

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 005 233**

51 Int. Cl.:

**C07H 19/10** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 31/7115** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2011 E 22173763 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024 EP 4108671**

54 Título: **Nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados, y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**01.10.2010 US 40441310 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.03.2025**

73 Titular/es:

**MODERNATX, INC. (100.00%)  
325 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**SCHRUM, JASON P;  
SIDDIQI, SUHAIB y  
EJEBE, KENECHI**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

Observaciones:

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

ES 3 005 233 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados, y usos de los mismos

## 5 Antecedentes

Los ARN naturales se sintetizan a partir de cuatro ribonucleótidos básicos: ATP, CTP, UTP y GTP, pero pueden contener nucleótidos modificados postranscripcionalmente. Además, se han identificado aproximadamente cien modificaciones de nucleósidos diferentes en el ARN (Rozenski, J, Crain, P y McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: 1999 update (La base de datos de modificación de ARN: actualización de 1999). Nucl Acids Res 27: 196-197). Sin embargo, no está claro el papel de las modificaciones de nucleósidos en el potencial inmunostimulador, la estabilidad y la eficiencia de traducción del ARN, y los consiguientes beneficios para mejorar la expresión de proteínas y producir compuestos terapéuticos.

15 Existen múltiples problemas con las metodologías anteriores para efectuar la expresión de proteínas. Por ejemplo, el ácido desoxirribonucleico (ADN) heterólogo introducido en una célula puede ser heredado por las células hijas (ya sea que el ADN heterólogo se haya integrado o no en el cromosoma) o por la descendencia. El ADN introducido puede integrarse en el ADN genómico de la célula huésped con cierta frecuencia, lo que resulta en alteraciones y/o daño al ADN genómico de la célula huésped. Además, deben producirse múltiples etapas antes de que se produzca una proteína. Una vez dentro de la célula, el ADN debe transportarse al núcleo donde se transcribe en ARN. El ARN transcrito a partir del ADN debe a continuación entrar en el citoplasma donde se traduce en proteína. Esta necesidad de múltiples etapas de procesamiento crea tiempos de retraso antes de la generación de una proteína de interés. Además, es difícil obtener la expresión de ADN en las células; con frecuencia, el ADN entra en las células pero no se expresa o no se expresa a velocidades o concentraciones razonables. Esto puede ser un problema particular cuando se introduce ADN en células tales como células primarias o líneas celulares modificadas.

Hay una necesidad en la técnica de modalidades biológicas para abordar la modulación de la traducción intracelular de ácidos nucleicos.

30 El documento WO 2007/024708 A2 se refiere al ARN que comprende determinados nucleósidos modificados, particularmente la pseudouridina, que se descubrió que reduce la inmunogenicidad del ARN.

## Compendio

35 La presente invención proporciona un ARNm que comprende 1-metil-pseudouridina para su uso como medicamento, en donde el 100% de los nucleótidos que comprenden uracilo en el ARNm se sustituyen por nucleótidos que comprenden N1-metil-pseudouridina.

40 Otros aspectos de la invención se proporcionan en las reivindicaciones.

Los nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados pueden mostrar una respuesta inmunitaria innata reducida cuando se introducen en una población de células, tanto *in vivo* como *ex vivo*. Estos nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados pueden interrumpir la unión de un componente asociado que interactúa con el surco mayor con el ácido nucleico. Debido a la inmunogenicidad reducida y la disminución de las interacciones del surco mayor, estos nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados pueden ser más eficaces durante la producción de proteínas que, por ejemplo, los ácidos nucleicos no modificados.

50 La 1-metil-pseudouridina puede interrumpir la unión de un componente asociado de unión al surco mayor con el ARNm.

La presente descripción proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden

55 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. En esta invención se describen procedimientos y materiales; también pueden utilizarse otros procedimientos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones.

60 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y figuras, y a partir de las reivindicaciones.

## Breve descripción de los dibujos

Las **Fig. 1A y 1B** representan imágenes de geles de agarosa no desnaturalizantes de cada ARN modificado transcrito *in vitro*.

5

Las **Fig. 2A y 2B** representan imágenes de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* con cada ARNmod indicado que codifica G-CSF humano y la línea indica un nivel de saturación del límite máximo detectable de G-CSF secretado en el ensayo.

10

Las **Fig. 3A-N** representan gráficos lineales de una serie de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) secretado a partir de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* en diferentes momentos con cada ARNmod que codifica G-CSF humano indicado en las dosis indicadas. La línea indica un nivel de saturación del límite máximo detectable de G-CSF secretado en el ensayo.

15

Las **Fig. 4A y 4B** representan gráficos de barras de una serie de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) celular endógeno humano secretado a partir de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* a las 24 horas con cada ARNmod que codifica hu-G-CSF indicado en dosis crecientes.

20

Las **Fig. 4C y 4D** representan gráficos de barras de una serie de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para el interferón- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) celular endógeno humano secretado a partir de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* a las 24 horas con cada ARNmod que codifica hu-G-CSF indicado en dosis crecientes.

25

Las **Fig. 4E y 4F** representan gráficos de barras de una serie de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para el G-CSF humano secretado a partir de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* a las 24 horas con cada ARNmod que codifica hu-G-CSF indicado en dosis crecientes.

30

La **Fig. 5A** es una tabla que muestra los resultados de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para G-CSF humano secretado a partir de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* muestreadas de pocillos individuales en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos de cocultivo 42 horas después de la transfección con 750 ng de cada ARNmod que codifica hu-G-CSF indicado.

35

La **Fig. 5B** representa una imagen de un gel de agarosa de productos de ARNmod de hu-G-CSF por RT-PCR de extractos de células de cocultivo 42 horas después de la transfección de la capa alimentadora de queratinocitos humanos con ARNmod de hu-G-CSF y las células de cultivo de inserción Kasumi-1 y KG-1 no transfectadas.

40

Las **Fig. 5C y 5D** representan gráficos de resultados de un ensayo de proliferación celular inducido por hu-G-CSF-ARNmod de células Kasumi-1 (Fig. 5C) y KG-1 (Fig. 5D) normalizadas a células no transfectadas. Se indica la identidad del ARNmod de hu-G-CSF transfectado en células alimentadoras de queratinocitos humanos.

45

Las **Fig. 6A-L** representan gráficos de los espectros de absorbancia UV para moléculas de ARNmod ejemplares que incorporan el nucleótido modificado indicado.

## Descripción detallada

50

El ARNm para uso de la presente invención presenta una respuesta inmunitaria innata reducida cuando se introduce en una población de células. La 1-metil-pseudouridina tiene un grupo -NH(CH)- en la cara del surco principal que interrumpe las interacciones del socio de unión del surco principal, que de otro modo causan respuestas inmunitarias innatas.

