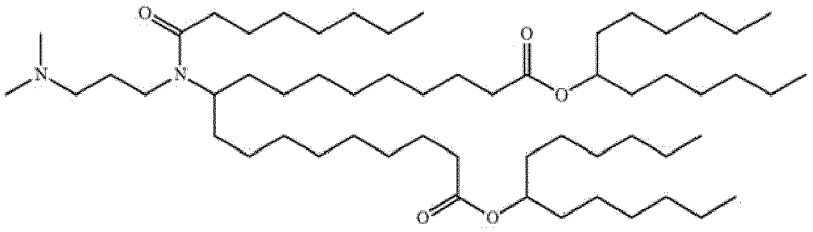
(i)

En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (i).



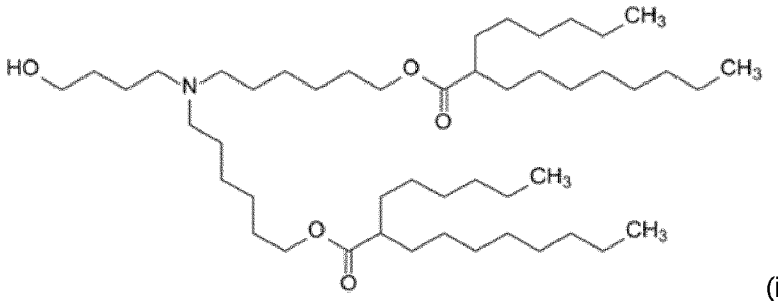
(ii)

En algunas realizaciones, ara administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (ii) p.

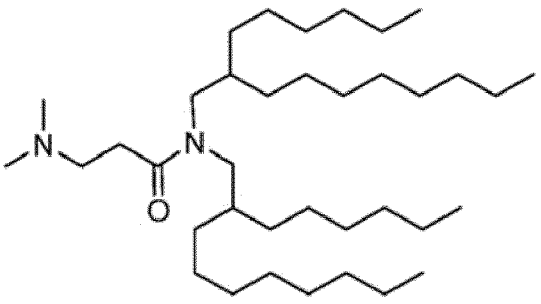


(iii)

En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (iii).

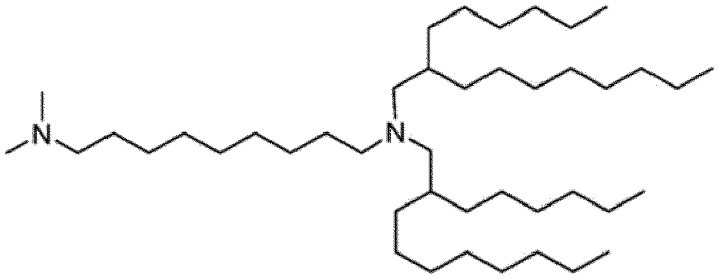


(iv)



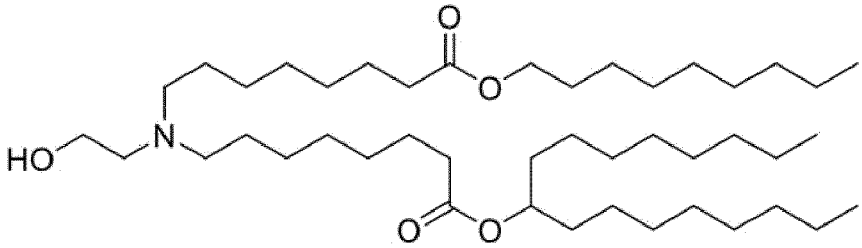
(v)

En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende Fórmula (v).

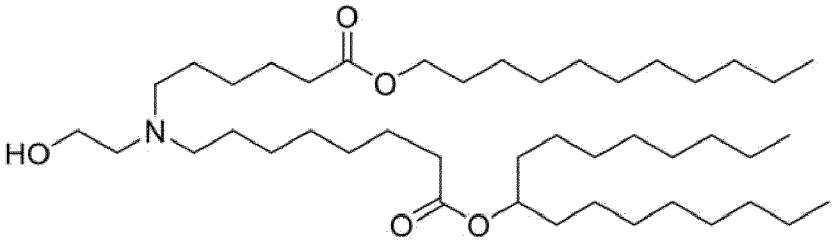


(vi)

En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (vi).

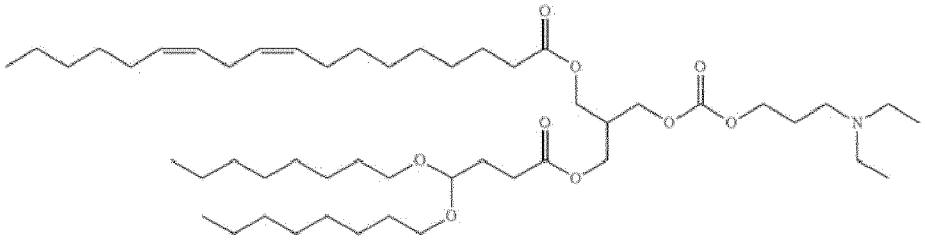


(vii)



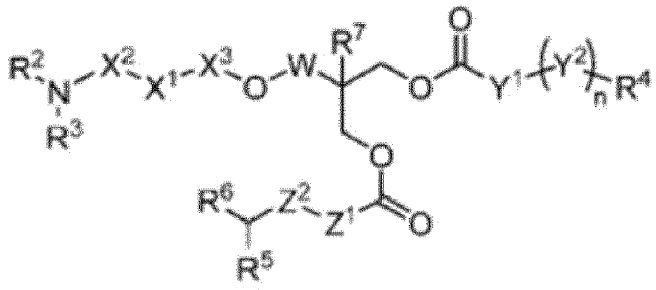
(viii)

En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (viii).



(ix)

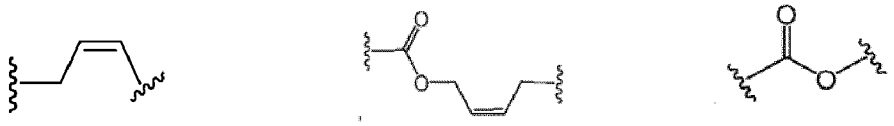
En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (ix).



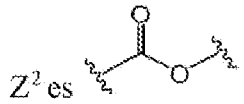
(x)

en donde

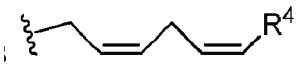
X^1 es O, NR^1, o un enlace directo, X_2 es alquileno C2-5, X_3 es C(=O) o un enlace directo, R^1 es H o Me, R^3 es alquilo C1-3, R^2 es alquilo C1-3, o R^2 junto con el átomo de nitrógeno al que está unido y 1-3 átomos de carbono de X^2 forman un anillo de 4, 5 o 6 miembros, o X^1 es NR^1, R^1 y R^2 junto con los átomos de nitrógeno a los que están unidos forman un anillo de 5 o 6 miembros, o R^2 junto con R^3 y el átomo de nitrógeno al que están unidos forman un anillo de 5, 6 o 7 miembros, Y^1 es alquileno C2-12, Y^2 se selecciona entre



(en cualquier orientación), (en cualquier orientación), (en cualquier orientación),
n es de 0 a 3, R^4 es alquilo C1-15, Z^1 es alquileno C1-6 o un enlace directo,

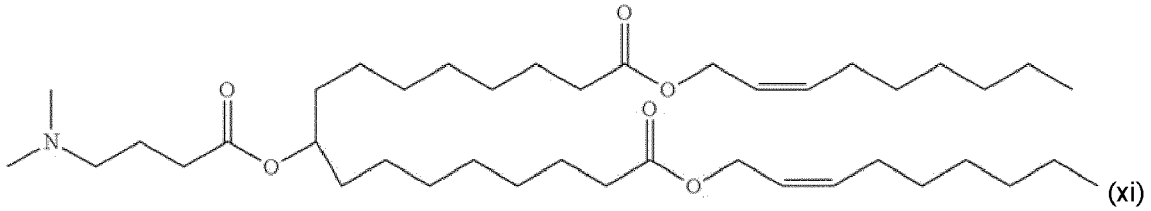


(en cualquier orientación) o está ausente, siempre que si Z^1 es un enlace directo, Z^2 esté ausente;
R^5 es alquilo C5-9 o alcoxi C6-10, R^6 es alquilo C5-9 o alcoxi C6-10, W es metileno o un enlace directo, y
R^7 es H o Me, o una sal de los mismos, siempre que si R^3 y R^2 son alquilos C2, X^1 sea O, X^2 sea alquileno lineal C3,
X_3 es C(=0), Y^1 es alquileno Ce lineal, $(Y^2)n\text{-}R^4$ es



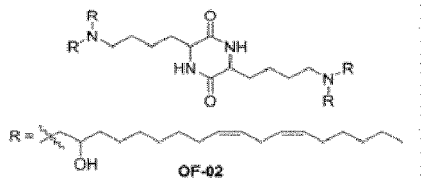
, R^4 es alquilo lineal C5, Z^1 es alquileno C2, Z^2 está ausente, W es metileno y R^7 es H, entonces R^5 y R^6 no son alcoxi Cx.

En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (xii).



(xi)

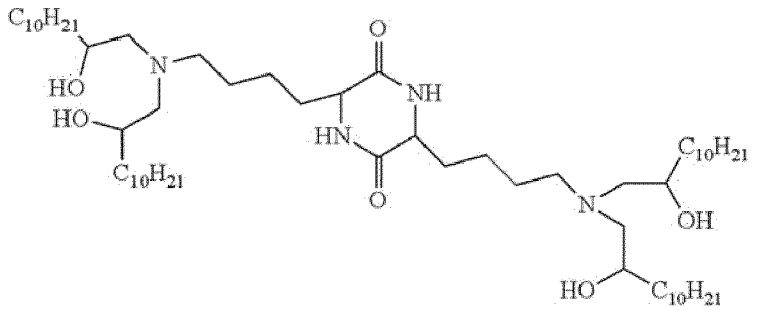
En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (xi).



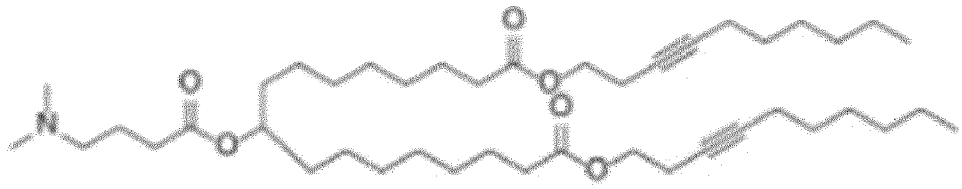
donde R=



(xii)

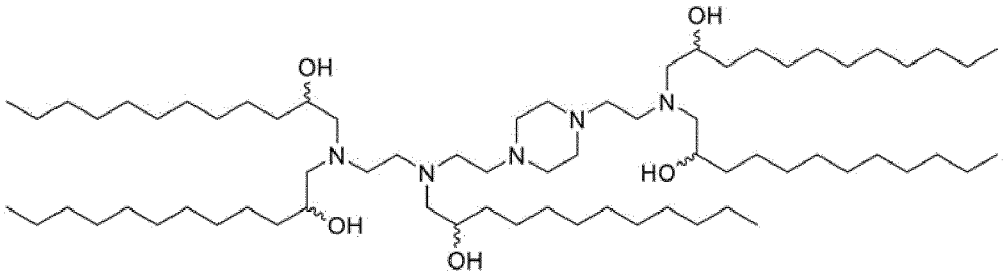


(xiii)



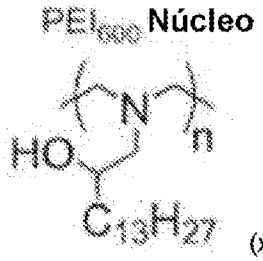
(xiv)

En algunas realizaciones, una LNP comprende un compuesto de Fórmula (xiii) y un compuesto de Fórmula (xiv).



(xv)

En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (xv).

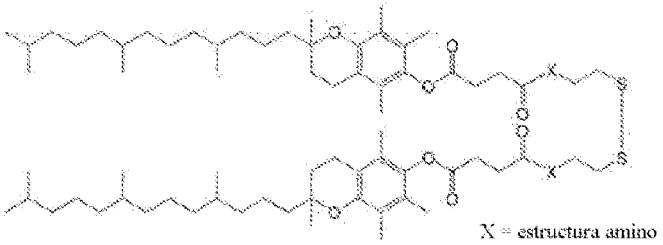


(xvi)

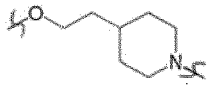
En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende una formulación de Fórmula (xvi).



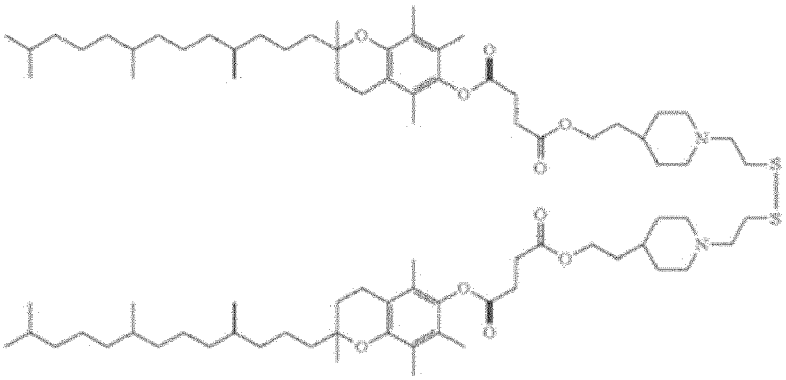
(xvii)



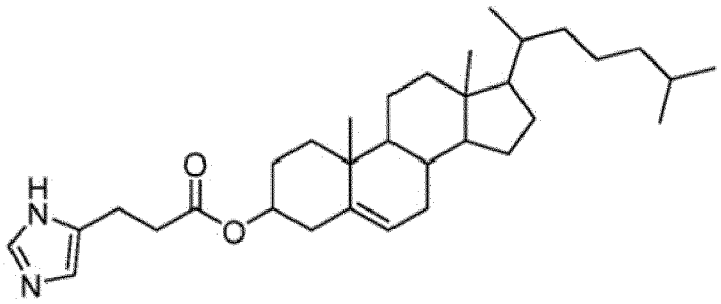
donde X=



(xviii)(a)



(xviii)(b)

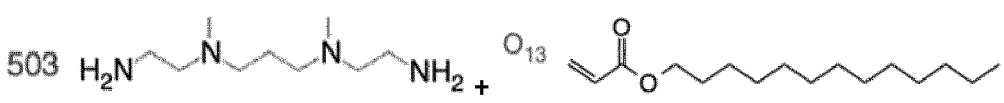


(xix)

En algunas realizaciones, un compuesto lipídico usado para formar nanopartículas lipídicas para la administración de composiciones descritas en la presente, por ejemplo, ácido nucleico (por ejemplo, ARN (por ejemplo, polirribonucleótido circular, polirribonucleótido lineal)) descrito en la presente se realiza mediante una de las siguientes reacciones:

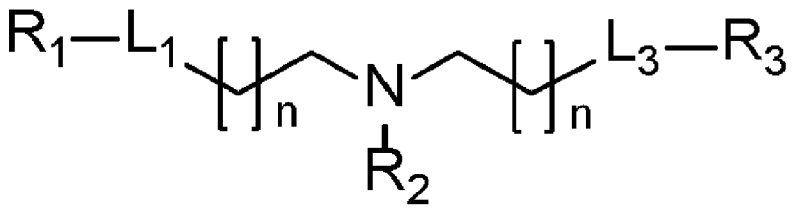


(xx)(a)



(xx)(b).

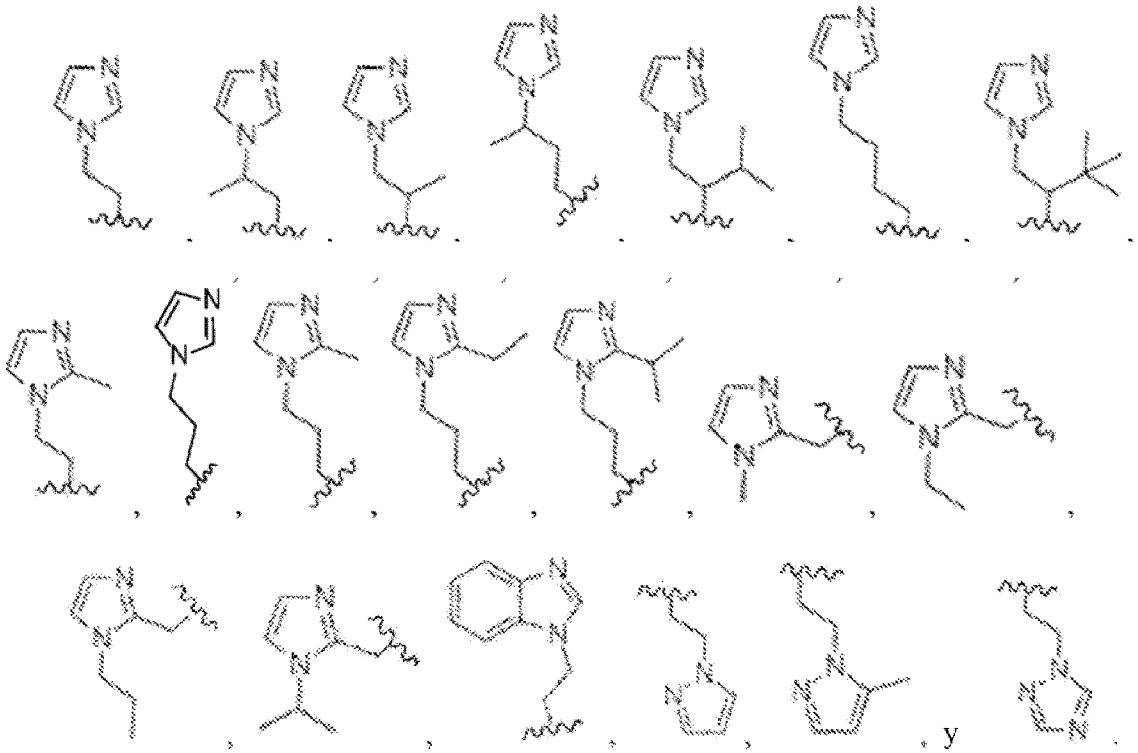
En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (xxi). En algunas realizaciones, la LNP de Fórmula (xxi) es una LNP descrita por la WO2021113777 (por ejemplo, un lípido de Fórmula (1) como un lípido de la Tabla 1 de la WO2021113777).



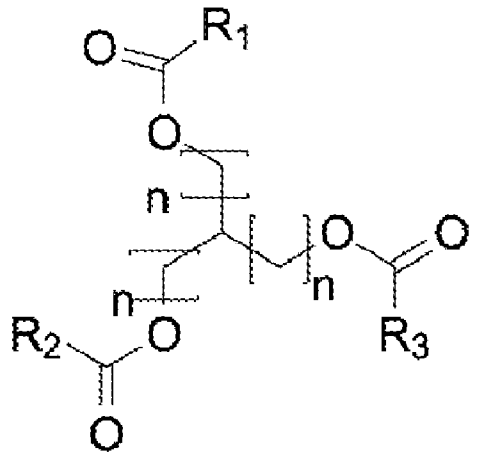
(xxi)

en donde

cada n es independientemente un número entero comprendido entre 2-15; L_1 y L_3 son cada uno independientemente -OC(O)-* o - C(O)O-*, en donde "*" indica el punto de unión a R_1 o R_3;
R^1 y R^3 son cada uno independientemente un alquenilo C_9-C_{20} o un alquilo C_9-C_{20} lineal o ramificado, opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo que consiste en oxo, halo, hidroxi, ciano, alquilo, alquenilo, aldehído, heterocicloalquilo, hidroxialquilo, dihidroxialquilo, hidroxialquilaminoalquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, (heterociclilo)(alquilo)aminoalquilo, heterociclilo, heteroarilo, alquilheteroarilo, alquinilo, alcoxi, amino, dialquilamino, aminoalquilcarbonilamino, aminocarbonilalquilamino, (aminocarbonilalquil)(alquil)amino, alquenilcarbonilamino, hidroxicarbonilo, alquiloxicarbonilo, aminocarbonilo, aminoalquilaminocarbonilo, alquilaminoalquilaminocarbonilo, dialquilaminoalquilaminocarbonilo, heterociclilalquilaminocarbonilo, (alquilaminoalquil)(alquil)aminocarbonilo, alquilaminoalquilcarbonilo, dialquilaminoalquilcarbonilo, heterociclilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alquinilcarbonilo, alquilsulfóxido, alquilsulfoxidoalquilo, alquilsulfonil y alquilsulfonilalquilo; y
R_2 se selecciona del grupo que consiste en:



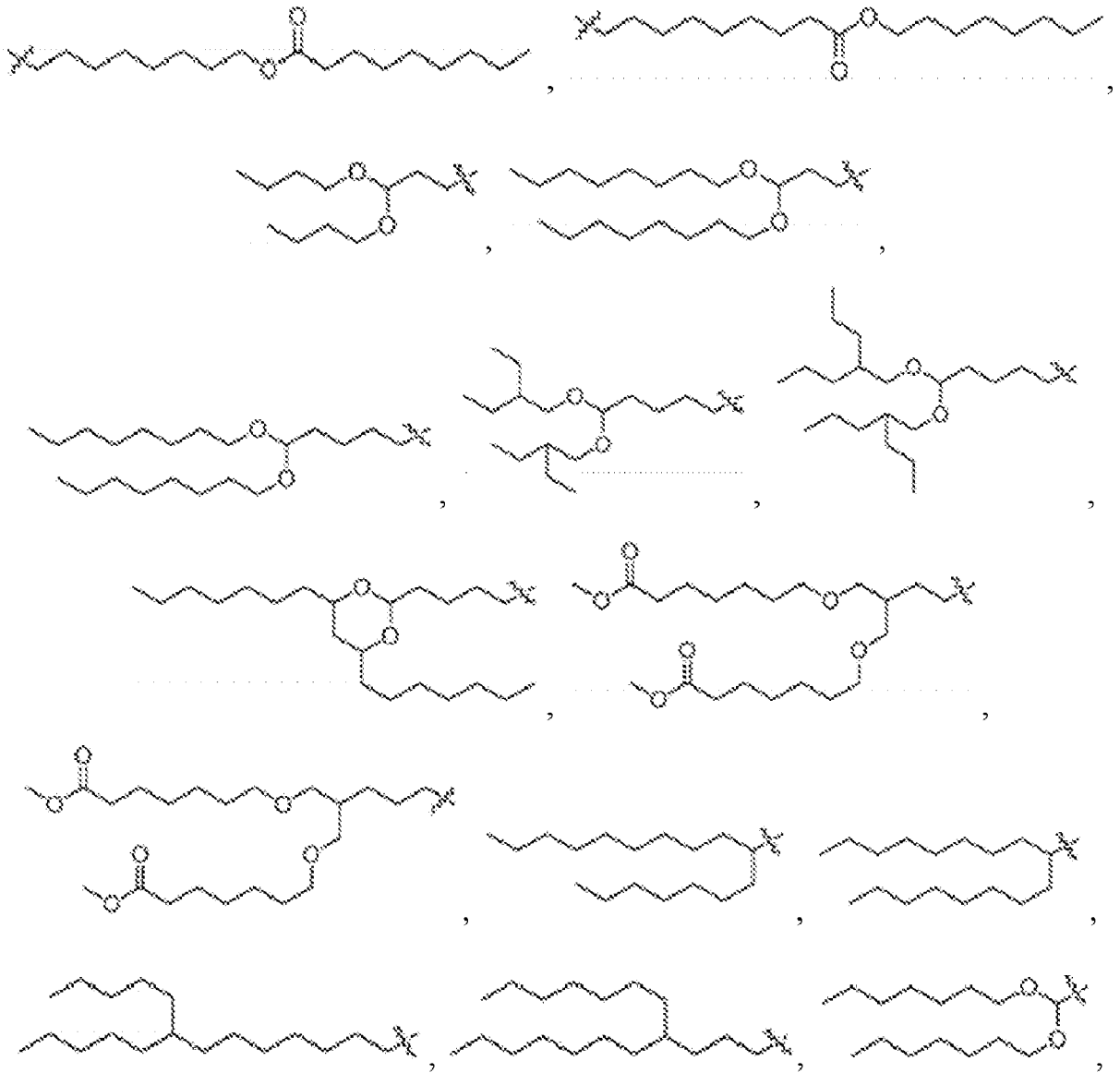
En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (xxii). En algunas realizaciones, la LNP de Fórmula (xxii) es una LNP descrita por la WO2021113777 (por ejemplo, un lípido de Fórmula (2) como un lípido de la Tabla 2 de la WO2021113777).