55

En general, los ácidos nucleicos exógenos no modificados, particularmente los ácidos nucleicos virales, introducidos en las células inducen una respuesta inmunitaria innata, lo que da como resultado la producción de citocinas e interferón (IFN) y la muerte celular. Sin embargo, es de gran interés para la terapéutica entregar un ARNm dentro de una célula *in vivo* o tal que cause la traducción intracelular del ARNm y la producción de la proteína codificada. De particular importancia es la entrega y la función de un ARNm no integrador, ya que los ácidos nucleicos caracterizados por la integración en una célula diana son generalmente imprecisos en sus niveles de expresión, perjudicialmente transferibles a la progenie y a las células vecinas, y sufren el riesgo sustancial de causar mutación. En esta invención se proporciona en parte ARNm que codifica polipéptidos útiles capaces de modular la función y/o actividad de una célula, y procedimientos para preparar y usar estos. Como se describe en esta invención, este ARNm es capaz de reducir la actividad inmunitaria innata de una población de células en la que se introducen, aumentando así la eficacia de la producción de proteínas en esa

65

población celular. Además, se describen una o más actividades y/o propiedades ventajosas adicionales del ARNm de la presente descripción.

5 Además, estas modificaciones del surco mayor pueden permitir alteraciones, *por ejemplo*, una disminución, en la interacción de los nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados con un componente asociado del surco de unión.

10 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente descripción proporciona el ARNm para su uso según las reivindicaciones anexas.

El ARNm puede comprender otro nucleótido que contiene modificaciones químicas, en donde el nucleótido puede tener una unión alterada con los componentes asociados que interactúan, *por ejemplo*, se unen al surco mayor.

15 En algunas realizaciones, las modificaciones químicas están ubicadas en la cara del surco mayor de la nucleobase, y en donde las modificaciones químicas pueden incluir reemplazar o sustituir un átomo de una nucleobase de citidina con una amina, un SH, un alquilo (*por ejemplo*, metilo o etilo), o un halo (*por ejemplo*, cloro o flúor).

20 En algunas realizaciones, las modificaciones químicas se pueden ubicar en la cara del surco mayor de la nucleobase, y en donde la modificación química pueden incluir reemplazar o sustituir un átomo de una nucleobase de pirimidina con una amina, un SH, un metilo o etilo, o un cloro o flúor.

En algunas realizaciones, las modificaciones químicas pueden ubicarse en el resto de azúcar del nucleótido.

25 En algunas realizaciones, las modificaciones químicas pueden ubicarse en la cadena principal de fosfato del nucleótido.

30 En algunas realizaciones, las modificaciones químicas pueden alterar la electroquímica en la cara del surco mayor del nucleótido.

En algunas realizaciones, el ARNm está comprendido en una composición farmacéutica.

#### Definiciones

35 En varios lugares de la presente memoria descriptiva, los sustituyentes de los compuestos se describen en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que la presente descripción incluya todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de dichos grupos e intervalos. *Por ejemplo*, el término "alquilo C<sub>1-6</sub>" está destinado específicamente a describir individualmente metilo, etilo, alquilo C<sub>3</sub>, alquilo C<sub>4</sub>, alquilo C<sub>5</sub> y alquilo C<sub>6</sub>.

40 Se pretende, además, que los compuestos sean estables. Como se usa en esta invención, el término "estable" se refiere a un compuesto que es lo suficientemente sólido para sobrevivir al aislamiento con un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción y, preferentemente capaz de formularse como un agente terapéutico eficaz.

45 Se aprecia, además, que determinadas características de la presente descripción que, con fines de claridad, se describen en el contexto de distintas realizaciones, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realizaciones. *Por el contrario*, diversas características de la descripción que a efectos de brevedad se describen en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

50 Como se usa en esta invención, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado que es de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo (Me), etilo (Et), propilo (*por ejemplo*, n-propilo e isopropilo), butilo (*por ejemplo*, n-butilo, isobutilo, t-butilo), pentilo (*por ejemplo*, n-pentilo, isopentilo, neopentilo), y similares. Un grupo alquilo puede contener de 1 a alrededor de 20, de 2 a alrededor de 20, de 1 a alrededor de 12, de 1 a alrededor de 8, de 1 a alrededor de 6, de 1 a alrededor de 4, o de 1 a alrededor de 3 átomos de carbono.

55 Como se usa en esta invención, el término "alqueno" se refiere a un grupo alquilo con uno o más enlaces dobles carbono-carbono. Los grupos alqueno de ejemplo incluyen etenilo, propenilo, y similares.

60 Como se usa en esta invención, el término "alcoxi" se refiere a un grupo -O-alquilo. Los grupos alcoxi de ejemplo incluyen metoxi, etoxi, propoxi (*por ejemplo*, n-propoxi e isopropoxi), t-butoxi, y similares.

65 Como se usa en esta invención, el término "alquino" se refiere a un grupo alquilo con uno o más enlaces

triples carbono-carbono. Los grupos alquínico de ejemplo incluyen etínico, propínico, y similares.

5 Como se usa en esta invención, el término "arilo" se refiere a hidrocarburos aromáticos monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, que tienen 2, 3 o 4 anillos fusionados) tales como, por ejemplo, fenilo, naftilo, antracénico, fenantrenilo, indanilo, indenilo, y similares. En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de 6 a alrededor de 20 átomos de carbono.

Como se usa en esta invención, el término "halo" o "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

10 Como se usa en esta invención, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico, de diagnóstico y/o profiláctico y/o provoca un efecto biológico y/o farmacológico deseado.

15 Como se usa en esta invención, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a seres humanos en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos en cualquier etapa de desarrollo. En determinados casos, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado vacuno, un primate o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y gusanos. En algunas realizaciones, el animal es un animal transgénico, un animal modificado genéticamente o un clon.

20 Como se usa en esta invención, la expresión "aproximadamente" o "alrededor de", según se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En determinadas realizaciones, "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que se encuentra dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor o menor) del valor de referencia establecido, a menos que se indique lo contrario, o resulte evidente de otro modo a partir del contexto (salvo que dicho número exceda el 100 % de un valor posible).

30 Como se usa en esta invención, las expresiones "asociado con", "conjugado", "enlazado", "unido" y "anclado", cuando se usan con respecto a dos o más restos, significa que los restos están físicamente asociados o conectados entre sí, ya sea directamente o mediante uno o más restos adicionales que sirven como agente de enlace, para formar una estructura que sea suficientemente estable de modo que los restos permanezcan físicamente asociados en las condiciones en las que se usa la estructura, por ejemplo, condiciones fisiológicas.

35 Como se usa en esta invención, la expresión "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier sustancia que tenga actividad en un sistema y/u organismo biológico. Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera biológicamente activa. En realizaciones particulares, en los que un ácido nucleico es biológicamente activo, una porción de ese ácido nucleico que comparte al menos una actividad biológica del ácido nucleico completo se denomina típicamente porción "biológicamente activa".

40 Como se usa en esta invención, el término "conservado" se refiere a nucleótidos o residuos de aminoácidos de una secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que son los que se producen inalterados en la misma posición de dos o más secuencias relacionadas que se comparan. Los nucleótidos o aminoácidos que están relativamente conservados son aquellos que se conservan entre más secuencias relacionadas que los nucleótidos o aminoácidos que aparecen en otras partes de las secuencias. En algunas realizaciones, se dice que dos o más secuencias están "completamente conservadas" si son 100 % idénticas entre sí. En algunas realizaciones, se dice que dos o más secuencias están "altamente conservadas" si son al menos un 70 % idénticas, al menos un 80 % idénticas, al menos un 90 % idénticas, o al menos un 95 % idénticas entre sí. En algunas realizaciones, se dice que dos o más secuencias están "altamente conservadas" si son alrededor de un 70 % idénticas, alrededor de un 80 % idénticas, alrededor de un 90 % idénticas, alrededor de un 95 %, alrededor de un 98 %, o alrededor de un 99 % idénticas entre sí. En algunas realizaciones, se dice que dos o más secuencias están "conservadas" si son al menos un 30 % idénticas, al menos un 40 % idénticas, al menos un 50 % idénticas, al menos un 60 % idénticas, al menos un 70 % idénticas, al menos un 80 % idénticas, al menos un 90 % idénticas, o al menos un 95 % idénticas entre sí. En algunas realizaciones, se dice que dos o más secuencias están "conservadas" si son alrededor de un 30 % idénticas, alrededor de un 40 % idénticas, alrededor de un 50 % idénticas, alrededor de un 60 % idénticas, alrededor de un 70 % idénticas, alrededor de un 80 % idénticas, alrededor de un 90 % idénticas, alrededor de un 95 % idénticas, alrededor de un 98 % idénticas, o alrededor de un 99 % idénticas entre sí.

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

Como se usa en esta invención, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma que presenta una propiedad y/o actividad por la cual se caracteriza.

5 Como se usa en esta invención, la expresión "*in vitro*" se refiere a eventos que se producen en un ambiente artificial, *por ejemplo*, en un tubo de ensayo o en un recipiente de reacción, en un cultivo celular, en una placa de Petri, *etc.*, y no dentro de un organismo (por ejemplo, animal, planta o microbio).

10 Como se usa en esta invención, "*in vivo*" se refiere a eventos que se producen dentro de un organismo (*por ejemplo*, animal, planta o microbio).

15 Como se usa en esta invención, el término "aislado" se refiere a una sustancia o entidad que ha sido (1) separada de al menos algunos de los componentes con los cuales estuvo asociada cuando fue inicialmente producida (ya sea en la naturaleza o en un entorno experimental) y/o (2) producida, preparada y/o fabricada por el ser humano. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de al menos alrededor del 10 %, alrededor del 20 %, alrededor del 30 %, alrededor del 40 %, aproximadamente el 50 %, alrededor del 60 %, alrededor del 70 %, alrededor del 80 %, alrededor del 90 % o más de los otros componentes a los cuales estuvieron inicialmente asociadas. En algunas realizaciones los agentes aislados tienen una pureza de más de alrededor del 80 %, alrededor del 85 %, alrededor del 90 %, alrededor del 91 %, alrededor del 92 %, alrededor del 93 %, alrededor del 94 %, alrededor del 95 %, alrededor del 96 %, alrededor del 97 %, alrededor del 98 %, alrededor del 99 %, o más de alrededor del 99 %. Como se usa en esta invención, una sustancia es "pura" si se encuentra sustancialmente libre de otros componentes.

20 Como se usa en esta invención, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo al que se pueda administrar una composición según la presente descripción, por ejemplo, con fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y humanos) y/o plantas.

25 Como se usa en esta invención, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de mostrar una medida o grado total, o casi total, de una característica o propiedad de interés. Un experto en las técnicas biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos en raras ocasiones, si es que se producen, se completan y/o llegan a completarse o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, "sustancialmente" se usa en esta invención para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

30 Un individuo "que padece" una enfermedad, trastorno y/o afección ha sido diagnosticado o presenta uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afección.

35 Un individuo que es "susceptible" a una enfermedad, trastorno y/o afección no ha sido diagnosticado y/o puede no presentar síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, cáncer) puede caracterizarse por uno o más de los siguientes: (1) una mutación genética asociada con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (2) un polimorfismo genético asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (3) expresión y/o actividad aumentada y/o disminuida de una proteína y/o ácido nucleico asociado con la enfermedad, trastorno y/o afección; (4) hábitos y/o estilos de vida asociados con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección; (5) antecedentes familiares de la enfermedad, trastorno y/o afección; y (6) exposición y/o infección con un microbio asociado con el desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

40 Como se usa en esta invención, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un agente a administrar (*por ejemplo*, ácido nucleico, fármaco, agente terapéutico, agente de diagnóstico, agente profiláctico, *etc.*) que es suficiente, cuando se administra, a un sujeto que padece o es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, mejorar los síntomas, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de la enfermedad, trastorno y/o afección.

45 Como se usa en esta invención, el término "factor de transcripción" se refiere a una proteína de unión al ADN que regula la transcripción del ADN en ARN, por ejemplo, mediante la activación o represión de la transcripción. Algunos factores de transcripción efectúan la regulación de la transcripción por sí solos, mientras que otros actúan en conjunto con otras proteínas. Algún factor de transcripción puede activar y reprimir la transcripción bajo ciertas condiciones. En general, los factores de transcripción se unen a una secuencia o secuencias diana específicas muy similares a una secuencia consenso específica en una región reguladora de un gen diana. Los factores de transcripción pueden regular la transcripción de un gen diana solos o en un complejo con otras moléculas.

Como se usa en esta invención, el término "tratar" se refiere a aliviar parcial o totalmente, mitigar, mejorar, atenuar, retrasar el inicio de, inhibir la progresión de, reducir la gravedad de, y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. Por ejemplo, "tratar" el cáncer puede referirse a inhibir la supervivencia, el crecimiento y/o la diseminación de un tumor. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad, trastorno y/o afección, y/o a un sujeto que muestra únicamente síntomas iniciales de una enfermedad, trastorno y/o afección, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende el suministro de una proteína asociada con un ácido nucleico terapéuticamente activo a un sujeto que lo necesite.