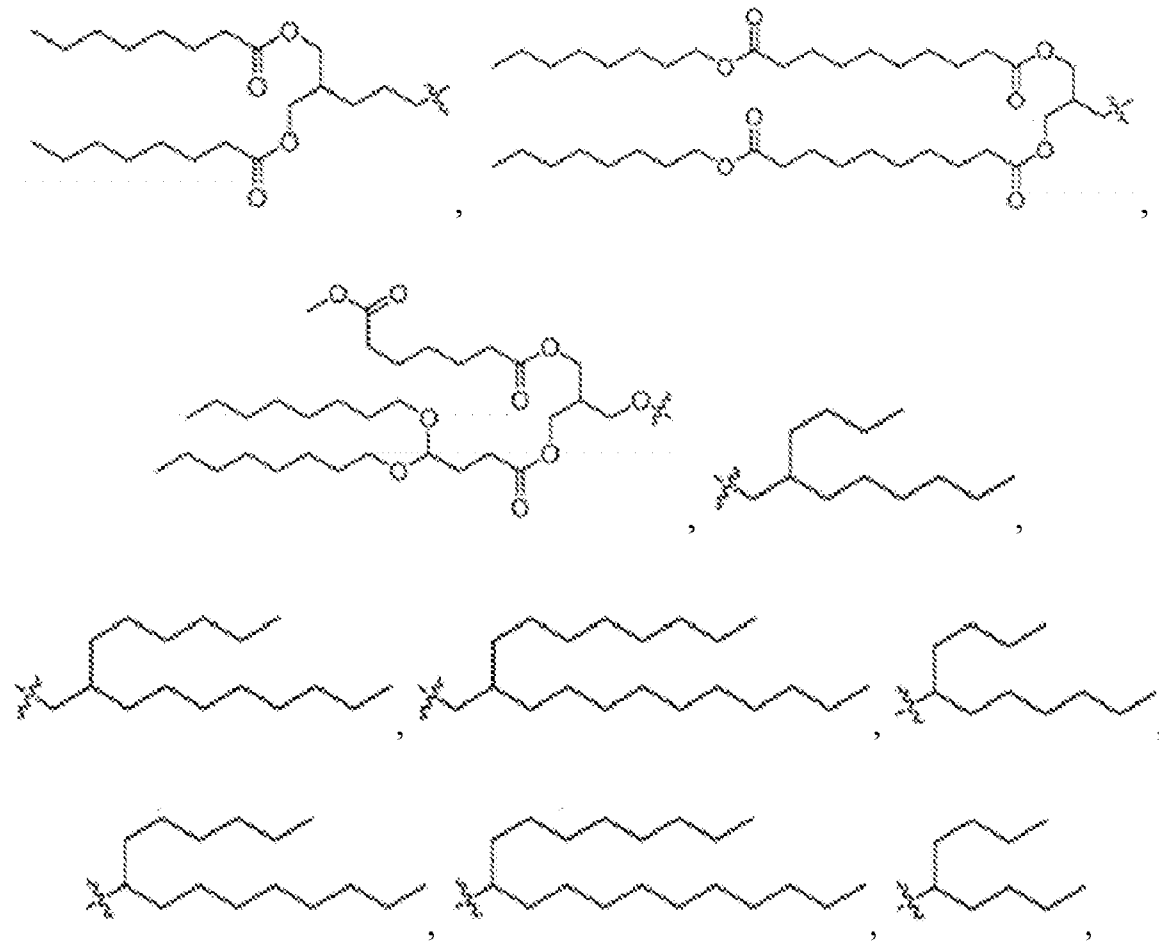


(xxii)

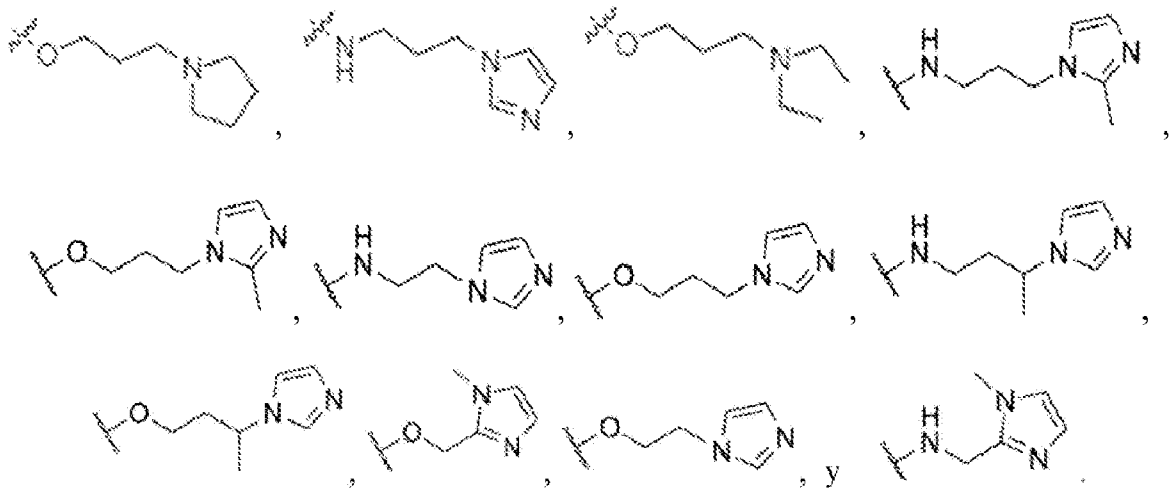
en donde

cada n es independientemente un número entero de 1-15;
R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente de un grupo que consiste en:

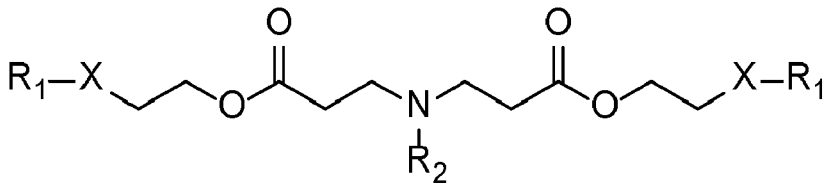




R_3 se selecciona del grupo que consiste en:



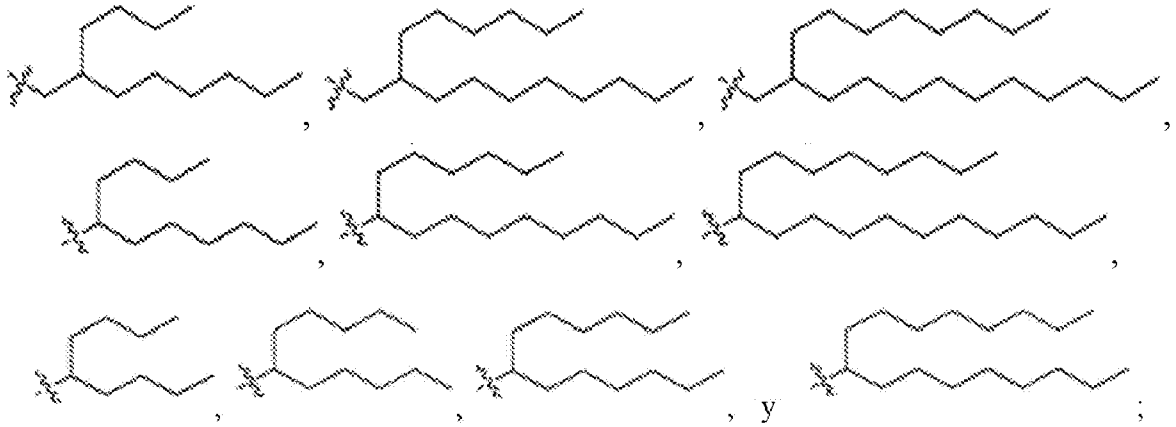
En algunas realizaciones, para administrar a las células una composición de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) descrita en la presente se usa una LNP que comprende la Fórmula (xxiii). En algunas realizaciones, la LNP de Fórmula (xxiii) es una LNP descrita por la WO2021113777 (por ejemplo, un lípido de Fórmula (3) como un lípido de la Tabla 3 de la WO2021113777).



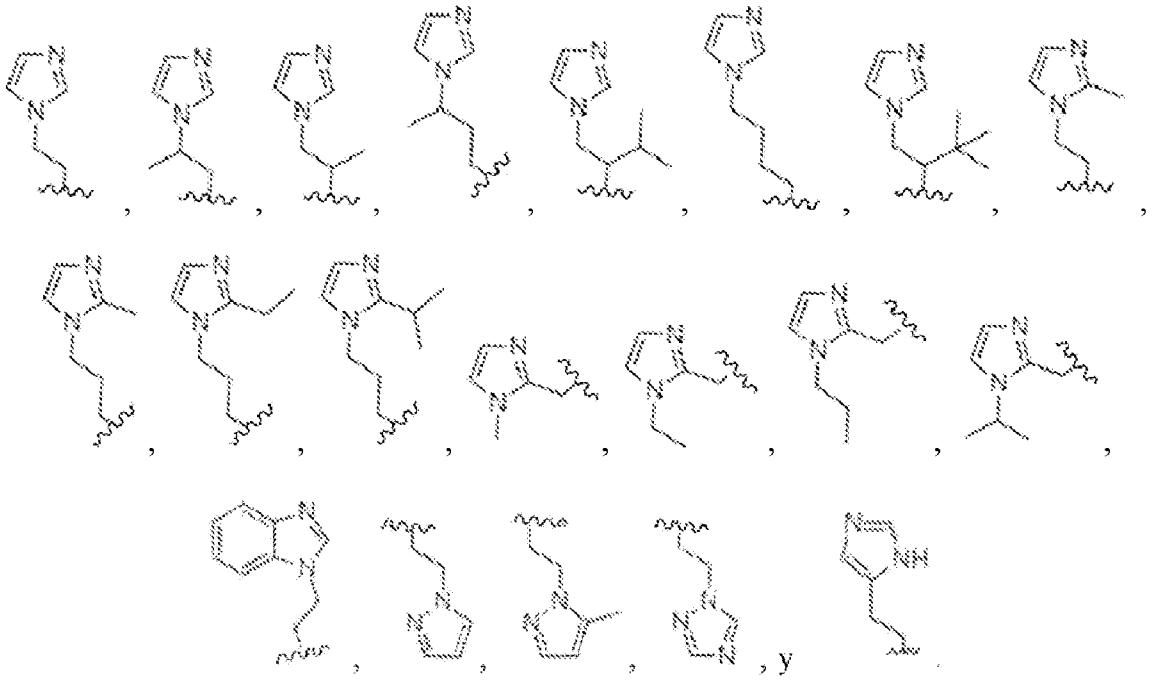
(xxiii)

en donde

X se selecciona entre -O-, -S-, o -OC(O)-*, en donde * indica el punto de unión a R_1;
R_1 se selecciona del grupo que consiste en:



y R_2 se selecciona del grupo que consiste en:



En algunas realizaciones, una composición descrita en la presente (por ejemplo, un ácido nucleico (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) o una proteína) se proporciona en una LNP que comprende un lípido ionizable. En algunas realizaciones, el lípido ionizable es heptadecan-9-il 8-((2-hidroxietil)(6-oxo-6-(undeciloxi)hexil)amino)octanoato (SM-102); por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1 de la US9,867,888. En algunas realizaciones, el lípido ionizable es 9Z,12Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,12-dienoato (LP01), por ejemplo, como se sintetiza en el Ejemplo 13 de la WO2015/095340. En algunas realizaciones, el lípido ionizable es Di((Z)-non-2-en-1-il) 9-((4-dimetilamino)butanoil)oxi)heptadecanedioato (L319), por ejemplo, como se sintetizó en el Ejemplo 7, 8 o 9 de la US2012/0027803. En algunas realizaciones, el lípido ionizable es 1,1'-((2-(4-(2-((2-(Bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-

hidroxidodecil) amino)etil)piperazin-1-il)etil)azanediil)bis(dodecan-2-ol) (C12-200), por ejemplo, como se sintetiza en los Ejemplos 14 y 16 de la WO2010/053572. En algunas realizaciones, el lípido ionizable es el lípido éster de colesterol de imidazol (ICE) (3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-dimetil-17- ((R)-6-metilheptano-2-il)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradecahidro-lH-ciclopenta[a]fenantren-3-il 3-(1H-imidazol-4-il)propanoato, por ejemplo, la Estructura (I) de la WO2020/106946.

En algunas realizaciones, un lípido ionizable puede ser un lípido catiónico, un lípido catiónico ionizable, por ejemplo, un lípido catiónico que puede existir en una forma cargada positivamente o neutra dependiendo del pH, o un lípido que contiene amina que puede protonarse fácilmente. En algunas realizaciones, el lípido catiónico es un lípido capaz de estar cargado positivamente, por ejemplo, en condiciones fisiológicas. Los lípidos catiónicos ejemplares incluyen uno o más grupos aminas que lleven carga positiva. En algunas realizaciones, la partícula lipídica comprende un lípido catiónico en formulación con uno o más de los lípidos neutros, lípidos ionizables que contienen amina, lípidos alquino biodegradables, esteroides, fosfolípidos incluyendo lípidos poliinsaturados, lípidos estructurales (por ejemplo, esteroles), PEG, colesterol y lípidos conjugados con polímeros. En algunas realizaciones, el lípido catiónico puede ser un lípido catiónico ionizable. Un lípido catiónico ejemplar como se describe en la presente puede tener un pKa efectivo superior a 6,0. En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica puede comprender un segundo lípido catiónico que tenga un pKa efectivo diferente (por ejemplo, mayor que el primer pKa efectivo) que el primer lípido catiónico. Una nanopartícula lipídica puede comprender entre el 40 y el 60 por ciento en moles de un lípido catiónico, un lípido neutro, un esteroide, un lípido conjugado con polímero, y un agente terapéutico, por ejemplo, un ácido nucleico (por ejemplo, ARN (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal)) descrito en la presente, encapsulado dentro o asociado con la nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, el ácido nucleico está coformulado con el lípido catiónico. El ácido nucleico puede adsorberse a la superficie de una LNP, por ejemplo, una LNP que comprende un lípido catiónico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede estar encapsulado en una LNP, por ejemplo, una LNP que comprende un lípido catiónico. En algunas realizaciones, la nanopartícula lipídica puede comprender una fracción diana, por ejemplo, recubierta con un agente diana. En algunas realizaciones, la formulación de la LNP es biodegradable. En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos descritos en la presente, por ejemplo, Fórmula (i), (ii), (ii), (vii) y/o (ix) encapsula por lo menos el 1%, por lo menos el 5%, por lo menos el 10%, por lo menos el 20%, por lo menos el 30%, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70%, por lo menos el 80%, por lo menos el 90%, por lo menos el 92%, por lo menos el 95%, por lo menos el 97%, por lo menos el 98% o el 100% de una molécula de ARN.

Los lípidos ionizables ejemplares que pueden usarse en formulaciones de nanopartículas lipídicas incluyen, sin limitación, los enumerados en la Tabla 1 del documento WO2019051289. Lípidos ejemplares adicionales incluyen, sin limitación, una o más de las siguientes fórmulas: X del documento US2016/0311759; I del documento US20150376115 o in US2016/0376224; I, II o III del documento US20160151284; I, IA, II, o IIA del documento US20170210967; I-c del documento US20150140070; A del documento US2013/0178541; I del documento US2013/0303587 o US2013/0123338; I del documento US2015/0141678; II, III, IV, o V del documento US2015/0239926; I del documento US2017/0119904; I o II del documento WO2017/117528; A del documento US2012/0149894; A del documento US2015/0057373; A del documento WO2013/116126; A del documento US2013/0090372; A del documento US2013/0274523; A del documento US2013/0274504; A del documento US2013/0053572; A del documento WO2013/016058; A del documento WO2012/162210; I del documento US2008/042973; I, II, III, o IV del documento US2012/01287670; I o II del documento US2014/0200257; I, II, o III del documento US2015/0203446; I o III del documento US2015/0005363; I, IA, IB, IC, ID, II, IIA, IIB, IIC, IID, o III-XXIV del documento US2014/0308304; del documento US2013/0338210; I, II, III, o IV del documento WO2009/132131; A del documento US2012/01011478; I o XXXV del documento US2012/0027796; XIV o XVII del documento US2012/0058144; del documento US2013/0323269; I del documento US2011/0117125; I, II, o III del documento US2011/0256175; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII del documento US2012/0202871; I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XV, o XVI del documento US2011/0076335; I o II del documento US2006/008378; I del documento US2013/0123338; I o X-A-Y-Z del documento US2015/0064242; XVI, XVII, o XVIII del documento US2013/0022649; I, II, o III del documento US2013/0116307; I, II, o III del documento US2013/0116307; I o II del documento US2010/0062967; I-X del documento US2013/0189351; I del documento US2014/0039032; V del documento US2018/0028664; I del documento US2016/0317458; I del documento US2013/0195920; 5, 6, o 10 del documento US10,221,127; III-3 del documento WO2018/081480; I-5 o I-8 del documento WO2020/081938; 18 o 25 del documento US9,867,888; A del documento US2019/0136231; II del documento WO2020/219876; 1 del documento US2012/0027803; OF-02 del documento US2019/0240349; 23 del documento US10,086,013; cKK-E12/A6 de Miao et al (2020); C12-200 del documento WO2010/053572; 7C1 de Dahlman et al (2017); 304-013 o 503-013 del documento Whitehead et al; TS-P4C2 del documento US9,708,628; I del documento WO2020/106946; I del documento WO2020/106946; and (1), (2), (3), o (4) del documento WO2021/113777.
Los lípidos ejemplares incluyen además un lípido de cualquiera de las Tablas 1-16 del documento WO2021/113777.

En algunas realizaciones, el lípido ionizable es MC3 (6Z,9Z,28Z,3 IZ)-heptatriaconta- 6,9,28,3 l-tetraen-l9-il-4-(dimetilamino) butanoato (DLin-MC3-DMA o MC3), por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 9 del documento WO2019051289A9. En algunas realizaciones, el lípido ionizable es el lípido ATX-002, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 10 del documento WO2019051289A9. En algunas realizaciones, el lípido ionizable es (I3Z,I6Z)-A,A-dimetil-3-nonildocosa-I3,I6-dien-I-amina (Compuesto 32), por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 11 del

documento WO2019051289A9. En algunas realizaciones, el lípido ionizable es el Compuesto 6 o el Compuesto 22, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 12 del documento WO2019051289A9.

Los lípidos no catiónicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, distearoil-sn-glicero-fosfoetanolamina, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoilooilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloiletilfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina (como 16-O-monometil PE), dimetilfosfatidiletanolamina (como 16-O-dimetil PE), l8-l-trans PE, l-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dioleoilfosfatidilserina (DOPS), esfingomielina (SM), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), distearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dierucoilfosfatidilcolina (DEPC), palmitoilolfosfatidilglicerol (POPG), dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomielina de huevo (ESM), cefalina, cardiolipina, fosfatidicacido, cerebrósidos, dicotilfosfato, lisofosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, o mezclas de los mismos. Se entiende que también pueden usarse otros fosfolípidos de diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina. Los grupos acilo de estos lípidos son preferiblemente grupos acilo derivados de ácidos grasos con cadenas de carbono C10-C24, por ejemplo, lauroilo, miristoilo, paimitoilo, estearoilo u olearoilo. Otros lípidos ejemplares, en ciertas realizaciones, incluyen, sin limitación, los descritos en Kim et al. (2020) dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386. Tales lípidos incluyen, en algunas realizaciones, lípidos vegetales que se ha descubierto que mejoran la transfección hepática con ARNm (por ejemplo, DGTS).

Otros ejemplos de lípidos no catiónicos adecuados para su uso en las nanopartículas lipídicas incluyen, sin limitación, lípidos no fosforados como, por ejemplo, estearilamina, dodeeilamina, hexadecilamina, palmitato de acetilo, ricinoleato de glicerol, estereato de hexadecilo, miristato de isopropilo, polímeros acrílicos anfotéricos, trietanolamina-lauril sulfato, amidas de ácidos grasos polietiloxilados de alquil-aril sulfato, bromuro de diocadecil dimetil amonio, ceramida, esfingomielina y similares. Otros lípidos no catiónicos se describen en el documento WO2017/099823 o en la publicación de patente de Estados Unidos US2018/0028664.

En algunas realizaciones, el lípido no catiónico es ácido oleico o un compuesto de Fórmula I, II o IV del documento US2018/0028664. El lípido no catiónico puede comprender, por ejemplo, un 0-30% (mol) del lípido total presente en la nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, el contenido de lípido no catiónico es del 5-20% (mol) o del 10-15% (mol) del lípido total presente en la nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, la relación molar entre el lípido ionizable y el lípido neutro varía entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 8:1 (por ejemplo, aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 u 8:1).

En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas no comprenden ningún fosfolípido.

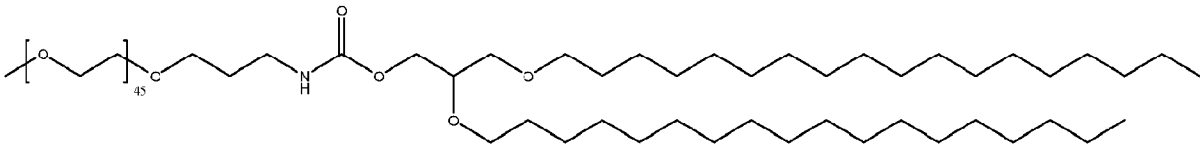
En algunos aspectos, la nanopartícula lipídica puede comprender además un componente, como un esterol, para proporcionar integridad a la membrana. Un esterol ejemplar que puede usarse en la nanopartícula lipídica es el colesterol y los derivados del mismo. Ejemplos no limitativos de derivados del colesterol incluyen análogos polares como 5a-colestanol, 53-coprostanol, éter colesteril-(2'-hidroxi)-etílico, éter colesteril-(4'-hidroxi)-butílico y 6-cetocolestanol; análogos no polares como 5a-colestano, colestenona, 5a-colestanona, 5p-colestanona y decanoato de colesterilo; y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el derivado de colesterol es un análogo polar, por ejemplo, colesteril-(4'-hidroxi)-butil éter. Algunos ejemplos de derivados del colesterol se describen en la publicación de PCT WO2009/127060 y en la publicación de patente de Estados Unidos US2010/0130588.

En algunas realizaciones, el componente que proporciona integridad a la membrana, como un esterol, puede comprender un 0-50% (mol) (por ejemplo, 0-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40% o 40-50%) del lípido total presente en la nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, dicho componente es 20-50% (mol) 30-40% (mol) del contenido lipídico total de la nanopartícula lipídica.

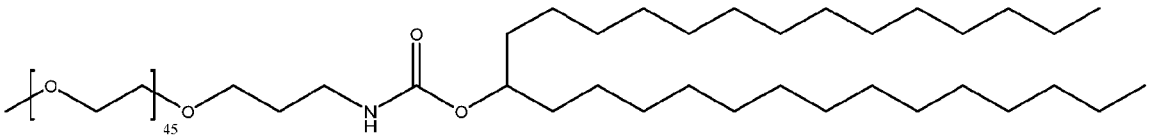
En algunas realizaciones, la nanopartícula lipídica puede comprender un polietilenglicol (PEG) o una molécula lipídica conjugada. Generalmente, estos se usan para inhibir la agregación de nanopartículas lipídicas y/o proporcionar estabilización estérica. Los lípidos conjugados ejemplares incluyen, pero no se limitan a, conjugados PEG-lípido, conjugados polioxazolina (POZ)-lípido, conjugados poliamida-lípido (como los conjugados ATTA-lípido), conjugados lípido-polímero catiónico (CPL) y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula lipídica conjugada es un conjugado PEG-lípido, por ejemplo, un lípido conjugado con (metoxipolietilenglicol).

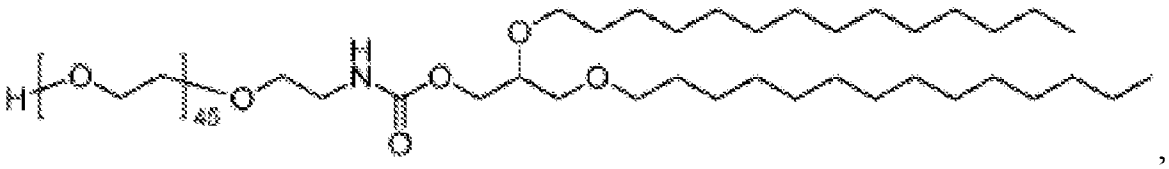
Los conjugados PEG-lípido ejemplares incluyen, entre otros, PEG-diacilglicerol (DAG) (como l-(monometoxi-polietilenglicol)-2,3-dimiristoilglicerol (PEG-DMG)), PEG-dialquiloxipropilo (DAA), PEG-fosfolípido, PEG-ceramida (Cer), una fosfatidiletanoloamina pegilada (PEG-PE), PEG succinato de diacilglicerol (PEGS-DAG) (como 4-0-(2',3'-di(tetradecanoiloxi)propil-1-0-(w-metoxi(polietoxi)etil) butanodioato (PEG-S-DMG)), PEG dialcoxipropilcarbam, sal sódica de N-(carbonil-metoxipolietilenglicol 2000)-l,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, o una mezcla de los

mismos. Conjugados de PEG-lípido ejemplares adicionales se describen, por ejemplo, en los documentos US5,885,613, US6,287,591, US2003/0077829, US2003/0077829, US2005/0175682, US2008/0020058, US2011/0117125, US2010/0130588, US2016/0376224, US2017/0119904, y US/099823. En algunas realizaciones, un PEG-lípido es un compuesto de fórmula III, III-a-I, III-a-2, III-b-1, III-b-2 o V del documento US2018/0028664. En algunas realizaciones, un PEG-lípido es de Fórmula II del documento US20150376115 o del US2016/0376224. En algunas realizaciones, el conjugado PEG-DAA puede ser, por ejemplo, PEG-dilauriloxipropilo, PEG-dimiristiloxipropilo, PEG-dipalmitiloxipropilo, o PEG-diestheariloxipropilo. El PEG-lípido puede ser uno o más de PEG-DMG, PEG-dilaurilglicerol, PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-disterilglicerol, PEG-dilaurilglicamida, PEG-dimiristoilglicamida, PEG-dipalmitoilglicamida, PEG-disterilglicamida, PEG-colesterol (l-[8'-(Colest-5-en-3[beta]-oxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil-[omega]-metil-poli(etilenglicol), PEG-DMB (3,4-Ditetradecoxilbencil-[omega]-metil-poli(etilenglicol) éter), y 1,2- dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]. En algunas realizaciones, el PEG-lípido comprende PEG-DMG, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]. En algunas realizaciones, el PEG-lípido comprende una estructura seleccionada entre:



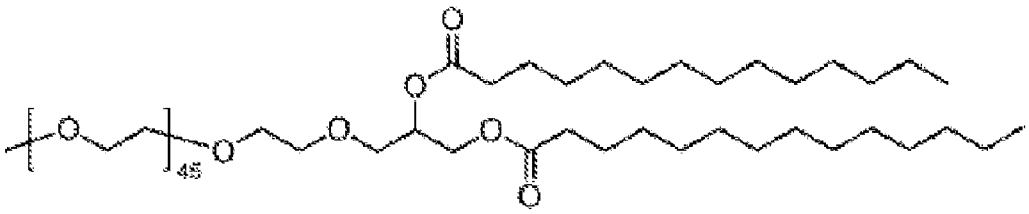
,





,

y



.

En algunas realizaciones, también pueden usarse lípidos conjugados con una molécula distinta de un PEG en lugar de PEG-lípido. Por ejemplo, pueden usarse los conjugados de polioxazolina (POZ)-lípido, los conjugados de poliamida-lípido (como los conjugados de ATTA-lípido) y los conjugados de lípido catiónico-polímero (GPL) en lugar o además del PEG-lípido.

Los lípidos conjugados ejemplares, es decir, los PEG-lípidos, los conjugados (POZ)-lípido, los conjugados ATTA-lípido y los polímero catiónico-lípidos se describen en las solicitudes de patentes PCT y LIS enumeradas en la Tabla 2 del documento WO2019051289A9.

En algunas realizaciones, el PEG o el lípido conjugado pueden comprender el 0-20% (mol) del lípido total presente en la nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, el contenido de PEG o del lípido conjugado es del 0,5-10% o del 2-5% (mol) del lípido total presente en la nanopartícula lipídica. Las proporciones molares del lípido ionizable, el lípido no catiónico, el esterol y el PEG/lípido conjugado pueden variar según sea necesario. Por ejemplo, la partícula lipídica puede comprender un 30-70% de lípido ionizable en moles o en peso total de la composición, un 0-60% de colesterol en moles o en peso total de la composición, un 0-30% de lípido no catiónico en moles o en peso total de la composición y un 1-10% de lípido conjugado en moles o en peso total de la composición. Preferiblemente, la composición comprende un 30-40% de lípidos ionizables en moles o en peso total de la composición, un 40-50% de colesterol en moles o en peso total de la composición y un 10-20% de lípidos no catiónicos en moles o en peso total de la composición. En algunas otras realizaciones, la composición contiene un 50-75% de lípidos ionizables en moles o en peso total de la composición, un 20-40% de colesterol en moles o en peso total de la composición, y un 5-

10% de lípidos no catiónicos en moles o en peso total de la composición y un 1-10% de lípidos conjugados en moles o en peso total de la composición. La composición puede contener un 60-70% de lípidos ionizables en moles o en peso total de la composición, un 25-35% de colesterol en moles o en peso total de la composición, y un 5-10% de lípidos no catiónicos en moles o en peso total de la composición. La composición también puede contener hasta un 90% de lípidos ionizables en moles o en peso total de la composición y entre un 2 y un 15% de lípidos no catiónicos en moles o en peso total de la composición. La formulación también puede ser una formulación de nanopartículas lipídicas, por ejemplo, que comprenda un 8-30% de lípidos ionizables en moles o en peso total de la composición, un 5-30% de lípidos no catiónicos en moles o en peso total de la composición, y un 0-20% de colesterol en moles o en peso total de la composición; un 4-25% de lípido ionizable en moles o en peso total de la composición, un 4-25% de lípido no catiónico en moles o en peso total de la composición, un 2-25% de colesterol en moles o en peso total de la composición, un 10-35% de lípido conjugado en moles o en peso total de la composición, y un 5% de colesterol en moles o en peso total de la composición; o un 2-30% de lípidos ionizables en moles o en peso total de la composición, un 2-30% de lípidos no catiónicos en moles o en peso total de la composición, de un 1 a un 15% de colesterol en moles o en peso total de la composición, de un 2 a un 35% de lípidos conjugados en moles o en peso total de la composición, y de un 1 a un 20% de colesterol en moles o en peso total de la composición; o incluso hasta un 90% de lípidos ionizables en moles o en peso total de la composición y un 2-10% de lípidos no catiónicos en moles o en peso total de la composición, o incluso un 100% de lípidos catiónicos en moles o en peso total de la composición. En algunas realizaciones, la formulación de partículas lipídicas comprende lípido ionizable, fosfolípido, colesterol y un lípido PEG-ilado en una proporción molar de 50: 10:38,5: 1,5. En algunas otras realizaciones, la formulación de partículas lipídicas comprende lípido ionizable, colesterol y un lípido PEG-ilado en una proporción molar de 60:38,5: 1,5.

En algunas realizaciones, la partícula lipídica comprende lípido ionizable, lípido no catiónico (por ejemplo, fosfolípido), un esterol (por ejemplo, (por ejemplo, colesterol) y un lípido PEG-ilado, donde la relación molar de lípidos varía del 20 al 70 por ciento molar para el lípido ionizable, con un objetivo de 40-60, el pocentaje en moles de lípido no catiónico varía de 0 a 30, con un objetivo de 0 a 15, el porcentaje molar de esterol varía de 20 a 70, con un objetivo de 30 a 50, y el porcentaje molar de lípido PEG-ilado varía de 1 a 6, con un objetivo de 2 a 5.

En algunas realizaciones, la partícula lipídica comprende lípido ionizable / lípido no catiónico / esterol / lípido conjugado en una proporción molar de 50:10:38,5: 1,5.

La divulgación proporciona una formulación de nanopartículas lipídicas que comprende fosfolípidos, lecitina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

En algunas realizaciones, también pueden incluirse uno o más compuestos adicionales. Esos compuestos pueden administrarse por separado, o los compuestos adicionales pueden incluirse en las nanopartículas lipídicas. En otras palabras, las nanopartículas lipídicas pueden contener otros compuestos además del ácido nucleico o por lo menos un segundo ácido nucleico, diferente del primero. Sin limitaciones, otros compuestos adicionales pueden seleccionarse del grupo que consiste en moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas o grandes, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, péptidos, proteínas, análogos de péptidos y derivados de los mismos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos y derivados, un extracto hecho de materiales biológicos, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, las LNP comprenden lípidos biodegradables ionizables. En algunas realizaciones, las LNP comprenden (9Z,l2Z)-3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil octadeca-9,l2-dienoato, también llamado 3-((4,4-bis(octiloxi)butanoil)oxi)-2-((((3-(dietilamino)propoxi)carbonil)oxi)metil)propil (9Z,l2Z)-octadeca-9,12-dienoato) u otro lípido ionizable. Véanse, por ejemplo, los lípidos de los documentos WO2019/067992, WO/2017/173054, WO2015/095340, y WO2014/136086, así como las referencias proporcionadas en los mismos. En algunas realizaciones, los términos catiónico e ionizable en el contexto de los lípidos de LNP son intercambiables, por ejemplo, en donde los lípidos ionizables son catiónicos dependiendo del pH.

En algunas realizaciones, el diámetro medio de la LNP de la formulación de LNP puede estar entre 10s de nm y 100s de nm, por ejemplo, medido por dispersión dinámica de luz (DLS). En algunas realizaciones, el diámetro medio de la LNP de la formulación de LNP puede ser de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, como de aproximadamente 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm. En algunas realizaciones, el diámetro medio de la LNP de la formulación de LNP puede ser de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, o de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, el diámetro medio de la LNP de la formulación de LNP puede ser de aproximadamente 70 nm

a aproximadamente 100 nm. En una realización particular, el diámetro medio de LNP de la formulación de LNP puede ser de aproximadamente 80 nm. En algunas realizaciones, el diámetro medio de LNP de la formulación de LNP puede ser de aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, el diámetro medio de LNP de la formulación de LNP varía de aproximadamente I mm a aproximadamente 500 mm, de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 200 mm, de aproximadamente 10 mm a aproximadamente 100 mm, de aproximadamente 20 mm a aproximadamente 80 mm, de aproximadamente 25 mm a aproximadamente 60 mm, de aproximadamente 30 mm a aproximadamente 55 mm, de aproximadamente 35 mm a aproximadamente 50 mm, o de aproximadamente 38 mm a aproximadamente 42 mm.

En algunos casos, una LNP puede ser relativamente homogénea. Puede usarse un índice de polidispersidad para indicar la homogeneidad de una LNP, por ejemplo, la distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas. Un índice de polidispersidad pequeño (por ejemplo, de menos de 0,3) indica generalmente una distribución estrecha del tamaño de las partículas. Una LNP puede tener un índice de polidispersidad de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,25, como de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, o 0,25. En algunas realizaciones, el índice de polidispersidad de una LNP puede ser de 0,10 a 0,20 aproximadamente.

El potencial zeta de una LNP puede usarse para indicar el potencial electrocinético de la composición. En algunas realizaciones, el potencial zeta puede describir la carga superficial de una LNP. Generalmente se desean las nanopartículas lipídicas con cargas relativamente bajas, positivas o negativas, ya que las especies más cargadas pueden interactuar de manera indeseable con células, tejidos y otros elementos del cuerpo. En algunas realizaciones, el potencial zeta de una LNP puede ser de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +10 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente +5 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente 0 mV, de aproximadamente -10 mV a aproximadamente -5 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +10 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente +5 mV, de aproximadamente -5 mV a aproximadamente 0 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +10 mV, de aproximadamente 0 mV a aproximadamente +5 mV, de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +15 mV, o de aproximadamente +5 mV a aproximadamente +10 mV

La eficiencia de encapsulación de una proteína y/o ácido nucleico, describe la cantidad de proteína y/o ácido nucleico que se encapsula o se asocia de otro modo con una LNP después de la preparación, con respecto a la cantidad inicial proporcionada. La eficiencia de encapsulación es deseablemente alta (por ejemplo, cercana al 100%). La eficiencia de encapsulación puede medirse, por ejemplo, comparando la cantidad de proteína o ácido nucleico en una solución que contiene la nanopartícula lipídica antes y después de romper la nanopartícula lipídica con uno o más solventes o detergentes orgánicos. Para medir la cantidad de proteína o ácido nucleico libre (por ejemplo, ARN) en una solución puede usarse una resina de intercambio aniónico. Para medir la cantidad de proteína libre y/o ácido nucleico (por ejemplo, ARN) en una solución puede usarse fluorescencia. Para las nanopartículas lipídicas descritas en la presente, la eficacia de encapsulación de una proteína y/o ácido nucleico puede ser de por lo menos el 50%, por ejemplo el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. En algunas realizaciones, la eficacia de encapsulación puede ser de por lo menos el 80%. En algunas realizaciones, la eficacia de encapsulación puede ser de por lo menos el 90%. En algunas realizaciones, la eficacia de encapsulación puede ser de por lo menos el 95%.

Una LNP puede comprender opcionalmente uno o más recubrimientos. En algunas realizaciones, una LNP puede formularse en una cápsula, película o comprimido que tenga un recubrimiento. Una cápsula, película o comprimido que incluya una composición descrita en la presente puede tener cualquier tamaño útil, resistencia a la tracción, dureza o densidad.

En los documentos WO2020/061457 y WO2021/113777 se enseñan ejemplos de lípidos, formulaciones, métodos y caracterización de LNP adicionales. Ejemplos de lípidos, formulaciones, métodos y caracterización de LNP adicionales se enseñan en Hou et al. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. Nat Rev Mater (2021). doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0 (véanse, por ejemplo, los lípidos y derivados lipídicos ejemplares de la Figura 2 de Hou et al.)

En algunas realizaciones, se llevan a cabo lipofecciones celulares in vitro o ex vivo uszando Lipofectamine MessengerMax (Thermo Fisher) o TranslT-mRNA Transfection Reagent (Mirus Bio). En ciertas realizaciones, las LNP se formulan usando la mezcla lipídica ionizable GenVoy_ILM (Precision NanoSystems). En ciertas realizaciones, las LNP se formulan usando 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA) o dilinoleilmetil-4-dimetilaminobutirato (DLin-MC3-DMA o MC3), cuya formulación y uso in vivo se enseñan en Jayaraman et al. Angew Chem Int Ed Engl 51(34):8529-8533 (2012).

En los documentos WO2019067992 y WO2019067910 se describen formulaciones de LNP optimizadas para la administración de sistemas CRISPR-Cas, por ejemplo, RNP Cas9-ARNg, ARNg, ARNm Cas9, que son útiles para

la administración de polirribonucleótidos circulares y polirribonucleótidos lineales descritos en la presente.

En los documentos US8158601 y US8168775, que incluyen formulaciones usadas en patisiran, comercializadas con el nombre de ONPATTRO, se describen formulaciones específicas adicionales de LNP útiles para la administración de ácidos nucleicos (por ejemplo, polirribonucleótidos circulares, polirribonucleótidos lineales).

La dosificación ejemplar de LNP de polirribonucleótidos (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) puede incluir aproximadamente 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 o 100 mg/kg (ARN). La dosificación ejemplar de AAV que comprende un polirribonucleótido (por ejemplo, un polirribonucleótido circular, un polirribonucleótido lineal) puede incluir una MOI de aproximadamente 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, y 10^{14} vg/kg.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción de cómo pueden usarse, elaborarse y evaluarse las composiciones y métodos descritos en la presente, y se pretende que sean meramente ejemplares de la divulgación y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

Ejemplo 1: Diseño de un constructo de intrón-exón permutado (PIE) de auto-corte y empalme de Anabaena con región de apareamiento ampliada

Este ejemplo describe el diseño de secuencias permutadas intrón-exón (PIE) de auto-corte y empalme de Anabaena con una región de apareamiento ampliada para proporcionar una mejor eficiencia de circularización.

En las FIG. 1A y FIG. 1B se proporcionan esquemas que representan diseños ejemplares de constructos de ADN. En este ejemplo, los constructos incluyen, de 5' a 3': una mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del grupo I (medio intrón 3' de Anabaena), un sitio de corte y empalme 3', un fragmento de exón 3' (E2 de Anabaena), un elemento espaciador, una carga de polinucleótidos, un fragmento de exón 5' (E1 de Anabaena), un sitio de corte y empalme 5', y una mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del grupo I (medio intrón 5' de Anabaena). E2 tiene una secuencia complementaria de 5 nucleótidos (5'-TCCGT-3') (SEQ ID NO: 1) a E1 (5'-ACGGA-3') (SEQ ID NO: 2) (FIGS. 1A y 1B, líneas negras en E2 y E1). Para generar un constructo que tenga una región de apareamiento ampliada entre E2 y E1, se mutaron 5 nucleótidos de E2 para que tuviesen una región de apareamiento ampliada de 7 nucleótidos con E1 (TGACCTT (SEQ ID NO: 3) → AGCGTCT (SEQ ID NO: 4), el carácter en negrita representa las secuencias mutadas) (FIG. 1B, línea gris en E2 y E1, los asteriscos en E2 representan la mutación en la secuencia). La región de apareamiento total del intrón-exón permutado (PIE) de Anabaena con una región de apareamiento ampliada es de 12 nucleótidos (E2; 5'-TCCGTAGCGTCT-3' (SEQ ID NO: 5), E1; 5'-AGACGCTACGGA-3' (SEQ ID NO: 6)) (FIG. 1B).

La estructura del ARN se estimó mediante la herramienta de predicción de la estructura del ARN, RNA fold (rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi). La extensión de la interacción E2-E1 se generó modificando los resultados de la secuencia en la interacción E2-E1 adecuada y la estructura condensada del intrón de auto-corte y empalme (FIGS. 2A y 2B).

Se diseñaron constructos que tienen la PIE de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1) y secuencias de apareamiento con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2) para comparar la eficiencia de circularización. También se usaron para la comparación los constructos de PIE de Anabaena descritos en Wesselhoeft, et al. 2018 (Nat. Commun. 9:2629) (Anabaena 3). En este ejemplo, los constructos se diseñaron para que incluyesen poliA50 como elemento espaciador, y una combinación de un sitio de entrada del ribosoma interno (IRES) de EMCV y un ORF como carga de polinucleótidos. Se probaron dos ORF diferentes: un ORF de luciferasa de Gaussia (Gluc) (558 nucleótidos) y un ORF de proteína de pico de SARS-CoV-2 (3822nts). El tamaño del ARN circular fue de 1,2 Kb con el ORF de la Gluc y de 4,5 Kb con el ORF de la proteína espiga del SARS-CoV-2.