Como se usa en esta invención, la expresión "no modificado" se refiere a un ácido nucleico antes de ser modificado, por ejemplo, adenosina, guanosina, citosina, timidina y uracilo, o un aminoácido natural. Los compuestos que se describen en esta invención pueden ser asimétricos (por ejemplo, tener uno o más estereocentros). Todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros, están destinados a menos que se indique lo contrario. Los compuestos que contienen átomos de carbono sustituidos asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. Se conocen en la técnica procedimientos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente activos, tales como por resolución de mezclas racémicas o por síntesis estereoselectiva. Muchos isómeros geométricos de olefinas, dobles enlaces C=N, y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en esta invención, y todos estos isómeros estables se contemplan. Los isómeros geométricos cis y trans de los compuestos se describen y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas.

Los compuestos también incluyen formas tautoméricas. Las formas tautoméricas son el resultado del intercambio de un enlace simple con un enlace doble adyacente junto con la migración concomitante de un protón. Las formas tautoméricas incluyen tautómeros prototrópicos que son estados de protonación isoméricos que tienen la misma fórmula empírica y carga total. Los tautómeros prototrópicos de ejemplo incluyen pares cetona-enol, pares amida-ácido imídico, pares lactama-lactima, pares amida-ácido imídico, pares enamina-imina y formas anulares donde un protón puede ocupar dos o más posiciones de un sistema heterocíclico, por ejemplo, 1H- y 3H-imidazol, 1H-, 2H- y 4H- 1, 2, 4-triazol, 1H- y 2H- isoindol y 1H- y 2H-pirazol. Las formas tautoméricas pueden estar en equilibrio o bloqueadas estéricamente en una forma mediante una sustitución apropiada.

Los compuestos también pueden incluir todos los isótopos de los átomos que se encuentran en los compuestos intermedios o finales. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio.

El término "compuesto", como se usa en esta invención, pretende incluir todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros e isótopos de las estructuras representadas.

En algunas realizaciones, los compuestos de la presente descripción se aíslan sustancialmente. Por "sustancialmente aislado" se entiende que el compuesto está al menos parcial o sustancialmente separado del entorno donde se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en el compuesto de la presente descripción. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 97 % o al menos aproximadamente el 99 % en peso del compuesto de la presente descripción, o una sal del mismo. Los procedimientos para aislar compuestos y sus sales son habituales en la técnica.

Los compuestos y sales de los mismos, se pueden preparar en combinación con moléculas de agua o disolvente para formar solvatos e hidratos mediante procedimientos habituales.

La presente descripción también incluye las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en esta invención. Como se usa en esta invención, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en donde se modifica el compuesto original al convertir un resto básico o ácido existente en su forma de sal. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente descripción incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto original formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente descripción se pueden sintetizar a partir del compuesto principal que contiene un resto ácido o básico mediante procedimientos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol,

isopropanol o acetonitrilo. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 y Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977) se encuentran listas de sales adecuadas.

5 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en esta invención para hacer referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico sensato, son adecuados para su uso en contacto con tejidos humanos y animales sin provocar una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, con una relación beneficio/riesgo razonable.

10

Como se usa en esta invención, el término "profármacos" se refiere a cualquier vehículo, típicamente unido covalentemente, que libera el fármaco original activo cuando se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos se pueden preparar modificando grupos funcionales presentes en los compuestos de tal forma que las modificaciones se escindan, bien con su manipulación habitual o bien *in vivo*, de los compuestos originales. Los profármacos incluyen compuestos en donde los grupos hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo están unidos a cualquier grupo que, cuando se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados de acetato, formiato y benzoato de grupos funcionales de alcohol y amina en los compuestos de la presente descripción. En T. Higuchi y V. Stella, "Prodrugs as Novel Delivery Systems" vol. 14 de la serie del Simposio ACS, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, Asociación Farmacéutica Americana y Pergamon Press, 1987, se analiza la preparación y uso de profármacos.

15

20

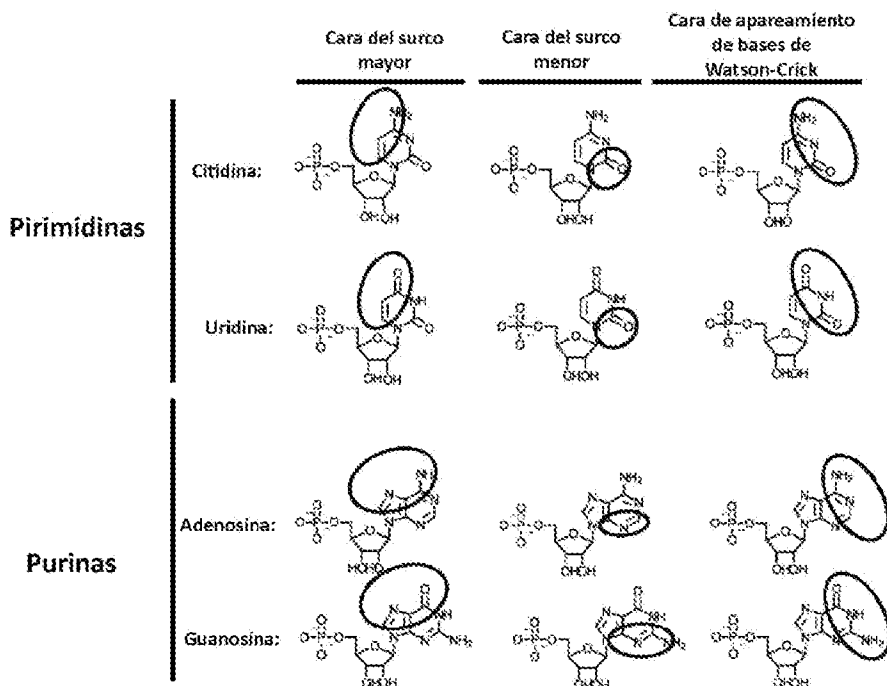
Nucleósidos y nucleótidos modificados

25

Como se describe en esta invención, el término "nucleósido" se define como un compuesto que contiene una molécula de azúcar de cinco carbonos (una pentosa o ribosa) o un derivado de la misma, y una base orgánica, purina o pirimidina, o un derivado de la misma. Como se describe en esta invención, el término "nucleótido" se define como un nucleósido que consiste en un grupo fosfato. Los nucleósidos y nucleótidos descritos en esta invención generalmente se modifican químicamente en la cara del surco mayor.

30

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



35

En algunas realizaciones, los nucleósidos **modificados** incluyen 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroxi-metilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina.

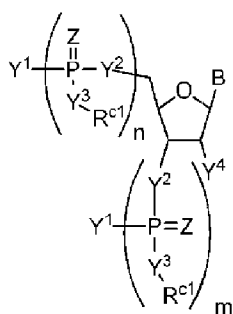
40

En algunas realizaciones, los nucleósidos **modificados** incluyen 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil) adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina y 2-metoxi-adenina.