El ARN lineal no modificado se sintetizó mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 a partir de una plantilla de ADN en presencia de 7,5mM de NTP. El ADN plantilla se eliminó tratándolo con DNasa durante 20 minutos. El ARN lineal sintetizado se purificó con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050). El auto-corte y empalme se produjo durante la transcripción; no se requirió ninguna reacción adicional. Para monitorizar la eficacia del auto-corte y empalme, se mezclaron 200 ng de ARN transcrito *in vitro* purificado en columna con tampón de carga de gel II (Thermo Fisher, AM8546G) y se calentaron a 95º C durante 3 minutos, incubándolos luego en hielo durante 3 minutos. A continuación, las muestras se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con urea al 6% (Urea PAGE), y la banda de ARN se tiñó con tinción de gel y se visualizó usando un sistema de imagenología.
La ampliación de la secuencia de apareamiento de 5 nucleótidos a 12 nucleótidos aumentó la eficiencia de circularización hasta dos veces y mostró una eficiencia de circularización similar con Anabaena 3 en el caso del ARN circular de 1,2Kb (FIG. 3A). En el caso del ARN circular de 4,5Kb, la PIE de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2) mostró una eficiencia de circularización un 40% mejor que la de Anabaena 3 y tres veces mayor que la PIE de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1) (FIG. 3B).

La PIE de Anabaena diseñada para que tuviese una secuencia de apareamiento E2-E1 ampliada (Anabaena 2) mostró una eficiencia de circularización 2-3 veces mejor que la PIE de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos, independientemente del tamaño del ARN circular (Anabaena 1). Esto muestra una eficiencia de circularización similar para la construcción de 1,2 Kb, más fácil de circularizar, y una eficiencia de circularización un 40% mejor para el constructo difícil de 4,5 Kb.

Ejemplo 2: Expresión de proteínas a partir de ARN circular generado por PIE de auto-corte y empalme de Anabaena con una región de apareamiento ampliada

Este ejemplo demuestra la expresión de proteínas a partir de ARN circular generado por PIE de auto-corte y empalme de Anabaena con una región de apareamiento ampliada.

En este ejemplo, se diseñaron constructos que tenían PIE de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1) y secuencias de apareamiento ampliadas (Anabaena 2) como se describe en el Ejemplo 1 para comparar la expresión de proteínas. En este ejemplo, los constructos se diseñaron para que incluyesen poliA50 como elemento espaciador, y una combinación de un IRES EMCV y un ORF como carga de polinucleótidos. Se probaron dos ORF diferentes: Gluc (558nts) y proteína espiga de SARS-CoV-2 (3822nts). También se probó por comparación Anabaena 3, como se describe en el Ejemplo 1,.
El ARN lineal se sintetizó mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 en presencia de 7,5mM de NTP. El ADN plantilla se eliminó tratando con DNasa durante 20 minutos. El ARN lineal sintetizado se purificó con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050). El ARN circular que codifica Gluc se purificó mediante Urea PAGE, se eluyó en un tampón (0,5 M de acetato sódico, 0,1% de SDS, 1 mM de EDTA), se precipitó con etanol y se volvió a suspender en agua libre de ARNasa. El ARN circular que codifica la proteína espiga del SARS-CoV-2 se purificó mediante cromatografía en fase inversa y las fracciones se intercambiaron en tampón con citrato sódico y luego en agua mediante ultrafiltración usando filtros centrífugos Amicon Ultra (Sigma Aldrich).

Para comparar la expresión del ARN circular que codifica Gluc, se preparó ARN circular generado por Anabaena 1 y Anabaena 2. Por comparación, también se preparó ARN circular producido por Anabaena 3. Se transfectaron células HeLa (10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos) con 0,1 pmoles de ARN circular purificado usando el reactivo de transfección LIPOFECTAMINE® MessengerMAX (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se recogieron los medios de cultivo celular y se sustituyeron por medios frescos a las 24, 48 y 72 horas para medir la actividad de Gluc. Para medir la actividad de Gluc, se transfirieron 10 µl de medio celular recogido a una placa blanca de 96 pocillos y se usó un sistema de ensayo de reportero bioluminiscente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce Gaussia Luciferase Flash Assay Kit, 16158, Thermo Scientific). La placa se leyó en un luminómetro (Promega).

Para comparar la expresión del ARN circular que codifica la proteína espiga del SARS-CoV-2, se preparó ARN circular generado por PIE de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1) y PIE de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2). Por comparación, también se preparó ARN circular producido por Anabaena 3. Se transfectaron células HeLa (1,2 millones de células por pocillo en una placa de 6 pocillos) con 4 pmol de ARN circular purificado usando el agente de transfección LIPOFECTAMINE® MessengerMAX (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas de transfección, las células se recogieron por tripsinización y se volvieron a suspender en medio libre de suero frío. Las células se tiñeron con el anticuerpo anti-SARS-CoV-2 RBD durante una hora y posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-IgG1 de ratón AF647 durante 30 minutos. La población teñida se midió por citometría de flujo.

El ARN circular generado por PIE de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2) mostró una expresión similar con el ARN circular generado por PIE de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1) y el ARN circular producido por Anabaena 3 cuando codificaba Gluc como carga de polinucleótidos (FIG. 4). En el caso del ARN circular que codifica la proteína espiga del SARS-CoV-2, el ARN circular generado por Anabaena 2 mostró una expresión aproximadamente tres veces mejor que el ARN circular producido por Anabaena 3 y un 50% más de expresión que el ARN circular generado por Anabaena 1 (FIG. 5).

Ejemplo 3: El efecto de la longitud de la región de apareamiento sobre la eficiencia de circularización en el PIE de auto-corte y empalme de Anabaena.

Este ejemplo demuestra el efecto de la longitud de la región de apareamiento sobre la eficiencia de circularización en el PIE de auto-corte y empalme de Anabaena.

En el Ejemplo 1 anterior, demostramos que la ampliación de la región de apareamiento de 5 nucleótidos a 12 nucleótidos mediante la mutación de la secuencia E2 aumenta la eficiencia de circularización de la PIE de Anabaena. Para examinar el efecto de la longitud de la región de apareamiento en la eficiencia de circularización, se diseñaron tres constructos adicionales para que tuviesen una región de apareamiento ampliada adicional entre E2 y E1 mediante la inclusión de secuencias adicionales en el extremo 5' de E1 que son complementarias a E2: (1) extensión de 5

nucleótidos (5'-CGTTT-3') (SEQ ID NO: 7), (2) extensión de 10 nucleótidos (5'- ACGACCGTTT-3') (SEQ ID NO: 8), y (3) extensión de 15 nucleótidos (5'- CCCACACGACCGTTT-3') (SEQ ID NO: 9). La secuencia complementaria en E2 tiene una extensión de 5 nucleótidos (5'- AAACG-3') (SEQ ID NO: 10), una extensión de 10 nucleótidos (5'- AAACGGTCGT-3') (SEQ ID NO: 11), o una extensión de 15 nucleótidos (5'- AAACGGTCGTGGG-3') (SEQ ID NO: 12), respectivamente. La secuencia total de apareamiento tiene 17 nucleótidos, 22 nucleótidos o 27 nucleótidos, respectivamente. En la FIG. 6 se proporciona un esquema que representa diseños ejemplares de constructos de ADN con regiones de apareamiento ampliadas entre E2 y E1.

Para comparar la eficiencia de circularización se diseñaron constructos con secuencias de apareamiento ampliadas (Anabaena 2) y región de apareamiento ampliada (extensión de 5 nucleótidos, extensión de 10 nucleótidos y extensión de 15 nucleótidos). En este ejemplo, los constructos se diseñaron para que incluyesen poliA50 como elemento espaciador, y una combinación de un IRES EMCV y Gluc como carga de polinucleótidos.

El ARN lineal se sintetizó mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 en presencia de 7,5 mM de NTP. El ADN plantilla se eliminó tratándolo con DNasa durante 20 minutos. El ARN lineal sintetizado se purificó con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050).

El auto-corte y empalme se produjo durante la transcripción; no se requirió ninguna reacción adicional. Para monitorizar la eficacia del auto-corte y empalme, se mezclaron 200 ng de ARN transcrito *in vitro* purificado en columna con tampón de carga de gel II (Thermo Fisher, AM8546G) y se calentaron a 95º C durante 3 minutos, incubándose después en hielo durante 3 minutos. A continuación, las muestras se separaron mediante PAGE con urea al 6%, y la banda de ARN se tiñó con tinción de gel y se visualizó mediante un sistema de imagenología.

Una ampliación adicional de la región de apareamiento entre E2 y E1 (extensión de 5 nts, extensión de 10 nts o extensión de 15 nts) mostró una eficiencia de circularización comparable con PIE de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2) (FIG. 7). Una extensión de 15 nucleótidos de la región de apareamiento mostró un 30% más de eficiencia de circularización en comparación con Anabaena 2 (FIG. 7). Estos datos indican que la interacción E2-E1 es importante para una circularización eficiente y una mayor extensión de la región de apareamiento puede aumentar la eficiencia de circularización.

Ejemplo 4: Expresión de proteínas a partir de ARN circular generado por PIE de auto-corte y empalme de Anabaena con secuencia de apareamiento ampliada

Este ejemplo demuestra la expresión de proteínas a partir de ARN circular generado por PIE de auto-corte y empalme de Anabaena con secuencia de apareamiento extendida.

En este ejemplo, se diseñaron constructos con secuencias de apareamiento ampliadas (Anabaena 2) y región de apareamiento ampliada (extensión de 5 nucleótidos, extensión de 10 nucleótidos y extensión de 15 nucleótidos) como se describe en el Ejemplo 3 para comparar la expresión de proteínas. En este ejemplo, los constructos se diseñaron para que incluyesen poliA50 como elemento espaciador, y una combinación de un IRES EMCV y Gluc como carga de polinucleótidos.

El ARN lineal se sintetizó mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 en presencia de 7,5 mM de NTP. El ADN plantilla se eliminó tratándolo con DNasa durante 20 minutos. El ARN lineal sintetizado se purificó con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050). El ARN circular que codifica Gluc se purificó mediante Urea PAGE, se eluyó en un tampón (0,5 M de acetato sódico, 0,1% de SDS, 1 mM de EDTA), se precipitó con etanol y se volvió a suspender en agua libre de ARNasa.

Para comparar la expresión del ARN circular que codifica Gluc, se prepararon ARN circulares generados por Anabaena 2 y PIE Anabaena con una región de apareamiento ampliada adicionalmente (extensión de 5 nucleótidos, extensión de 10 nucleótidos o extensión de 15 nucleótidos) como se describe en el Ejemplo 3. Las células HeLa (10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos) se transfectaron con 0,1 pmoles de ARN circulares purificados usando el agente de transfección LIPOFECTAMINE® MessengerMAX (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se prepararon transfectantes para cada punto temporal por separado. Se recogieron los medios de cultivo a las 6, 24 y 48 horas. Para medir la actividad de Gluc, se transfirieron 10 µl del medio celular recogido a una placa blanca de 96 pocillos y se usó un sistema de ensayo de reportero bioluminiscente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce Gaussia Luciferase Flash Assay Kit, 16158, Thermo Scientific). La placa se leyó en un luminómetro (Promega).

El ARN circular generado por PIE de Anabaena con una región de apareamiento ampliada adicional (extensión de 5 nts, extensión de 10 nts o extensión de 15 nts) mostró una expresión similar o mejor que la del ARN circular generado por Anabaena 2 (FIG. 8). Por ejemplo, el ARN circular generado por PIE de Anabaena con una extensión de 15 nucleótidos (27 nucleótidos en total) mostró una expresión tres veces mayor que PIE de Anabaena con una región de apareamiento ampliada de 12 nucleótidos (Anabaena 2). Estos datos indican que la extensión de la región de apareamiento es importante no sólo para la eficacia de la circularización, sino también para la expresión.

Ejemplo 5: Diseño de un intrón-exón permutado (PIE) de auto-corte y empalme de Tetrahymena con una región

de apareamiento ampliada

Este ejemplo describe el diseño de un intrón-exón permutado (PIE) de auto-corte y empalme de Tetrahymena con una región de apareamiento ampliada.
En las FIG. 9A y FIG. 9B se proporcionan esquemas de diseños ejemplares de constructos de ADN.

En este ejemplo, los constructos incluyen, de 5' a 3': una mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I (Tetrahymena mitad 3'-), un sitio de corte y empalme 3', un fragmento del exón 3' (Tetrahymena E2), un elemento espaciador, una carga de polinucleótidos, un fragmento del exón 5' (Tetrahymena E1), un sitio de corte y empalme 5', y una mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I (Tetrahymena mitad 5'-intrón). E2 tiene una secuencia complementaria de 6 nucleótidos (5'- AAGGTA-3') (SEQ ID NO: 13) al medio intrón 5' (5'- TACCTT-3') (SEQ ID NO: 14) que forma la hélice P10 (FIG. 9, líneas negras sobre E1 y medio intrón 5'). Para generar un constructo que tenga una región de apareamiento ampliada entre E2 y la mitad 5'-intrón, se añadieron 6 nucleótidos al extremo 3' de la región de apareamiento en E2 (5'-AATATT-3' (SEQ ID NO: 15), recuadro gris en E2 en las FIGS. 9A y 9B). La región de apareamiento total de la PIE de auto-corte y empalme de Tetrahymena con región de apareamiento ampliada es de 12 nucleótidos (E2; 5'-AAGGTAAATATT-3' (SEQ ID NO: 16), intrón 5'; 5'- AATATTTACCTT-3' (SEQ ID NO: 17), los caracteres en negrita representan la región de apareamiento ampliada) (FIG. 9B).

La estructura del ARN se estimó mediante la herramienta de predicción de la estructura del ARN, RNA fold (rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi). La extensión de la interacción E2-mitad 5'-intrón mediante una secuencia adicional dio como resultado la formación adecuada de la hélice P10 y a la estructura condensada del intrón de auto-corte y empalme (FIGS. 10A y 10B).

Se diseñaron constructos que tienen un intrón-exón permutado de Tetrahymena con una región de apareamiento de 6 nucleótidos (Tetrahymena 1) y secuencias de apareamiento ampliadas (Tetrahymena 2) para comparar la eficiencia de circularización. En este ejemplo, los constructos se diseñaron para que incluyesen poliA50 como elemento espaciador y una combinación de un IRES de EMCV y un ORF de hEPO como carga de polinucleótidos. El tamaño del ARN circular era de 1,2 Kb.

El ARN lineal se sintetizó mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 en presencia de 7,5 mM de NTP. El ADN plantilla se eliminó tratándolo con DNasa durante 20 minutos. El ARN lineal sintetizado se purificó con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050).
El auto-corte y empalme se produjo durante la transcripción; no se requirió ninguna reacción adicional. Para monitorizar la eficacia de la circularización, se mezclaron 200 ng de ARN transcrito *in vitro* purificado en columna con tampón de carga de gel II (Thermo Fisher, AM8546G) y se calentaron a 95º C durante 3 minutos, después se incubaron en hielo durante 3 minutos. A continuación, las muestras se separaron mediante urea PAGE al 6%, y la banda de ARN se tiñó con tinción de gel y se visualizó mediante un sistema de imagenología. La ampliación de la secuencia de apareamiento de 6 nucleótidos a 12 nucleótidos (Tetrahymena 2) mostró una eficiencia de circularización similar con una PIE de auto-corte y empalme de Tetrahymena con una región de apareamiento de 6 nucleótidos (Tetrahymena 1) (FIG. 11). Estos datos indican que la circularización no se vio interrumpida por la extensión de la secuencia de apareamiento en la PIE de auto-corte y empalme de Tetrahymena.

Ejemplo 6: Expresión de proteínas a partir de ARN circular generado por PIE de Tetrahymena con una región de apareamiento ampliada

Este ejemplo describe la expresión de proteínas a partir de ARN circular generado por PIE de auto-corte y empalme de Tetrahymena con una región de apareamiento ampliada.

Para comparar la expresión de proteínas, se diseñan constructos de ADN que tienen un PIE de auto-corte y empalme de Tetrahymena con una región de apareamiento de 6 nucleótidos (Tetrahymena 1) y secuencias de apareamiento ampliadas (Tetrahymena 2), tal como se describe en el Ejemplo 5. Los constructos están diseñados para incluir un poliA50 como elemento espaciador, y una combinación de un EMCV IRES, y Gluc ORF como carga de polinucleótidos.

El ARN lineal se sintetiza mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 en presencia de 7,5 mM de NTP. El ADN plantilla se elimina tratándolo con DNasa. El ARN lineal sintetizado se purifica con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050). El ARN circular que codifica Gluc se purifica mediante Urea PAGE, se eluye en un tampón (0,5 M de acetato sódico, 0,1% de SDS, 1 mM de EDTA), se precipita con etanol y se vuelve a suspender en agua libre de ARNasa.

Para comparar la expresión del ARN circular que codifica Gluc, se preparan ARN circulares generados por PIE de Tetrahymena con una región de apareamiento de 6 nucleótidos (Tetrahymena 1) y PIE de Tetrahymena con una región de apareamiento ampliada (Tetrahymena 2), como se ha descrito anteriormente. Las células HeLa (10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos) se transfectan con 0,1 pmoles de ARN circular purificado usando el

agente de transfección LIPOFECTAMINE® MessengerMAX (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los transfectantes se preparan para cada punto temporal por separado. Los medios de cultivo se recogen a las 6, 24 y 48 horas. Para medir la actividad de Gluc, el medio celular recogido se transfiere a una placa blanca de 96 pocillos y se usa un sistema de ensayo de reportero bioluminiscente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La placa se lee en un luminómetro.

Ejemplo 7: Diseño de un intrón-exón permutado (PIE) de auto-corte y empalme de fago T4 con región de apareamiento ampliada

Este ejemplo describe el diseño de la PIE de auto-corte y empalme del fago T4 con región de apareamiento ampliada.

En las FIG. 12A y FIG. 12B se muestran esquemas que representan diseños ejemplares de constructos de ADN. El constructo incluye, de 5' a 3': una mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del grupo I (mitad 3'-intrón del fago T4), un sitio de corte y empalme 3', un fragmento de exón 3' (fago T4 E2), un elemento espaciador, una carga de polinucleótidos, un fragmento de exón 5' (fago T4 E1), un sitio de corte y empalme 5', y una mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del grupo I (mitad 5'-intrón del fago T4). E2 tiene una secuencia complementaria de 2 nucleótidos (5'-CT-3') a la mitad 5'-intrón (5'- AG-3') que forma la hélice P10 (FIGS. 12A y 12B, líneas negras sobre E2 y mitad 5'-intrón). Para generar un constructo que tenga una región de apareamiento ampliada entre E2 y la mitad 5'-intrón, se mutaron 4 nucleótidos de E2 para tener una región de apareamiento ampliada de 5 nucleótidos con la mitad 5'-intrón (5'-**ACCGT-3'** (SEQ ID NO: 18) → 5'-**CAATT-3'** (SEQ ID NO: 19), los caracteres en negrita representan secuencias mutadas). La región de apareamiento total del fago T4 PIE con una región de apareamiento ampliada es de 7 nucleótidos (E2; 5'-**CTCAATT-3'** (SEQ ID NO: 20), mitad 5'-intrón; 5'-**AATTGAG** -3' (SEQ ID NO: 21), los caracteres en negrita representan secuencias de apareamiento extendidas) (FIGS. 12A y 12B).
Para comparar la eficiencia de circularización, se diseñaron constructos que tienen PIE de fago T4 con una región de apareamiento de 2 nucleótidos (fago T4 1) y secuencias de apareamiento ampliadas (fago T4 2). En este ejemplo, los constructos se diseñaron para que incluyesen poliA50 como elemento espaciador, una combinación de un EMCV IRES y Gluc ORF como carga de polinucleótidos. El tamaño del ARN circular era de 1,2 K. El ARN lineal se sintetizó mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 en presencia de 7,5 mM de NTP. El ADN plantilla se eliminó tratándolo con DNasa. El ARN lineal sintetizado se purificó con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050).

El auto-corte y empalme se produjo durante la transcripción; no se requiere ninguna reacción adicional. Para monitorizar la eficacia de la circularización, se mezclaron 200 ng de ARN transcrito in vitro purificado en columna con tampón de carga de gel II (Thermo Fisher, AM8546G) y se calentaron a 95º C durante 3 minutos, incubándose después en hielo durante 3 minutos. A continuación, las muestras se separaron mediante urea PAGE al 6%, y la banda de ARN se tiñó con tinción de gel y se visualizó usando un sistema de imagenología.

La ampliación de la secuencia de apareamiento (fago T4 2) mostró una eficacia de circularización similar a la de un PIE de auto-corte y empalme de fago T4 con una región de apareamiento de 6 nucleótidos (fago T4 1) (FIG. 13). Estos datos indican que la circularización no se vio alterada por la extensión de la secuencia de apareamiento en la PIE de auto-corte y empalme del fago T4.

Ejemplo 8: Expresión de proteínas a partir de ARN circular generado por PIE de auto-corte y empalme de fago T4 con una región de apareamiento ampliada

Este ejemplo describe la expresión de ARN circular generado por el PIE de auto-corte y empalme del fago T4 con una región de apareamiento ampliada.

Para comparar la expresión de proteínas, se diseñan constructos de ADN con PIE de fago T4 con una región de apareamiento de 2 nucleótidos (fago T4 1) y secuencias de apareamiento extendidas (fago T4 2), como se describe en el Ejemplo 7. En este ejemplo, los constructos se diseñan para que incluyan poliA50 como elemento espaciador, y una combinación de un EMCV IRES y Gluc ORF como carga de polinucleótidos.

El ARN lineal se sintetiza mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 en presencia de 7,5 mM de NTP. El ADN plantilla se elimina tratándolo con DNasa. El ARN lineal sintetizado se purifica con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050). El ARN circular que codifica Gluc se purifica mediante Urea PAGE, se eluye en un tampón (0,5 M de acetato sódico, 0,1% de SDS, 1 mM de EDTA), se precipita con etanol y se vuelve a suspender en agua libre de ARNasa.

Para comparar la expresión del ARN circular que codifica Gluc, se preparan ARN circulares generados por el PIE del fago T4 con una región de apareamiento de 2 nucleótidos (fago T4 1) y el PIE del fago T4 con una región de apareamiento ampliada (fagoT4 2), como se ha descrito anteriormente. Las células HeLa (10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos) se transfectan con 0,1 pmoles de ARN circulares purificados usando el agente de transfección LIPOFECTAMINE® MessengerMAX (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los

transfectantes se preparan para cada punto temporal por separado. Se recogen los medios de cultivo a las 6, 24 y 48 horas. Para medir la actividad de Gluc, el medio celular recogido se transfiere a una placa blanca de 96 pocillos y se usa un sistema de ensayo reportero bioluminiscente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La placa se lee en un luminómetro.

Ejemplo 9: Diseño de un constructo de intrón-exón permutado (PIE) de auto-corte y empalme con región de apareamiento ampliada

Este ejemplo describe el diseño de varias secuencias de intrón-exón permutado (PIE) de auto-corte y empalme con región de apareamiento ampliada para proporcionar una mejor eficiencia de circularización.

En las FIGS. 14A y FIG. 14B se proporcionan esquemas que representan diseños ejemplares de constructos de ADN. En este ejemplo, los constructos incluyen, de 5' a 3': una mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del grupo I (mitad 3'-intrón), un sitio de corte y empalme 3', un fragmento de exón 3' (E2), un elemento espaciador, una carga de polinucleótidos, un fragmento de exón 5' (E1), un sitio de corte y empalme 5', y una mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del grupo I (mitad 5'-intrón).

Los diferentes intrones del grupo I tienen diferentes longitudes de secuencia complementaria (FIG. 19). Por ejemplo, E2 de Synechococcus elongatus PCC 6301 tiene una secuencia complementaria de 7 nucleótidos para E1 de Synechococcus elongatus PCC 6301; E2 de Anabaena azollae, Anabaena cylindrica, y Scytonema hofmanni tienen 5 nucleótidos de secuencias complementarias para E1 de Anabaena azollae, Anabaena cylindrica, y Scytonema hofmanni, respectivamente. Para generar un constructo que tenga una región de apareamiento ampliada entre E2 y E1, se mutaron secuencias en E2 para tener una región de apareamiento ampliada con E1 como se describe en la FIG. 19. La región de apareamiento total del intrón-exón permutado (PIE) del grupo I con una región de apareamiento ampliada tiene 17 nucleótidos.

Las regiones de apareamiento original (1) y ampliada (2) de la FIG. 19 son las siguientes:

Synechococcus 1 TCCGCTGACTGTAAAGG (SEQ ID NO: 92)
Synechococcus 2 TCCGCTGCGTCTACCGT (SEQ ID NO: 93)
Anabaena azollae 1 TCCGTTGACTGTAAAAA (SEQ ID NO: 94)
Anabaena azollae 2 TCCGTAGCGTCTACCAT (SEQ ID NO: 95)
Anabaena cylindrica 1 TCCGTTGACCTTAAACG (SEQ ID NO: 96)
Anabaena cylindrica 2 TCCGTAGCGTCTACCAT (SEQ ID NO: 97)
Scytonema 1 CCCGAAGGTCAGTGGTT (SEQ ID NO: 98)
Scytonema 2 CCCGACGAGCTACCAGG (SEQ ID NO: 99)

Las estructuras de ARN se estimaron mediante la herramienta de predicción de estructuras de ARN, RNA fold (rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi). La ampliación de la interacción E2-E1 se generó modificando los resultados de la secuencia en la interacción adecuada E2-E1 y la estructura condensada del intrón de auto-corte y empalme (FIGS. 15A-15B, 16A-16B, 17A-17B, y 18A-18B).

Se diseñaron constructos que tienen la PIE con una región de apareamiento original y secuencias de apareamiento con una región de apareamiento ampliada para comparar la eficacia de la circularización. Para la comparación, también se usaron los constructos Anabaena 1 y Anabaena 2. En este ejemplo, los constructos se diseñaron para que incluyesen un elemento espaciador y una combinación de un IRES EMCV y un ORF de 3822 nucleótidos como carga de polinucleótidos. El tamaño del ARN circular era de 4,5 Kb.

El ARN lineal no modificado se sintetizó mediante transcripción in vitro usando la ARN polimerasa T7 a partir de una plantilla de ADN en presencia de 12,5mM de NTP. El ADN plantilla se eliminó tratándolo con DNasa durante 20 minutos. El ARN lineal sintetizado se purificó con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050). El auto-corte y empalme se produjo durante la transcripción; no se requirió ninguna reacción adicional. Para controlar la eficacia del auto-corte y empalme, el ARN transcrito *in vitro* purificado en columna se separó en una columna de intercambio aniónico (AEX) mediante HPLC. Se midió el porcentaje de picos lineales y circulares, y la eficiencia de circularización se normalizó con la de los constructos que tienen el PIE con la región de apareamiento original.

La ampliación de la secuencia de apareamiento aumentó la eficiencia de circularización hasta cinco veces para Anabaena (Anabaena 2), Synechococcus elongatus PCC 6301 (Synechococcus 2), y Anabaena cylindrica (Anabaena cyclindrica 2), y hasta diez veces para Anabaena azollae (Anabaena azollae 2), pero no se observó ningún aumento en la eficiencia de circularización para Scytonema hofmanni (Scytonema 2) (FIG. 20). Esto demuestra que la eficiencia de circularización puede aumentarse modificando otros intrones del grupo I usando la misma estrategia o una similar a la descrita en la presente para el intrón de Anabaena.

Ejemplo 10: Diseño de un constructo de intrón-exón permutado (PIE) de auto-corte y empalme de Anabaena con una región madre ampliada para mejorar la interacción extremo a extremo.

Este ejemplo describe el diseño de secuencias de intrón-exón permutado (PIE) de auto-corte y empalme de Anabaena con región madre ampliaida para proporcionar una mejor eficiencia de circularización mediante la mejora de la interacción extremo a extremo.

En la FIG. 21B se proporcionan esquemas que representan diseños ejemplares de constructos de ADN. En este ejemplo, los constructos incluyen, de 5' a 3': una mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del grupo I (mitad 3'-intrón 3' de Anabaena), un sitio de corte y empalme 3', un fragmento de exón 3' (E2 de Anabaena), un elemento espaciador, una carga de polinucleótidos, un fragmento de exón 5' (E1 de Anabaena), un sitio de corte y empalme 5', y una mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del grupo I (mitad 5'-intrón de Anabaena). Se diseñaron dos versiones de constructos que tienen una región madre ampliada. Para el diseño de Anabaena 4, se colocó una región madre adicional (5'-GUAAGUU-3') una al lado de la otra. Para el diseño de Anabaena 5, se rellenó una región abultada en P6b para formar un tallo.

El ARN lineal no modificado se sintetizó mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa T7 a partir de una plantilla de ADN en presencia de 12,5mM de NTP. El ADN plantilla se eliminó tratándolo con DNasa durante 20 minutos. El ARN lineal sintetizado se purificó con un kit de limpieza de ARN (New England Biolabs, T2050). El auto-corte y empalme se produjo durante la transcripción; no se requirió ninguna reacción adicional. Para monitorizar la eficacia del auto-corte y empalme, el ARN transcrito *in vitro* purificado en columna se separó en una columna de intercambio aniónico (AEX) mediante HPLC. Se midió el porcentaje de picos lineales y circulares y se normalizó la eficiencia de circularización con la de los constructos originales correspondientes.

Los constructos con una región madre ampliada mostraron una eficiencia de circularización comparable con los constructos que tienen el PIE de Anabaena con una región de apareamiento ampliada (Anabaena 2) y los constructos que tienen el PIE de Anabaena con una región de apareamiento de 5 nucleótidos (Anabaena 1) (FIG.22).

Synechococcus elonatus PCC 6301: mitad 3'-intrón E2

TAAACAACTAACAGCTTTAGAAGGTGCAGAGACTAGACGGGAGCTACCCTAACGGATTCAGCCGAG
GGTAAAGGGATAGTCCAATTCTCAACATCGCGATTGTTGATGGCAGCGAAAGTTGCAGAGAGAATGA
AAATCCGCTGACTGTAAAGGTCGTGAGGGTTCGAGTCCCTCCGCCCCCA (SEQ ID NO: 80)

Synechococcus elongatus PCC 6301: E1 mitad 5'-intrón

ACGGTAGACGCAGCGGACTTAGAAAACTGGGCCTCGATCGCGAAAGGGATCGAGTGGCAGCTCTCA
AACTCAGGGAAACCTAAAACTTTAAACATTMAAGTCATGGCAATCCTGAGCCAAGCTAAAGC (SEQ ID
NO: 81)

Anabaena azollae: mitad 3'-intrón E2

TTAAACTCAAAATTTAAAATCCCAAATTCAAAATTCCGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTAC
CCTAACGTAAAGCCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCTGAAGTTGCTGAAGCAACAA
GGCAGTAGTGAAAGCTGCGAGAGAATGAAAATCCGTTGACTGTAAAAAGTCGTGGGGGGTTCAAGTC
CCCCCACCCCC (SEQ ID NO: 82)

Anabaena azollae: E1 mitad 5'-intrón

ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTTAAGTGGAAGCTCTCAAA
TTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCAGAAAATTTAGACTTGA
GATTTGATTTTGGAG (SEQ ID NO: 83)

Anabaena cylindrica: mitad 3'-intrón E2

GGCTTTCAATTTGAAATCAGAAATTCAAAATTCAGGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCT
AACGTAAAGGCGAGGGTAAAGGGAGAGTCCAATTCTTAAAGCCTGAAGTTGTGCAAGCAACAAGGC
AACAGTGAAAGCTGTGGAAGAATGAAAATCCGTTGACCTTAAACGGTCGTGGGGGTTCAAGTCCCCC
CACCCCC (SEQ ID NO: 84)

Anabaena cylindrica: E1 mitad 5'-intrón

ATGGTAGACGCTACGGACTTAGAAAACTGAGCCTTGATAGAGAAATCTTTCAAGTGGAAGCTCTCAA ATTCAGGGAAACCTAAATCTGAATACAGATATGGCAATCCTGAGCCAAGCCCGGAAATTTTAGAATCA AGATTTTATTTT (SEQ ID NO: 85)

Scytonema hofmanni: mitad 3'-intrón E2

AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGA CAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGG TCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA (SEQ ID NO: 86)

Scytonema hofmanni: E1 mitad 5'-intrón

AGAAATGGAGAAGGTGTAGAGACTGGAAGGCAGGCACCCTAACGTTAAAGGCGAGGGTGAAGGGA CAGTCCAGACCACAAACCAGTAAATCTGGGCAGCGAAAGCTGTAGATGGTAAGCATAACCCGAAGG TCAGTGGTTCAAATCCACTTCCCGCCACCAAATTAAAAAAACAATAA (SEQ ID NO: 87)

Anabaena 4: mitad 3'-intrón E2

AACAACAGATAACTTACTAACTTACAGCTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAA CGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGG AGAATGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA (SEQ ID NO: 88)

Anabaena 4: E1 mitad 5'-intrón

AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAG GGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTTAG TAAGTT (SEQ ID NO: 89)

Anabaena 5: mitad 3'-intrón E2

AACAACAGATAACTTACTAGTTACTAGTCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCGGGAGAA TGAAAATCCGTAGCGTCTAAACGGTCGTGTGGGTTCAAGTCCCTCCACCCCCA (SEQ ID NO: 90)

Anabaena 5: E1 mitad 5'-intrón

AGACGCTACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAGAGAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAG GGAAACCTAAATCTAGCTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT (SEQ ID NO: 91)

REIVINDICACIONES

1. Un polirribonucleótido lineal que tiene la fórmula 5'-(A)-(B)-(C)-(D)-(E)-(F)-(G)-3', en donde:

(A) comprende una mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I;
(B) comprende un sitio de corte y empalme 3';
(C) comprende un fragmento de exón 3';
(D) comprende una carga de polirribonucleótido;
(E) comprende un fragmento de exón 5';
(F) comprende un sitio de corte y empalme 5'; y
(G) comprende la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I;
y en donde (A), (B) o (C) comprende una primera región de apareamiento que comprende de 8 a 50 ribonucleótidos y (E), (F) o (G) comprende una segunda región de apareamiento que comprende de 8 a 50 ribonucleótidos,
en donde la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento tienen una complementariedad del 80% al 100%, o
la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento comprenden de cero a 10 pares de bases mal apareadas.

2. El polirribonucleótido lineal de la reivindicación 1, en donde:

i) (A) o (C) comprende la primera región de apareamiento y (E) o (G) comprende la segunda región de apareamiento; y/o
ii) el fragmento del exón 3' de (C) comprende la primera región de apareamiento y el fragmento del exón 5' de (E) comprende la segunda región de apareamiento; o la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) comprende la primera región de apareamiento y el fragmento del exón 5' de (E) comprende la segunda región de apareamiento; y/o
iii) la primera región de apareamiento comprende de 10 a 30, de 10 a 20 o de 10 a 15 ribonucleótidos, y la segunda región de apareamiento comprende de 10 a 30, de 10 a 20 o de 10 a 15 ribonucleótidos; y/o
iv) la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) proceden de un gen pre-ARNt-Leu de la cianobacteria Anabaena, o de un pre-ARNt de Tetrahymena.

3. El polirribonucleótido lineal de la reivindicación 1 o 2, en donde la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento:

i) tiene una complementariedad del 90% al 100%; o
ii) comprenden de cero o un par de bases mal apareadas; y/o
iii) son 100% complementarias.

4. El polirribonucleótido lineal de la reivindicación 1:

i) en donde la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) proceden de un gen de pre-ARNt-Leu de Cyanobacterium Anabaena,

y en donde el fragmento de exón 3' de (C) comprende la primera región de apareamiento y el fragmento de exón 5' de (E) comprende la segunda región de apareamiento;
opcionalmente, en donde la primera región de apareamiento comprende de 10 a 15 ribonucleótidos y la segunda región de apareamiento comprende de 10 a 15 ribonucleótidos; o

ii) en donde la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (G) proceden de un pre-ARNr de Tetrahymena,

y en donde la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del grupo I de (A) comprende la primera región de apareamiento y el fragmento del exón 5' de (E) comprende la segunda región de apareamiento;
opcionalmente, en donde la primera región de apareamiento comprende de 10 a 16 ribonucleótidos y la segunda región de apareamiento comprende de 10 a 16 ribonucleótidos; o
iii) en donde la mitad 3' del fragmento de intrón catalítico del grupo I de (A) y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del grupo I de (G) proceden de un gen td de fago T4, y en donde el fragmento de exón 3' de (C) comprende la primera región de apareamiento y la mitad 5' del fragmento de intrón catalítico del grupo I de (G) comprende la segunda región de apareamiento;
opcionalmente, en donde la primera región de apareamiento comprende de 2 a 16 ribonucleótidos y la segunda región de apareamiento comprende de 2 a 16 ribonucleótidos.

5. El polirribonucleótido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:

i) la mitad 3' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (A) es el extremo terminal 5' del polinucleótido lineal; y/o
ii) la mitad 5' del fragmento del intrón catalítico del Grupo I de (G) es el extremo terminal 3' del polirribonucleótido lineal; y/o
iii) el polirribonucleótido lineal no comprende otra región de apareamiento; y/o
iv) el polirribonucleótido lineal no comprende una región de apareamiento 3' para (A) que comprenda complementariedad de ácido nucleico parcial o completa con una región de apareamiento 5' a (G); y/o
v) la carga de polirribonucleótido de (D) comprende una secuencia de expresión, una secuencia no codificante, o una secuencia de expresión y una secuencia no codificante; y/o
vi) la carga de polirribonucleótido de (D) comprende una secuencia de expresión que codifica un polipéptido; y/o
vii) la carga de polirribonucleótido de (D) comprende un IRES enlazado operativamente con una secuencia de expresión que codifica un polipéptido; y/o
viii) la carga de polirribonucleótido de (D) comprende una secuencia de expresión que codifica un polipéptido que tiene un efecto biológico en un sujeto.

6. El polirribonucleótido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polirribonucleótido lineal comprende además:

i) una primera región espaciadora entre el fragmento de exón 3' de (C) y la carga de polirribonucleótido de (D); y/o
ii) una segunda región espaciadora entre la carga de polirribonucleótido de (D) y el fragmento de exón 5' de (E); preferiblemente, en donde cada región espaciadora tiene una longitud de por lo menos 5 ribonucleótidos; y más preferiblemente, en donde cada región espaciadora tiene una longitud de entre 5 y 500 ribonucleótidos.

7. El polirribonucleótido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 6, en donde la primera región espaciadora, la segunda región espaciadora, o la primera región espaciadora y la segunda región espaciadora comprenden una secuencia poliA; o una secuencia poliA-C.

8. El polirribonucleótido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde:

i) el polirribonucleótido lineal tiene una longitud de 300 a 20.000 ribonucleótidos; y/o
ii) el polirribonucleótido lineal tiene por lo menos 1.000 ribonucleótidos de longitud; opcionalmente, en donde el polirribonucleótido lineal tiene por lo menos 3.000 ribonucleótidos de longitud.

9. Un vector de ADN que comprende un promotor de ARN polimerasa enlazado operativamente con una secuencia de ADN que codifica el polirribonucleótido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

10. Un polirribonucleótido circular producido a partir del polirribonucleótido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 1-8i) o del vector de ADN de la reivindicación 9.

11. Un polirribonucleótido circular que comprende una unión de corte y empalme que une un fragmento de exón 5' y un fragmento de exón 3',

en donde el fragmento de exón 3' comprende una primera región de apareamiento que comprende de 8 a 50 ribonucleótidos, y el fragmento de exón 5' comprende una segunda región de apareamiento que comprende de 8 a 50 ribonucleótidos,
y en donde la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento comprenden una complementariedad del 80% al 100%, o la primera región de apareamiento y la segunda región de apareamiento comprenden de cero a 10 pares de bases mal apareadas.

12. El polirribonucleótido circular de la reivindicación 11, en donde el polirribonucleótido circular comprende además una carga de polirribonucleótido;

i) preferiblemente, en donde la carga de polirribonucleótido comprende una secuencia de expresión, una secuencia no codificante o una combinación de una secuencia de expresión y una secuencia no codificante; y
ii) más preferiblemente, en donde la carga de polirribonucleótido comprende una secuencia de expresión que codifica un polipéptido; y
iii) más preferiblemente, en donde el polirribonucleótido comprende un IRES enlazado operativamente a una secuencia de expresión que codifica un polipéptido; y
iv) más preferiblemente, en donde el polirribonucleótido circular comprende además una región espaciadora entre el IRES y el fragmento de exón 3' o el fragmento de exón 5'; y
v) más preferiblemente, en donde la región espaciadora tiene por lo menos 5 ribonucleótidos de longitud; y
vi) más preferiblemente, la región espaciadora tiene una longitud de 5 a 500 ribonucleótidos.

13. El polirribonucleótido circular de cualquiera de las reivindicaciones 12(iv)-(vi), en donde la región espaciadora

comprende una secuencia poliA; o una secuencia poliA-C.

14. El polirribonucleótido circular de cualquiera de las reivindicaciones 11-13:

i) en donde el polirribonucleótido circular tiene por lo menos 500 ribonucleótidos de longitud, opcionalmente en donde el polirribonucleótido circular tiene de 500 a 20.000 ribonucleótidos de longitud; y/o
ii) está producido a partir del polirribonucleótido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o del vector de la reivindicación 9.

15. Un método:

i) para expresar un polipéptido en una célula, el método comprendiendo proporcionar a la célula el polirribonucleótido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el vector de ADN de la reivindicación 9, o el polirribonucleótido circular de cualquiera de las reivindicaciones 10-14; o
ii) para producir un polirribonucleótido circular a partir del polirribonucleótido lineal de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el método comprendiendo proporcionar el polirribonucleótido lineal en condiciones adecuadas para el auto-corte y empalme del polirribonucleótido lineal.