En algunas realizaciones, los nucleósidos **modificados** incluyen inosina, 1-metil-inosina, wyosina, wybutosina, 7-dcaza-guanosinac, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

Otro nucleósido y el nucleótido pueden ser un compuesto de Fórmula I:

15



I

en donde:

20 Z es O S;

cada uno de Y<sup>1</sup> se selecciona independientemente de entre -OR<sup>a1</sup>, -NR<sup>a1</sup>R<sup>b1</sup>y -SR<sup>a1</sup>;

25 cada uno de Y<sup>2</sup> se selecciona independientemente de entre O, NR<sup>a</sup>, S o un enlazador que comprende un átomo seleccionado de entre el grupo que consiste en C, O, N y S;

cada uno de Y<sup>3</sup> se selecciona independientemente de entre O y S;

30 Y<sup>4</sup> se selecciona de entre H, -OR<sup>a</sup>, -SR<sup>a</sup>y -NHR<sup>a</sup>;

n es 0, 1, 2 o 3;

m es 0, 1, 2 o 3;

35 B es una nucleobase;

R<sup>a</sup> es H, alquilo C<sub>1-20</sub>, alquenilo C<sub>2-20</sub>, alquinilo C<sub>2-20</sub> o arilo C<sub>6-20</sub>;

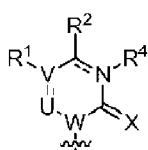
40 cada R<sup>a1</sup> y R<sup>b1</sup> son independientemente H o un contraión; e

-Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> es OH o SH a un pH de alrededor de 1 o -Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> es O<sup>-</sup> o S<sup>-</sup> a pH fisiológico;

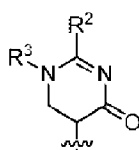
o -Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> es alcoxi C<sub>1-20</sub>, O-alquenilo C<sub>2-20</sub> u O-alquinilo C<sub>1-20</sub>;

45 en donde cuando B es una nucleobase no modificada seleccionada de entre citosina, guanina y adenina, entonces al menos uno de Z, Y<sup>1</sup> o Y<sup>2</sup> no es O ni OH.

En algunas realizaciones, B es una nucleobase de Fórmula II-a o II-c:



II-a



II-c

en donde:

5 indica un enlace simple o doble;

X es O o S;

cada U y W son independientemente C o N;

10

V es O, S, C o N;

en donde cuando V es C entonces R<sup>1</sup> es H, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>1-6</sub>, alquinilo C<sub>1-6</sub>, halo u -OR<sup>c</sup>, en donde cada alquilo C<sub>1-20</sub>, alquenilo C<sub>2-20</sub>, alquinilo C<sub>2-20</sub> están opcionalmente sustituidos con -OH, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SH, -C(O)R<sup>c</sup>, -C(O)OR<sup>c</sup>, -NHC(O)R<sup>c</sup>, o -NHC(O)OR<sup>c</sup>;

15

y en donde cuando V es O, S o N entonces R<sup>1</sup> está ausente;

R<sup>2</sup> es H, -OR<sup>c</sup>, -SR<sup>c</sup>, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, o halo;

20

o cuando V es C entonces R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> junto con los átomos de carbono a los que están unidos pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados de entre halo, -OH, -SH, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, alquilo C<sub>1-20</sub>, alquenilo C<sub>2-20</sub>, alquinilo C<sub>2-20</sub>, alcoxi C<sub>1-20</sub> o tialquilo C<sub>1-20</sub>;

25

R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1-20</sub>;

R<sup>4</sup> es H o alquilo C<sub>1-20</sub>; en donde cuando indica un doble enlace entonces R<sup>4</sup> está ausente, o N-R<sup>4</sup>, en conjunto, forma un N cargado positivamente sustituido con alquilo C<sub>1-20</sub>;

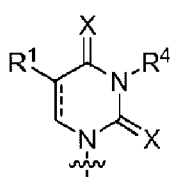
30

cada R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son independientemente H, alquilo C<sub>1-20</sub>, alquenilo C<sub>2-20</sub>, alquinilo C<sub>2-20</sub> o arilo C<sub>6-20</sub>; y

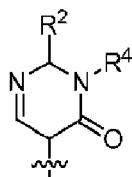
R<sup>c</sup> es H, alquilo C<sub>1-20</sub>, alquenilo C<sub>2-20</sub>, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol, o un grupo amino-polietilenglicol.

En algunas realizaciones, B es una nucleobase de Fórmula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:

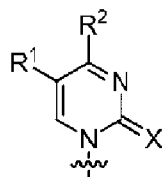
35



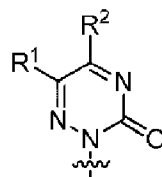
II-a1



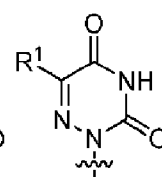
II-a2



II-a3



II-a4



II-a5..

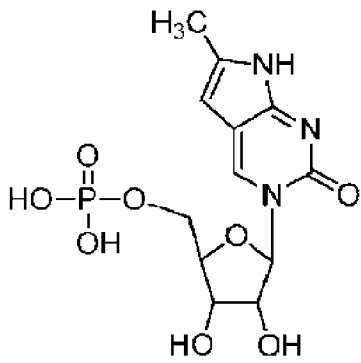
En algunas realizaciones, B es una nucleobase seleccionada de entre el grupo que consiste en citosina, guanina y adenina.

40

En algunas realizaciones, B es una citidina o un derivado de la misma.

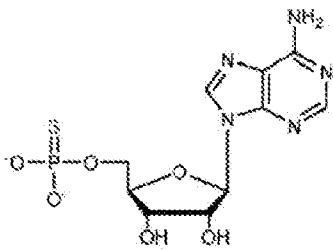
En algunas realizaciones el otro nucleótido es un compuesto de Fórmula I-a:



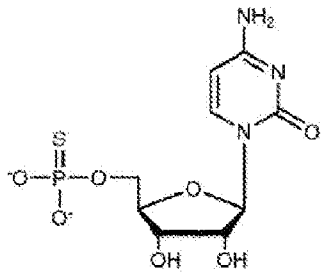


En algunas realizaciones, un nucleótido modificado es 5'-O-(1-Tiofosfato)-Adenosina, 5'-O-(1-Tiofosfato)-Citidina, 5'-O-(1-Tiofosfato)-Guanosina, 5'-O-(1-Tiofosfato)-Uridina o 5'-O-(1-Tiofosfato)-Pseudouridina.

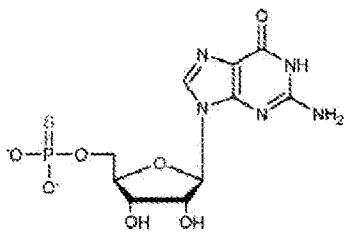
5



5'-O-(1-Tiofosfato)-Adenosina

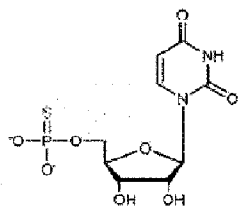


5'-O-(1-Tiofosfato)-Citidina



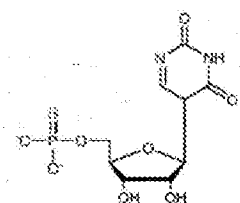
10

5'-O-(1-Tiofosfato)-Guanosina



15

5'-O-(1-Tiofosfato)-Uridina



5'-O-(1-Thiofosfato)-Pseudouridina

5 El resto fosfato sustituido con  $\alpha$ -tio se proporciona para conferir estabilidad a los polímeros de ARN y ADN a través de los enlaces de la cadena principal de fosforotioato no naturales. El ADN y el ARN de fosforotioato tienen una mayor resistencia a las nucleasas y, posteriormente, una semivida más prolongada en un entorno celular. Se espera que los ácidos nucleicos unidos a fosforotioato también reduzcan la respuesta inmunitaria innata a través de una unión/activación más débil de moléculas inmunitarias innatas celulares.

10 Los nucleótidos modificados y combinaciones de nucleótidos modificados se proporcionan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>
6-aza-citidina	$\alpha$ -tio-citidina/5-yodo-uridina
2-tio-citidina	$\alpha$ -tio-citidina/N1-metil-pseudouridina
$\alpha$ -tio-citidina	$\alpha$ -tio-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
Pseudo-iso-citidina	$\alpha$ -tio-citidina/5-metil-uridina
5-aminoalil-uridina	$\alpha$ -tio-citidina/pseudo-uridina
5-yodo-uridina	Pseudo-iso-citidina/5-yodo-uridina
N1-metil-pseudouridina	Pseudo-iso-citidina/N1-metil-pseudo-uridina
5,6-dihidrouridina	Pseudo-iso-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
$\alpha$ -tio-uridina	Pseudo-iso-citidina/5-metil-uridina
4-tio-uridina	Pseudo-iso-citidina/Pseudo-uridina
6-aza-uridina	Pirrolo-citidina
5-hidroxi-uridina	Pirrolo-citidina/5-yodo-uridina
Desoxi-timidina	Pirrolo-citidina/N1-metil-pseudo-uridina
Pseudo-uridina	Pirrolo-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
Inosina	Pirrolo-citidina/5-metil-uridina
$\alpha$ -tio-guanosina	Pirrolo-citidina/Pseudo-uridina
8-oxo-guanosina	5-metil-citidina/5-yodo-uridina
O6-metil-guanosina	5-metil-citidina/N1-metil-pseudouridina
7 -deaza-guanosina	5-metil-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
Sin modificación	5-metil-citidina/5-metil-uridina
N1-metil-adenosina	5-metil-citidina/Pseudo-uridina
2-amino-6-Cloro-purina	5-metil-citidina
N6-metil-2-aminopurina	25 % de Pseudo-iso-citidina
6-Cloro-purina	25 % de N1-metil-pseudouridina
N6-metil-adenosina	25% de N1-Metil-pseudo-uridina/75 % de pseudo-uridina
$\alpha$ -tio-adenosina	5-metil-uridina
8-azido-adenosina	5-yodo-citidina

<b>Nucleótido modificado</b>	<b>Combinación de nucleótidos modificados</b>
7-deaza-adenosina	

#### Síntesis de nucleótidos modificados

5 Los nucleósidos y nucleótidos modificados descritos en esta invención se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes procedimientos generales. Se entiende que cuando se dan condiciones de procedimiento típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, disolventes, presiones, etc.), también se pueden utilizar otras condiciones de procedimiento a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos particulares o el disolvente utilizado, pero un experto en la materia puede determinar dichas condiciones mediante procedimientos de optimización habituales.

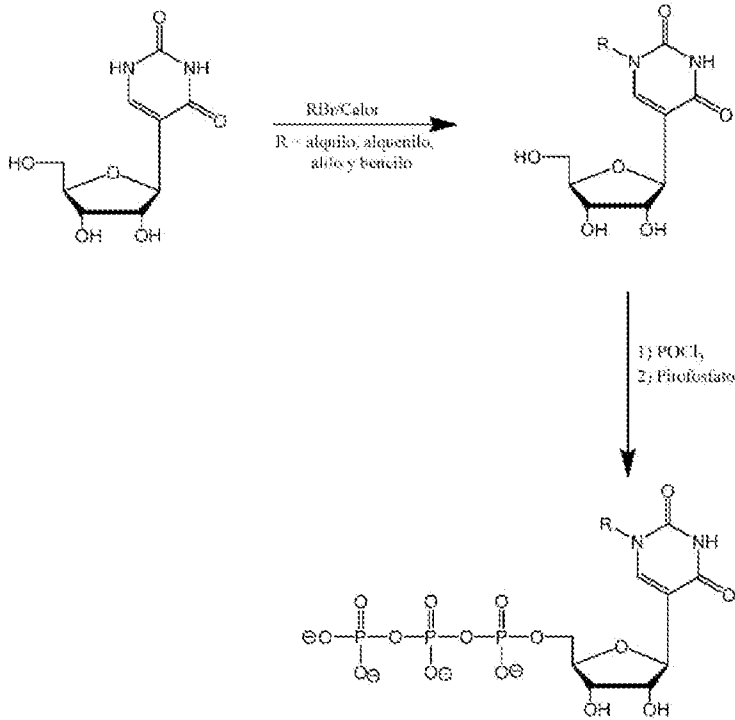
10 Los procedimientos descritos en esta invención pueden monitorearse según cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos se puede monitorear por medios espectroscópicos, tal como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo,  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV visible) o espectrometría de masas, o por cromatografía tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de capa fina.

15 La preparación de nucleósidos y nucleótidos modificados puede implicar la protección y la desprotección de diversos grupos químicos. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección y la selección de los grupos protectores apropiados. La química de los grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en Greene, y col., Protective Groups in Organic Synthesis, 2<sup>a</sup>. ed., Wiley & Sons, 1991.