FIG. 1A

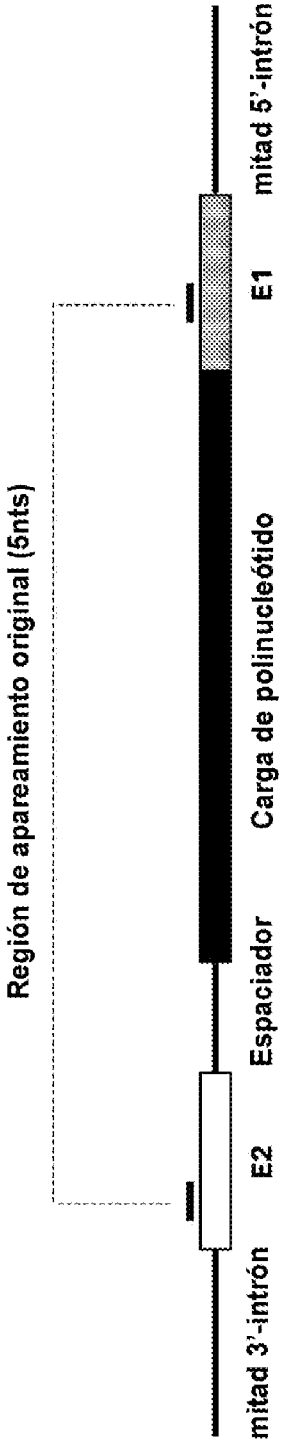

Región de apareamiento original (5nts)
mitad 3'-intrón
E2
Espaciador
Carga de polinucleótido
E1
mitad 5'-intrón

FIG. 1B

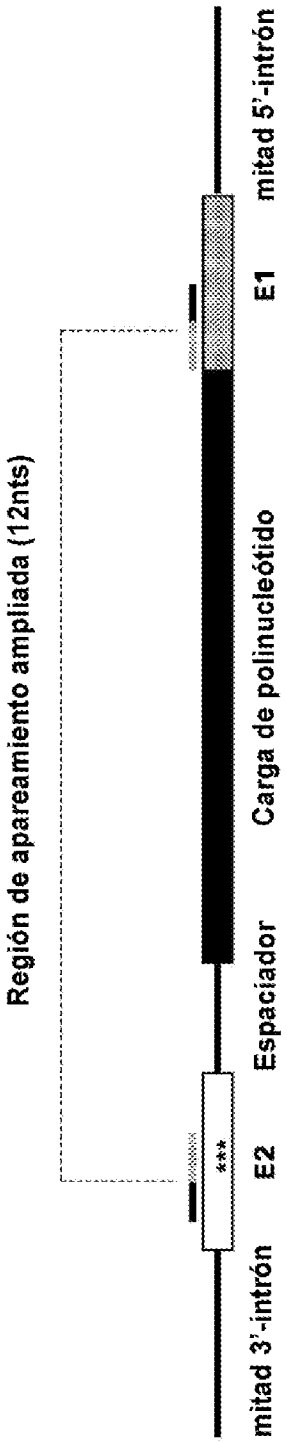

Región de apareamiento ampliada (12nts)
***
mitad 3'-intrón
E2
Espaciador
Carga de polinucleótido
E1
mitad 5'-intrón

FIG. 2A

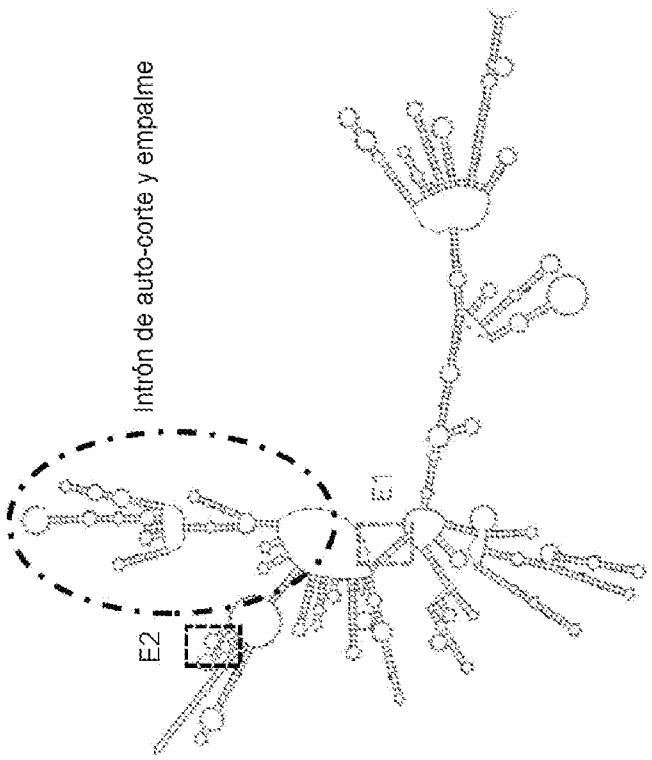

Intrón de auto-corte y empalme
E2
E1

FIG. 2B

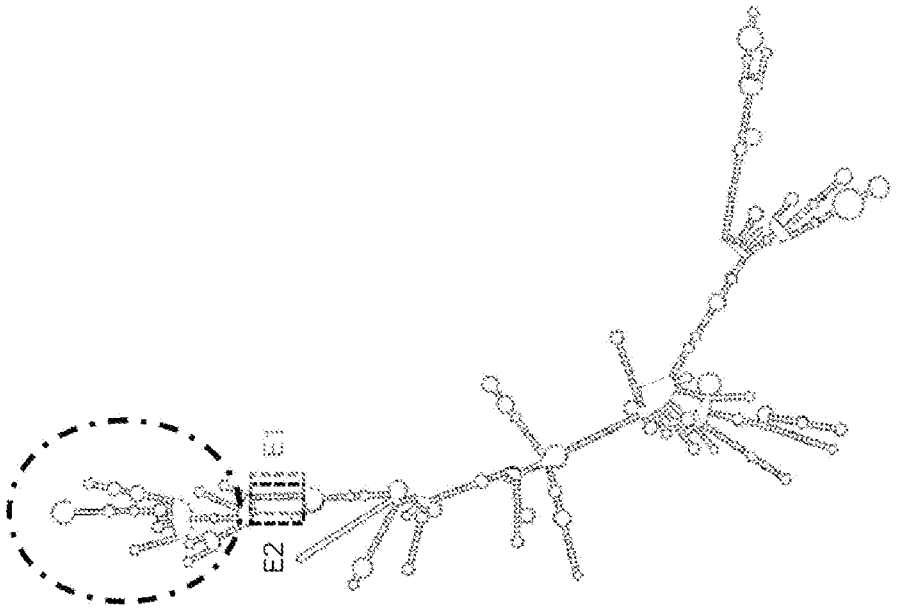

Intrón de auto-corte y empalme
E2
E1

FIG. 3B

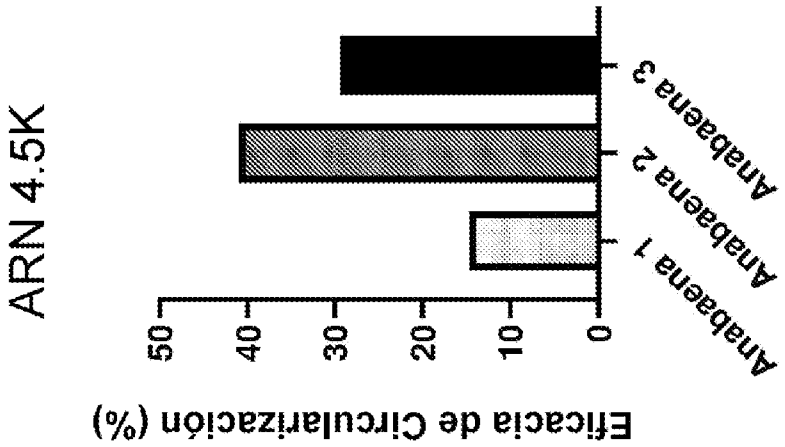

ARN 4.5K
Eficacia de Circularización (%)
0
10
20
30
40
50
Anabaena 1
Anabaena 2
Anabaena 3

FIG. 3A

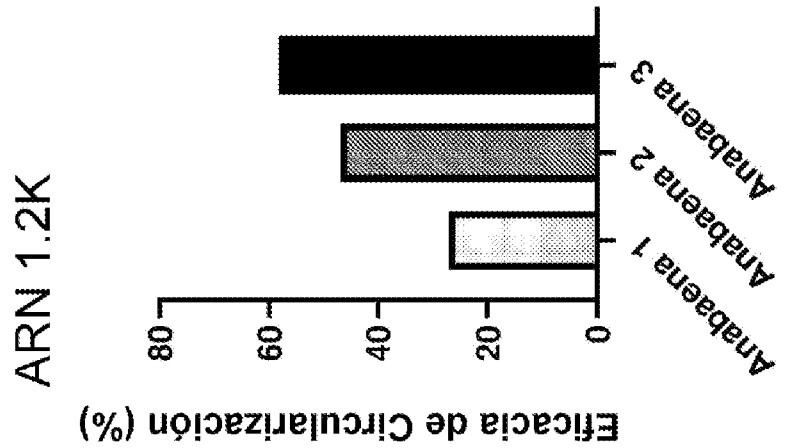

ARN 1.2K
Eficacia de Circularización (%)
0
20
40
60
80
Anabaena 1
Anabaena 2
Anabaena 3

FIG. 4

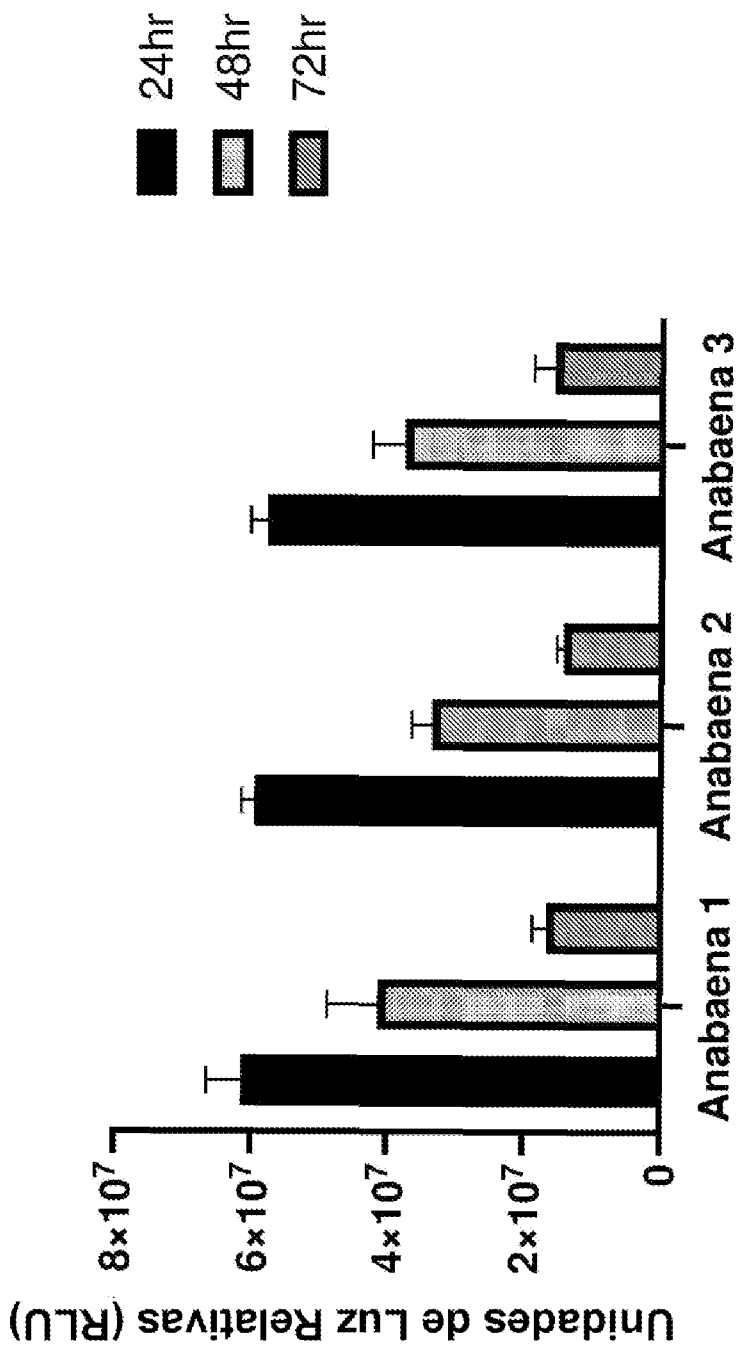

24hr
48hr
72hr
Unidades de Luz Relativas (RLU)
8×10^7
6×10^7
4×10^7
2×10^7
0
Anabaena 1
Anabaena 2
Anabaena 3

FIG. 5

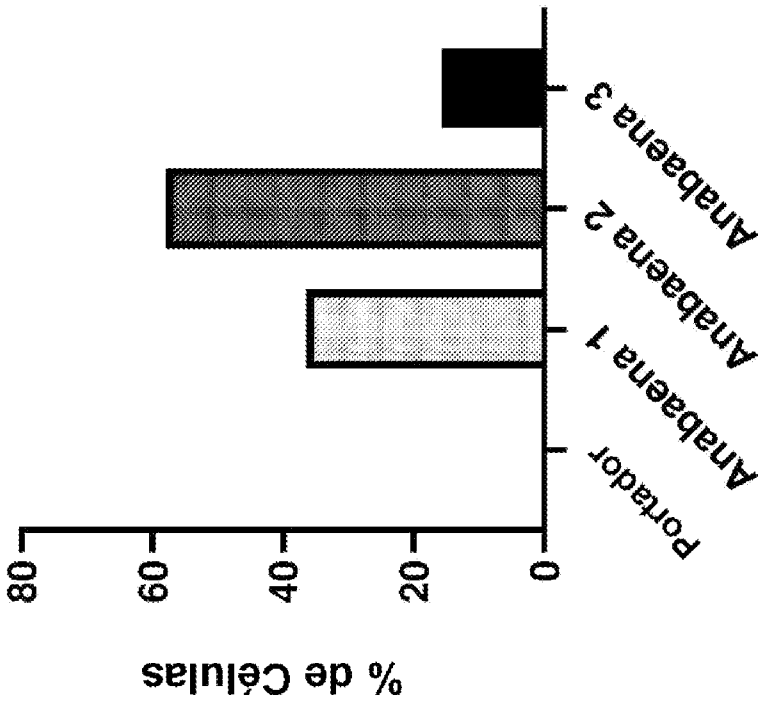

% de Células
0
20
40
60
80
Portador
Anabaena 1
Anabaena 2
Anabaena 3

FIG. 6

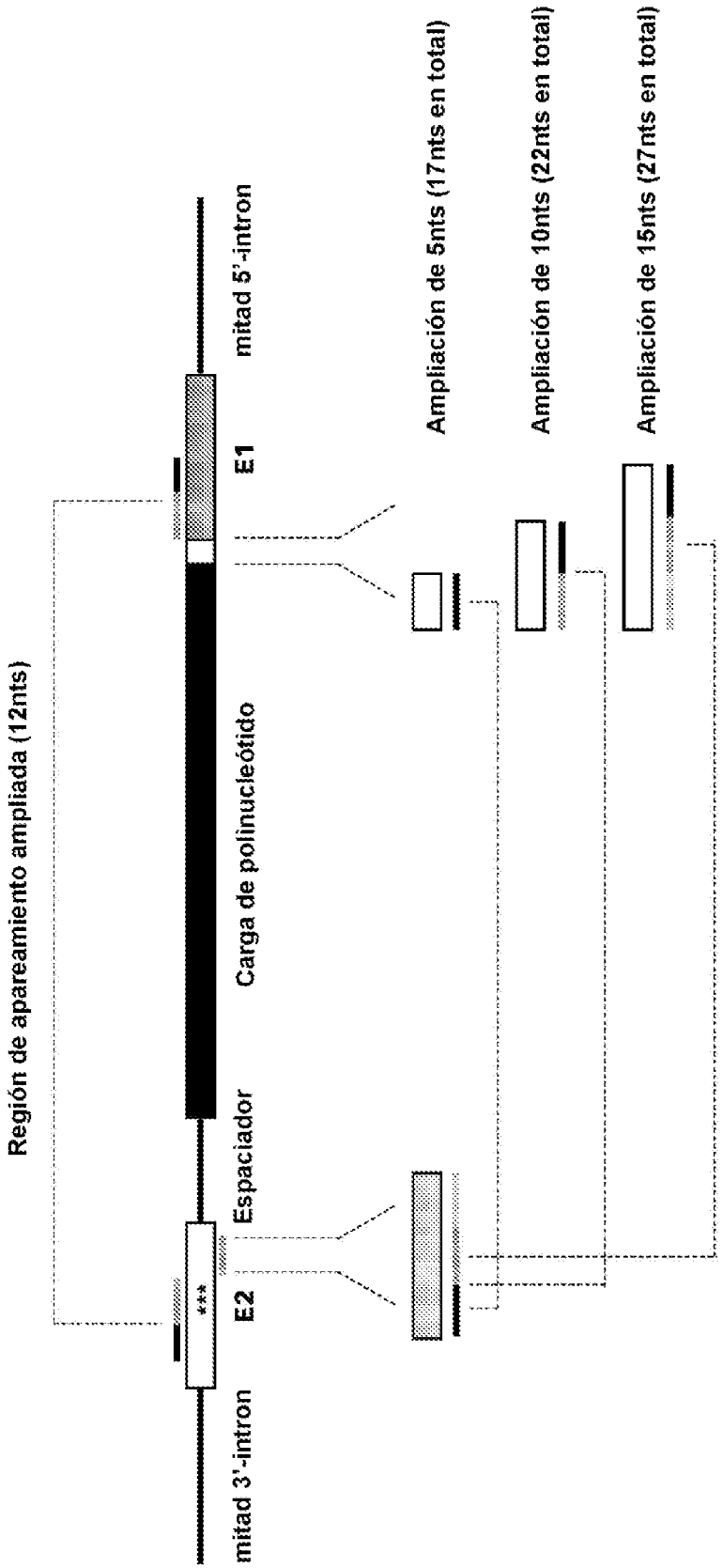

Región de apareamiento ampliada (12nts)
mitad 3'-intron
E2
***
Espaciador
Carga de polinucleótido
E1
mitad 5'-intron
Ampliación de 5nts (17nts en total)
Ampliación de 10nts (22nts en total)
Ampliación de 15nts (27nts en total)

FIG. 7

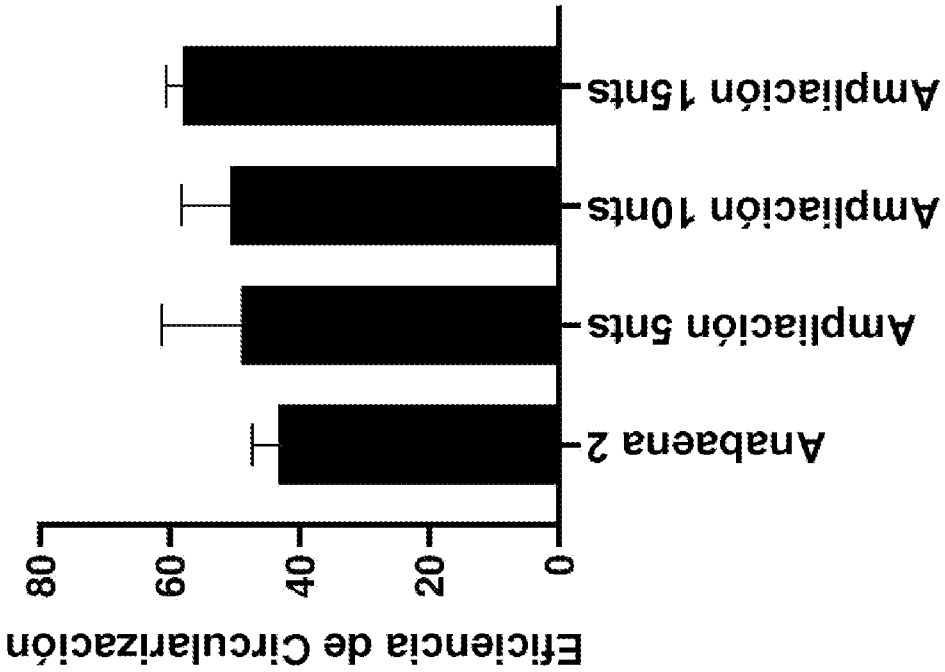

Eficiencia de Circularización
0
20
40
60
80
Anabaena 2
Amplicón 5nts
Amplicón 10nts
Amplicón 15nts

FIG. 8

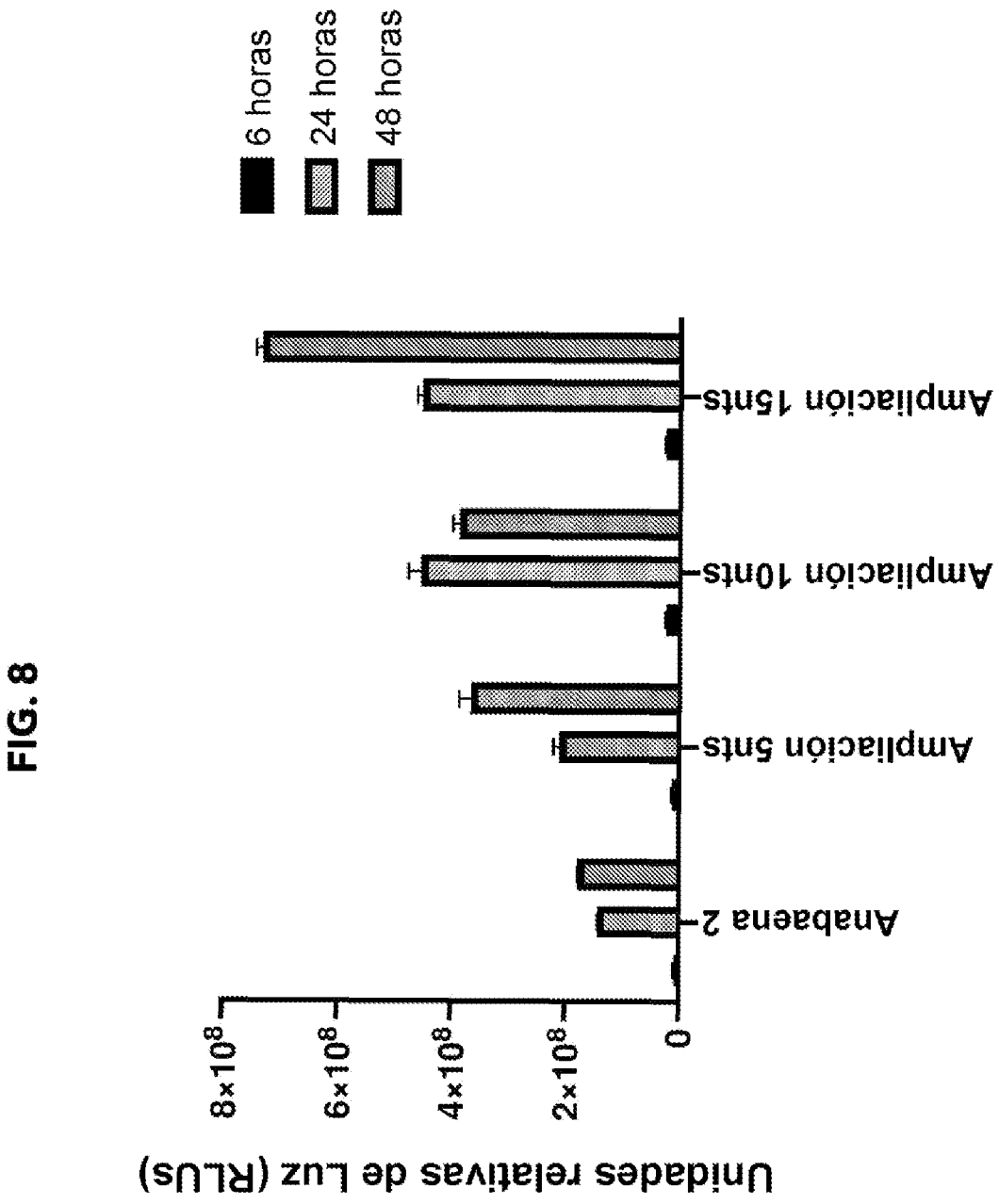

6 horas
24 horas
48 horas
Unidades relativas de Luz (RLUs)
8×10^8
6×10^8
4×10^8
2×10^8
0
Anabaena 2
Ampliación 5nts
Ampliación 10nts
Ampliación 15nts

FIG. 9A

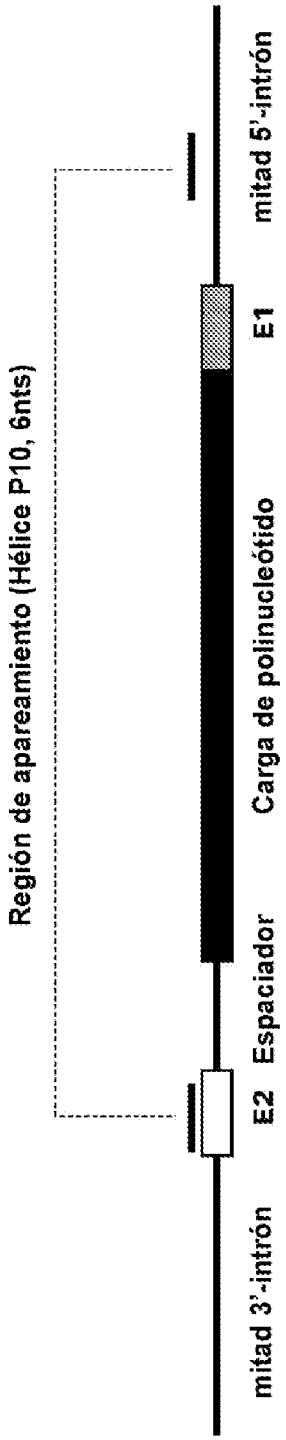

Región de apareamiento (Hélice P10, 6nts)
mitad 3'-intrón
E2
Espaciador
Carga de polinucleótido
E1
mitad 5'-intrón

FIG. 9B

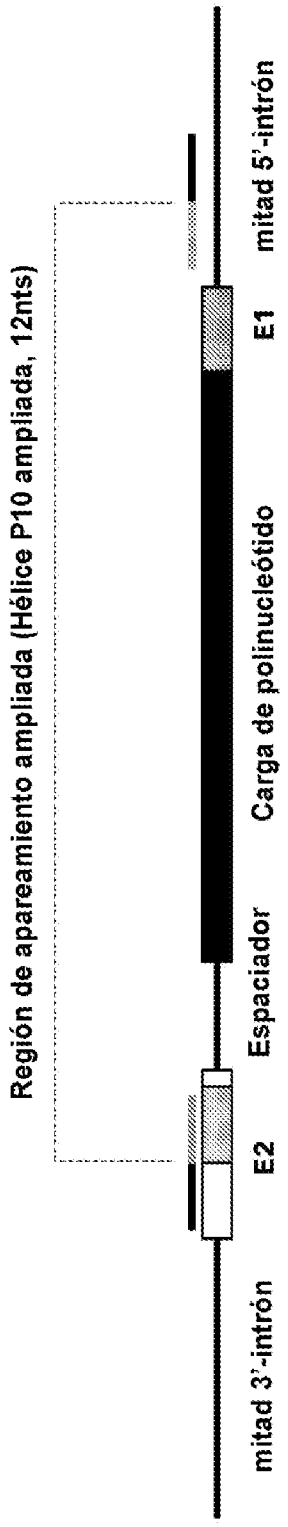

Región de apareamiento ampliada (Hélice P10 ampliada, 12nts)
mitad 3'-intrón
E2
Espaciador
Carga de polinucleótido
E1
mitad 5'-intrón