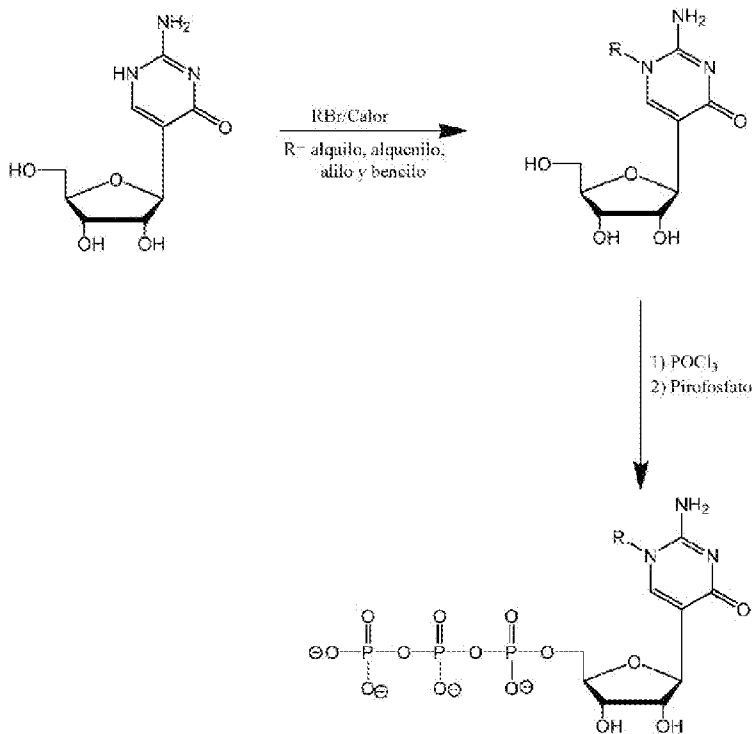
20 Las reacciones de los procedimientos descritos en esta invención se pueden llevar a cabo en disolventes adecuados que un experto en la técnica de la síntesis orgánica puede seleccionar fácilmente. Los disolventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los compuestos intermedios o los productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, temperaturas que pueden variar entre la temperatura de congelación del disolvente y la temperatura de ebullición del disolvente. Se puede llevar a cabo una determinada reacción en un disolvente o en una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, se pueden seleccionar disolventes adecuados para una etapa de reacción particular. La resolución de mezclas racémicas de nucleósidos y nucleótidos modificados se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica. Un procedimiento de ejemplo incluye la recristalización fraccionada usando un "ácido de resolución quiral" que es un ácido orgánico formador de sal ópticamente activo. Los agentes de resolución adecuados para los procedimientos de recristalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L de ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos alcanforsulfónicos ópticamente activos. La resolución de mezclas racémicas también puede llevarse a cabo mediante la elución en una columna empacada con un agente de resolución ópticamente activo (por ejemplo, dinitrobenzoilfenilglicina). Un experto en la materia puede determinar la composición de disolvente de elución adecuada.

40 A continuación se proporcionan síntesis de nucleótidos modificados ejemplares en los Esquemas 1 y 2.

Esquema 1



Esquema 2



5

También se pueden preparar nucleósidos y nucleótidos modificados según los procedimientos sintéticos descritos en Ogata y col., Journal of Organic Chemistry 74:2585-2588, 2009; Purmal y col., Nucleic Acids Research 22(1): 72-78, 1994; Fukuhara y col., Biochemistry, 1(4): 563-568, 1962; y Xu y col., Tetrahedron, 48(9): 1729-1740, 1992.

10

Ácidos nucleicos modificados

Los descritos en el presente documento tienen propiedades útiles, incluida la disminución significativa o la falta

de una inducción sustancial de la respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el ARNm, o la supresión de la misma. Debido a que este ARNm modificados mejoran la eficiencia de la producción de proteínas, la retención intracelular de ARNm y la viabilidad de las células en contacto, además de poseer una inmunogenicidad reducida, este ARNm en comparación con el ARNm no modificado, que tienen estas propiedades se denomina " ARNm mejorado" en esta invención.

El término "ácido nucleico" en su sentido más amplio, incluye cualquier compuesto y/o sustancia que se encuentre o se pueda incorporar en una cadena de oligonucleótidos. Los ácidos nucleicos para su uso según la presente descripción son ARNm.

Se proporcionan ácidos nucleicos modificados que contienen una región traducible y una, dos o más de dos modificaciones de nucleósidos diferentes. En algunas realizaciones, el ácido nucleico modificado muestra una degradación reducida en una célula en la que se introduce el ácido nucleico, en relación con un ácido nucleico no modificado correspondiente. Como se describe en esta invención, los ácidos nucleicos de la presente descripción no inducen sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el ARNm.

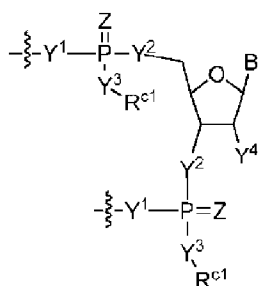
En determinadas realizaciones, es deseable degradar intracelularmente un ácido nucleico modificado introducido en la célula, por ejemplo, si se desea una sincronización precisa de la producción de proteínas. Por lo tanto, la presente descripción proporciona un ácido nucleico modificado que contiene un dominio de degradación, sobre el que se puede actuar de manera dirigida dentro de una célula.

Otros componentes del ácido nucleico son opcionales y son beneficiosos en algunas realizaciones. Por ejemplo, se proporcionan una región no traducida (UTR) 5' y/o una 3'UTR. También se proporcionan ácidos nucleicos que contienen una secuencia Kozak.

Además, se proporcionan ácidos nucleicos que contienen una o más secuencias de nucleótidos intrónicos capaces de escindirse del ácido nucleico.

Además, se proporcionan ácidos nucleicos que contienen un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Un IRES puede actuar como el único sitio de unión al ribosoma, o puede servir como uno de los múltiples sitios de unión al ribosoma de un ARNm. Un ARNm que contiene más de un sitio de unión al ribosoma funcional puede codificar varios péptidos o polipéptidos que los ribosomas traducen de forma independiente ("ARNm multicistrónico"). Cuando los ácidos nucleicos se proporcionan con un IRES, además se proporciona una segunda región traducible. Los ejemplos de secuencias IRES que se pueden usar según la presente descripción incluyen, sin limitación, aquellas de picornavirus (*por ejemplo*, FMDV), virus de plagas (CFFV), virus de la polio (PV), virus de encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico comprenden además un compuesto de Fórmula I-d:



I-d

en donde:

Z es O S;

cada uno de  $\text{Y}^1$  se selecciona independientemente de entre  $-\text{OR}^{\text{a1}}$ ,  $-\text{NR}^{\text{a1}}\text{R}^{\text{b1}}$  y  $-\text{SR}^{\text{a1}}$ ;

cada uno de  $\text{Y}^2$  se selecciona independientemente de entre O,  $\text{NR}^{\text{a}}$ , S o un enlazador que comprende un átomo seleccionado de entre el grupo que consiste en C, O, N y S;

cada uno de  $\text{Y}^3$  se selecciona independientemente de entre O y S;