Fig. 10B

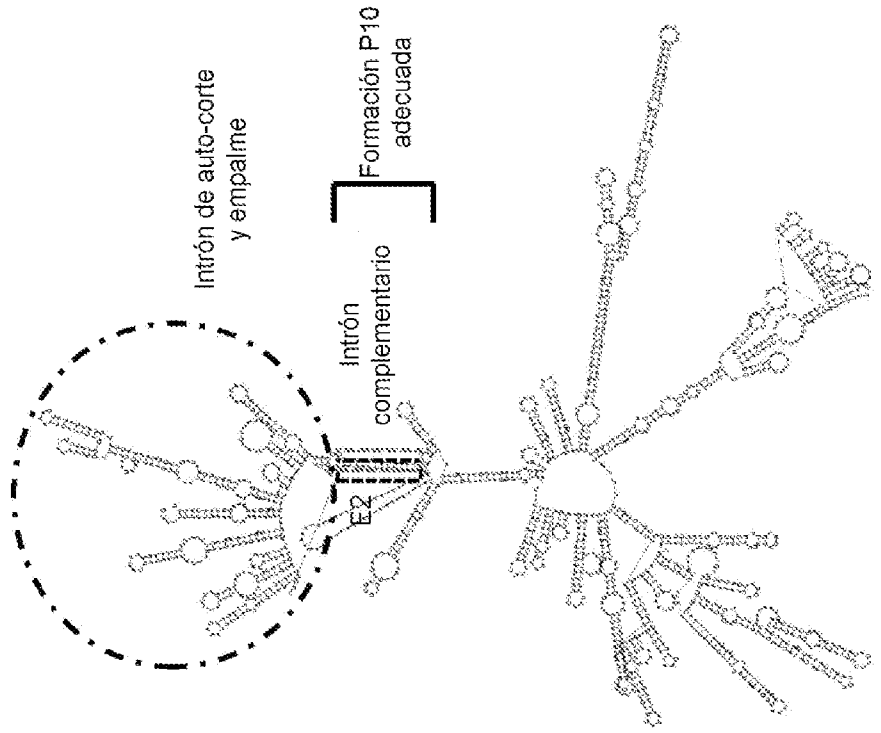


Fig. 10A

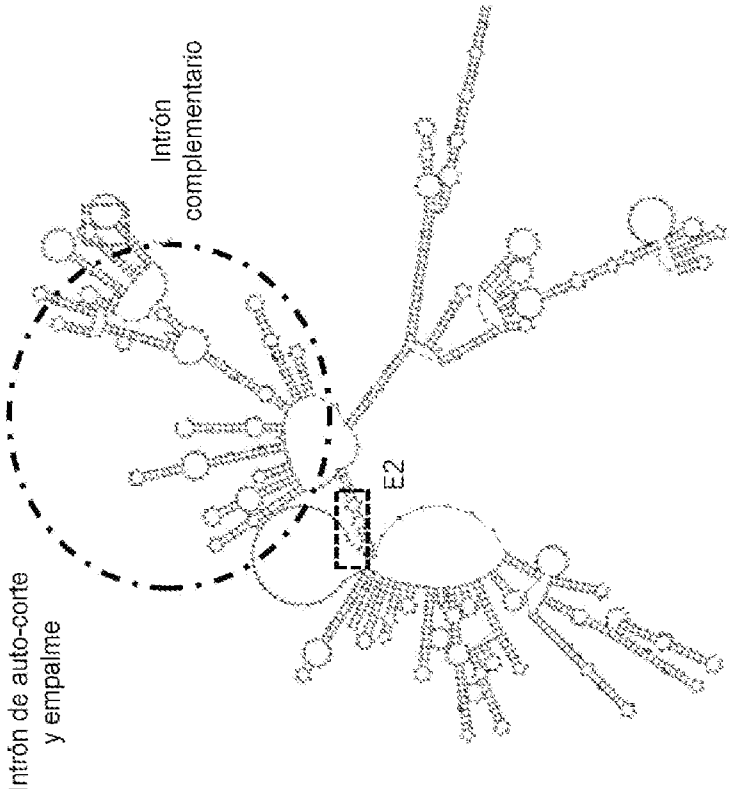


FIG. 11

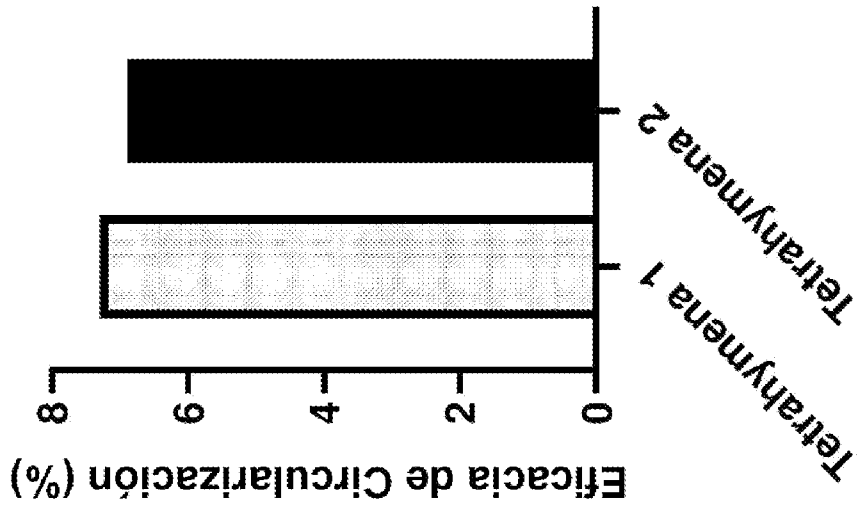

Eficacia de Circularización (%)
0
2
4
6
8
Tetrahymena 1
Tetrahymena 2

FIG. 12A

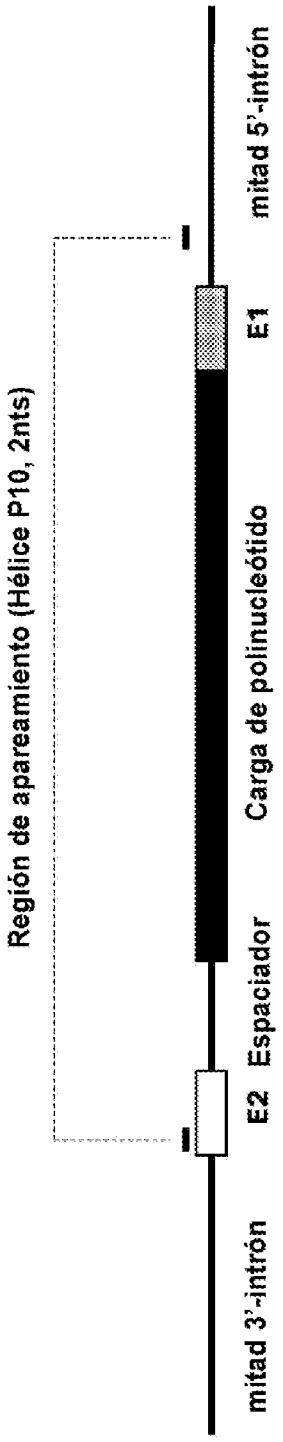


FIG. 12B

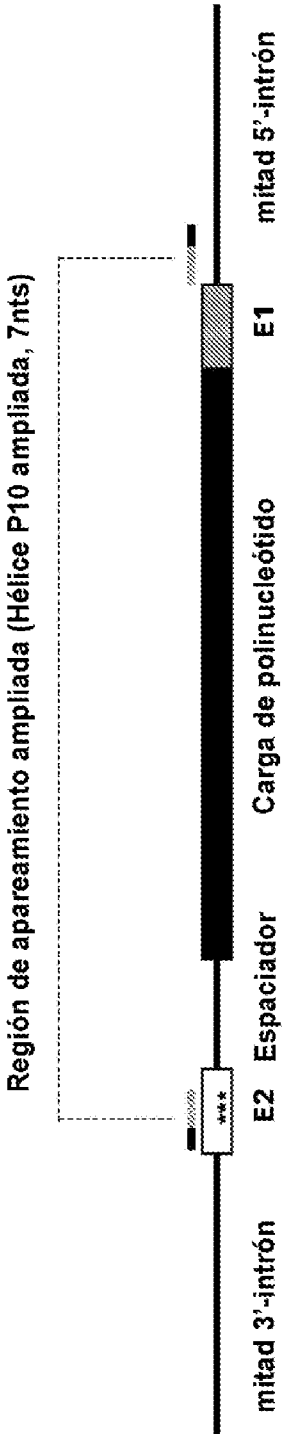


FIG. 13

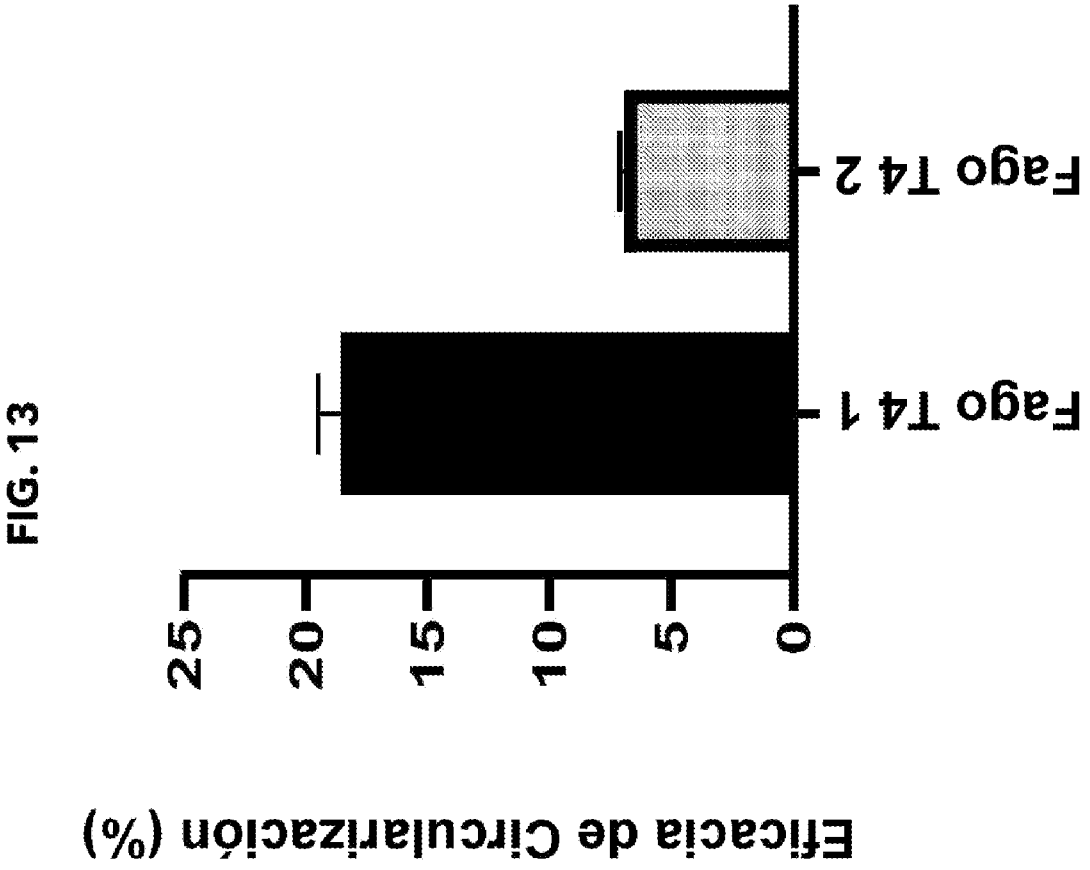


FIG. 14A

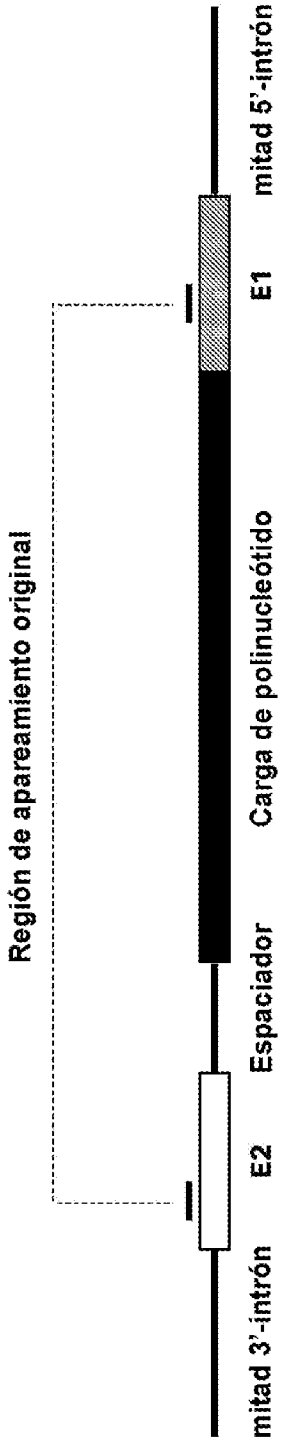


FIG. 14B

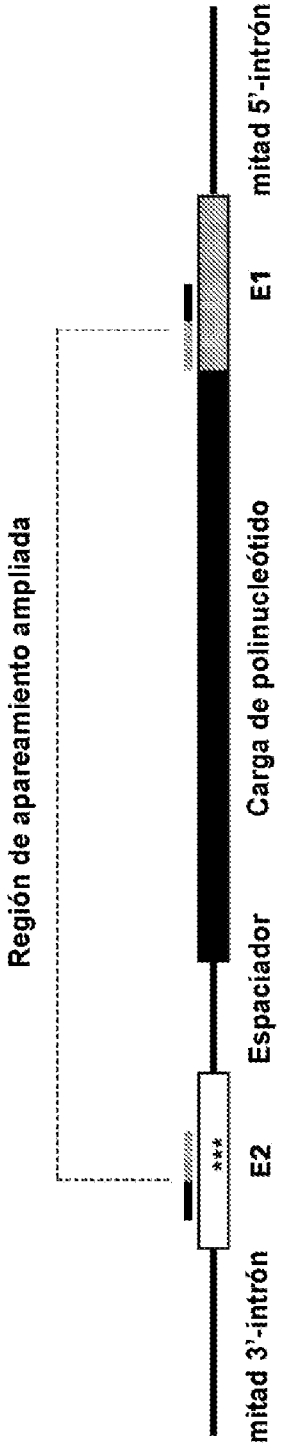


FIG. 15B

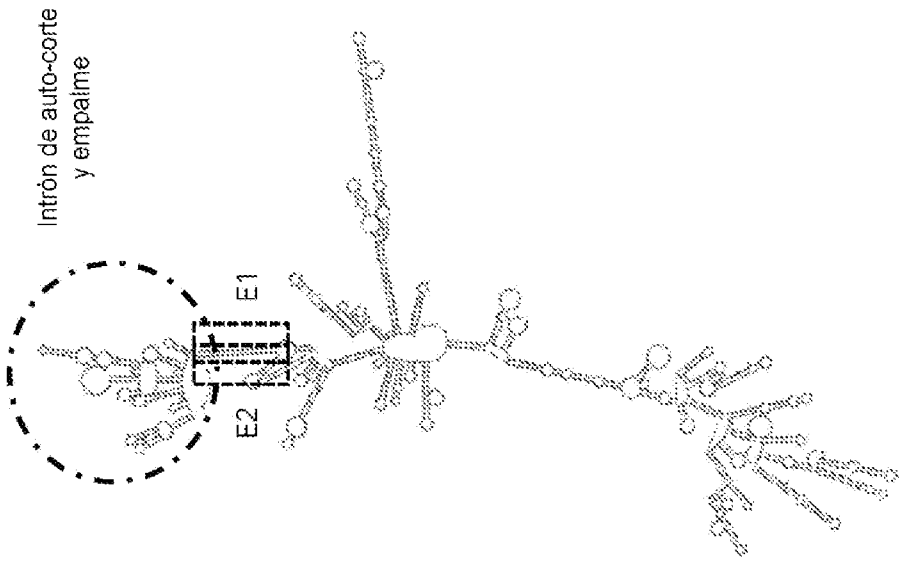


FIG. 15A

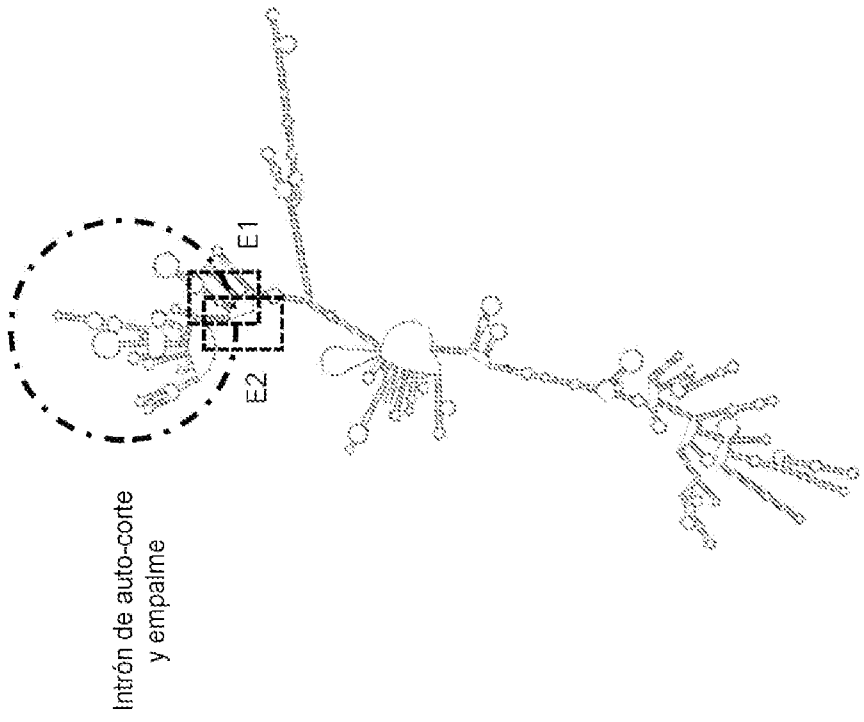


FIG. 16B

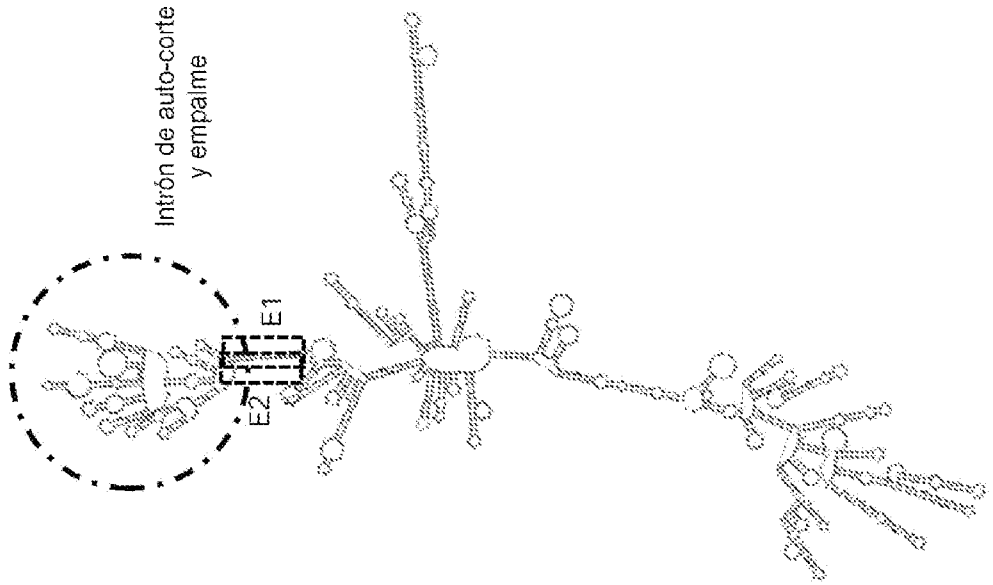


FIG. 16A

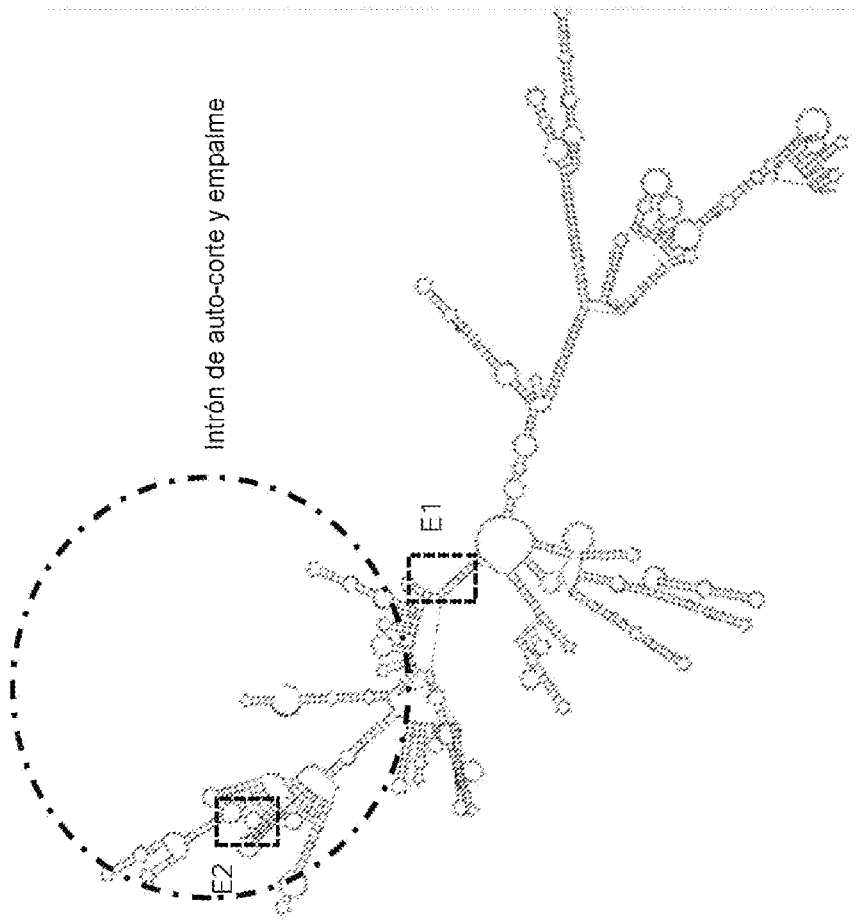


FIG. 17A

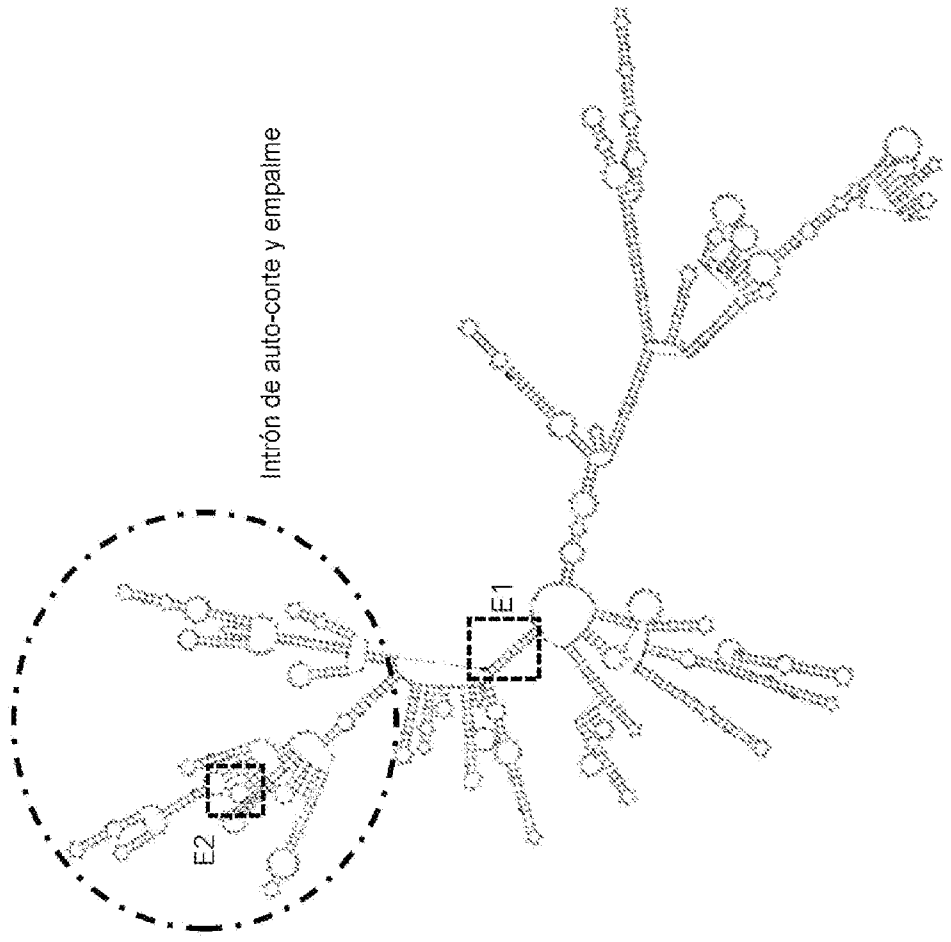
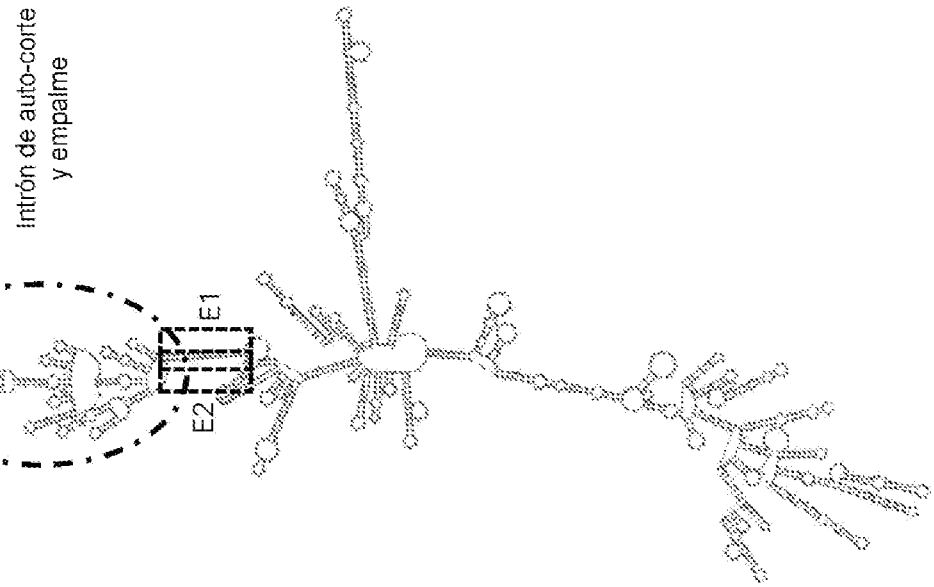


FIG. 17B



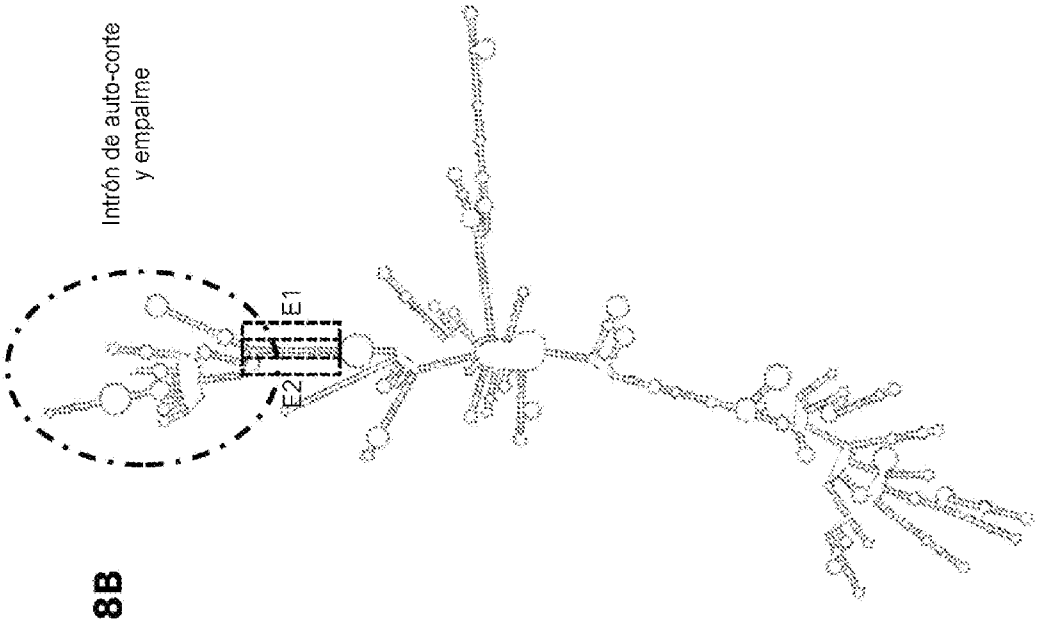


FIG. 18B

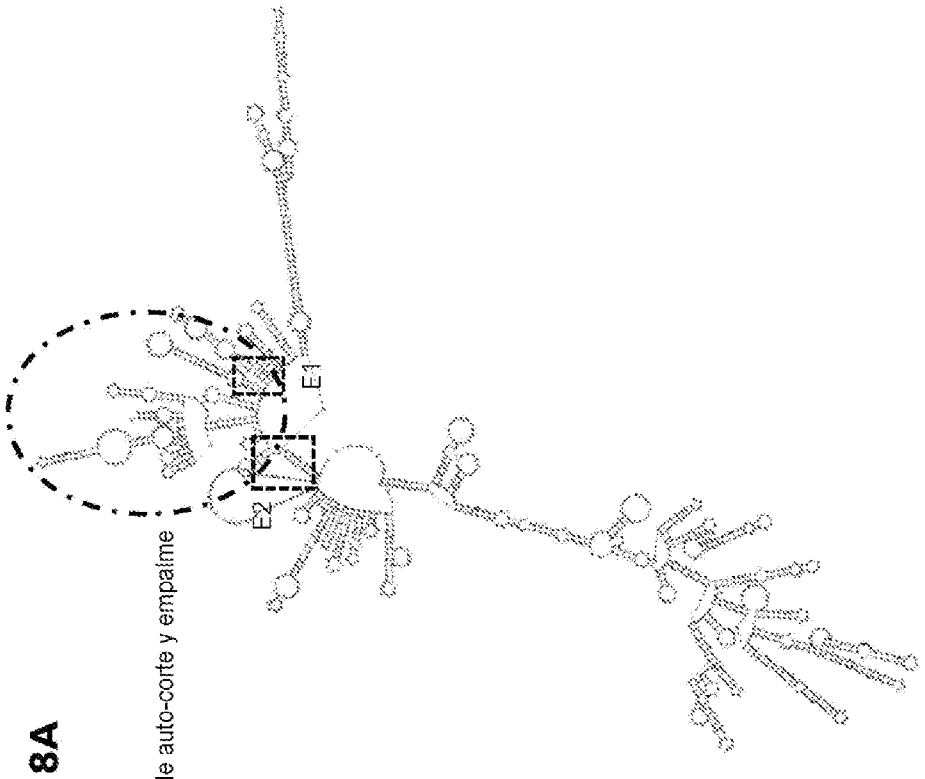


FIG. 18A

FIG. 19

Organismo	Modificación	Original	Ampliado
Synechococcus elongatus	Synechococcus 1 **TCCGCTG**ACTGTAAAGG Synechococcus 2 **TCCGCTG***CG*T*C*TA*CC*G*T*	7nts	17nts
Anabaena azollae	Anabaena azollae 1 **TCCGT**TGACTGTAAAAA Anabaena azollae 2 **TCCGT***A*G*CG*T*C*TA*CC*A*T*	5nts	17nts
Anabaena cylindrica	Anabaena cylindrica 1 **TCCGT**TGACCTTAAACG Anabaena cylindrica 2 **TCCGT***A*G*CGTC*TA*CCAT*	5nts	17nts
Scytonema hofmanni	Scytonema 1 **CCCGA**AGGTCAGTGGTT Scytonema 2 **CCCGA***CGAG*C*TACCAGG*	5nts	17nts

ES 2 994 006 T3

FIG. 20

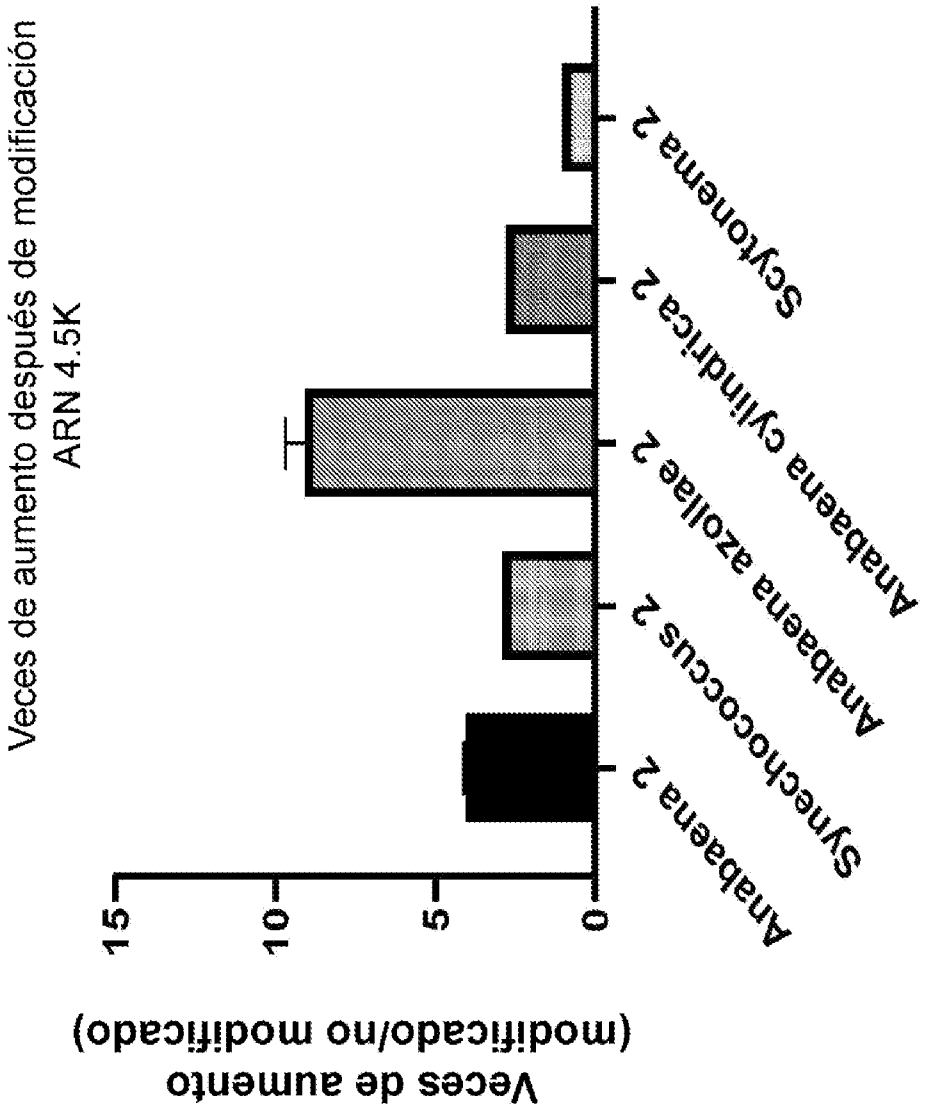

Veces de aumento después de modificación
ARN 4.5K
Veces de aumento
(modificado/no modificado)
15
10
5
0
Anabaena 2
Synechococcus 2
Anabaena azollae 2
Anabaena cylindrica 2
Scytonema 2

FIG. 21A

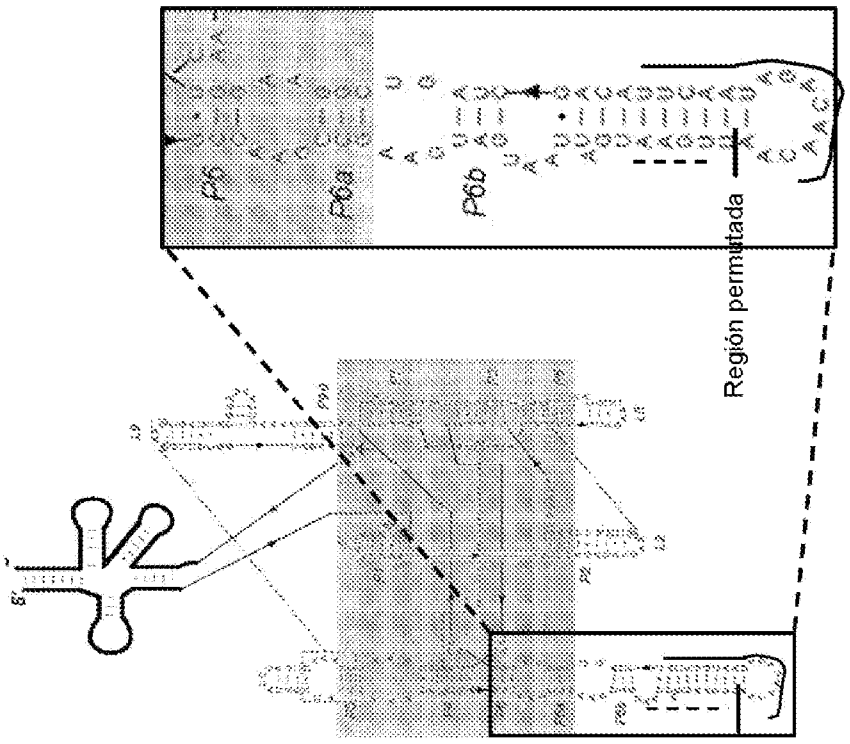


FIG. 21B

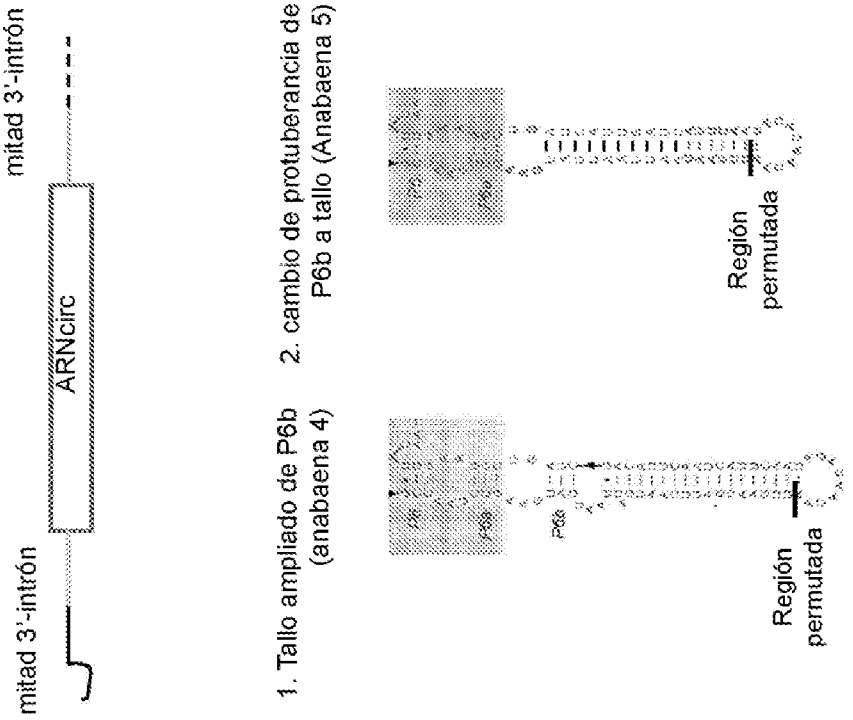
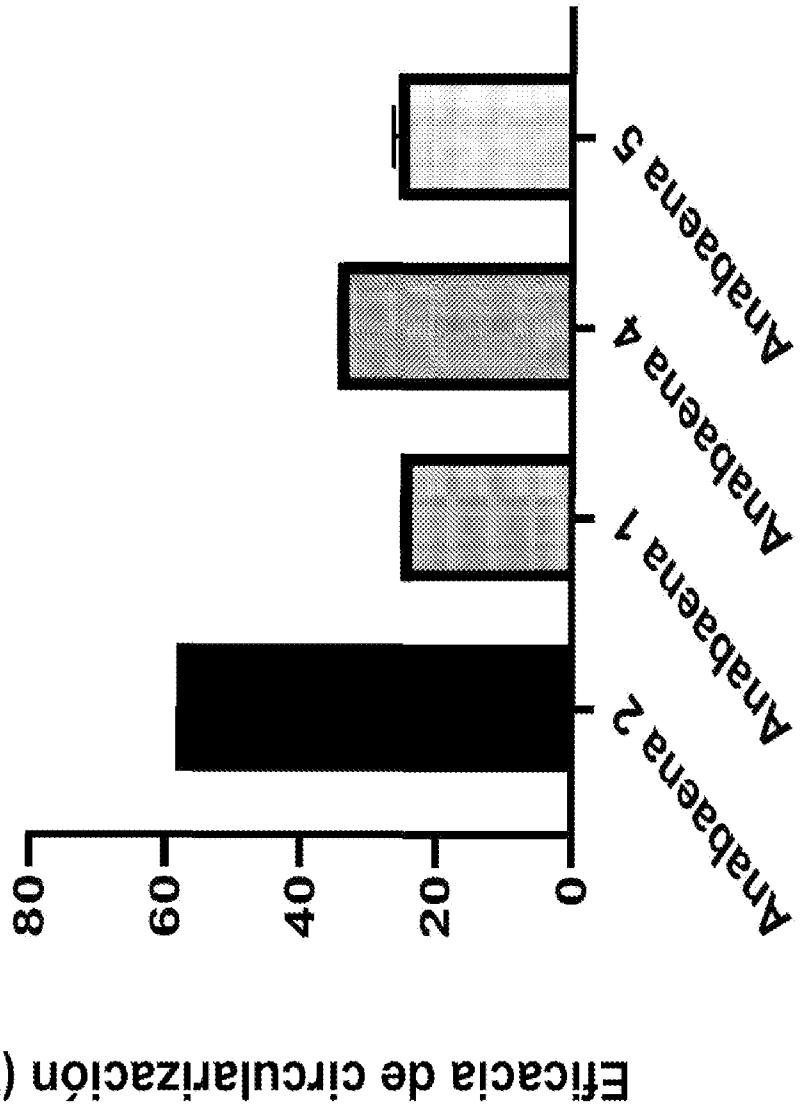


FIG. 22


Eficacia de circularización (%)
0
20
40
60
80
Anabaena 2
Anabaena 1
Anabaena 4
Anabaena 5