$Y^4$  se selecciona de entre H,  $-OR^a$ ,  $-SR^a$  y  $-NHR^a$ ;

B es una nucleobase;

5

$R^a$  es H, alquilo  $C_{1-20}$ , alquenilo  $C_{2-20}$ , alquinilo  $C_{2-20}$  o arilo  $C_{6-20}$ ;

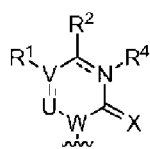
cada  $R^{a1}$  y  $R^{b1}$  son independientemente H o un contraión; y

10  $-Y^3-R^{c1}$  es OH o SH a un pH de alrededor de 1 o  $-Y^3-R^{c1}$  es  $O^-$  o  $S^-$  a pH fisiológico;

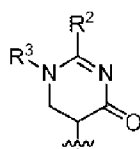
o  $-Y^3-R^{c1}$  es alcoxi  $C_{1-20}$ , O-alquenilo  $C_{2-20}$  u O-alquinilo  $C_{1-20}$ ;

15 en donde cuando B es una nucleobase no modificada seleccionada de entre citosina, guanina y adenina, entonces al menos uno de Z,  $Y^1$  o  $Y^2$  no es O ni OH.

En algunas realizaciones, B es una nucleobase de Fórmula II-a o II-c:



II-a



II-c

20

en donde:

indica un enlace simple o doble;

25

X es O S;

cada U y W son independientemente C o N;

V es O, S, C o N;

30

en donde cuando V es C entonces  $R^1$  es H, alquilo  $C_{1-6}$ , alquenilo  $C_{1-6}$ , alquinilo  $C_{1-6}$ , halo u  $-OR^c$ , en donde cada alquilo  $C_{1-20}$ , alquenilo  $C_{2-20}$ , alquinilo  $C_{2-20}$  están opcionalmente sustituidos con  $-OH$ ,  $-NR^aR^b$ ,  $-SH$ ,  $-C(O)R^c$ ,  $-C(O)OR^c$ ,  $-NHC(O)R^c$ , o  $-NHC(O)OR^c$ ;

35

y en donde cuando V es O, S o N entonces  $R^1$  está ausente;

$R^2$  es H,  $-OR^c$ ,  $-SR^c$ ,  $-NR^aR^b$ , o halo;

40

o cuando V es C entonces  $R^1$  y  $R^2$  junto con los átomos de carbono a los que están unidos pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados de entre halo,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-NR^aR^b$ , alquilo  $C_{1-20}$ , alquenilo  $C_{2-20}$ , alquinilo  $C_{2-20}$ , alcoxi  $C_{1-20}$  o tioalquilo  $C_{1-20}$ ;

$R^3$  es H o alquilo  $C_{1-20}$ ;

45

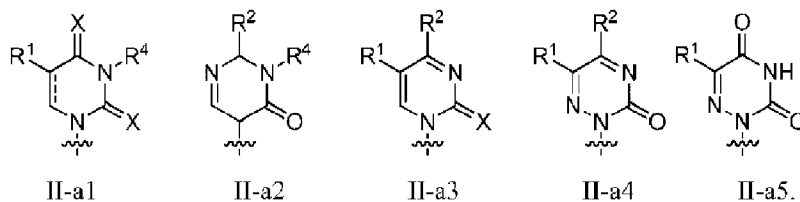
$R^4$  es H o alquilo  $C_{1-20}$ ; en donde cuando indica un doble enlace entonces  $R^4$  está ausente, o  $N-R^4$ , en conjunto, forma un N cargado positivamente sustituido con alquilo  $C_{1-20}$ ;

cada  $R^a$  y  $R^b$  son independientemente H, alquilo  $C_{1-20}$ , alquenilo  $C_{2-20}$ , alquinilo  $C_{2-20}$  o arilo  $C_{6-20}$ ; y

50

$R^c$  es H, alquilo  $C_{1-20}$ , alquenilo  $C_{2-20}$ , fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol, o un grupo amino-polietilenglicol.

En algunas realizaciones, B es una nucleobase de Fórmula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:



En algunas realizaciones, al menos el 25 % de las citosinas se reemplazan por un compuesto de Fórmula I-a (por ejemplo, al menos alrededor del 30 %, al menos alrededor del 35 %, al menos alrededor del 40 %, al menos alrededor del 45 %, al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor del 55 %, al menos alrededor del 60 %, al menos alrededor del 65 %, al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, o alrededor del 100 %).

#### 10 Componentes asociados que interactúan con el surco mayor

Como se describe en esta invención, la expresión "componente asociado que interactúa con el surco mayor" se refiere a receptores de reconocimiento de ARN que detectan y responden a ligandos de ARN a través de interacciones, por ejemplo, unión, con la cara del surco mayor de un nucleótido o ácido nucleico. Como tales, los ligandos de ARN que comprenden nucleótidos o ácidos nucleicos modificados como se describe en esta invención disminuyen las interacciones con los componentes asociados de unión al surco mayor y, por lo tanto, disminuyen una respuesta inmunitaria innata, o la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias, o ambas.

Los componentes asociados que interactúan, *por ejemplo*, se unen al surco mayor de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, las siguientes nucleasas y helicasas. Dentro de las membranas, los TLR (receptores tipo Toll) 3, 7 y 8 pueden responder a los ARN monocatenarios y bicatenarios. Dentro del citoplasma, los miembros de la superfamilia 2 clase de DEX(D/H) helicasas y ATPasas pueden detectar ARN para iniciar respuestas antivirales. Estas helicasas incluyen RIG-I (gen 1 inducible por ácido retinoico) y MDA5 (gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma). Otros ejemplos incluyen el laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2), proteínas que contienen el dominio HIN-200 o proteínas que contienen el dominio helicasa.

#### Prevención o reducción de la activación de la respuesta inmunitaria celular innata utilizando ácidos nucleicos modificados

La expresión "respuesta inmunitaria innata" incluye una respuesta celular a ácidos nucleicos exógenos, incluidos ácidos nucleicos monocatenarios, generalmente de origen viral o bacteriano, que implica la inducción de la expresión y liberación de citocinas, particularmente los interferones, y la muerte celular. La síntesis de proteínas también se reduce durante la respuesta inmunitaria celular innata. Si bien es ventajoso eliminar la respuesta inmunitaria innata en una célula, la presente descripción proporciona ARNm modificados que reducen sustancialmente la respuesta inmunitaria, incluida la señalización de interferón, sin eliminar por completo dicha respuesta. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 % o más de un 99,9 %, en comparación con la respuesta inmunitaria inducida por un ácido nucleico no modificado correspondiente. Dicha reducción se puede medir por la expresión o el nivel de actividad de los interferones de tipo 1 o la expresión de genes regulados por interferones, tales como los receptores tipo toll (por ejemplo, TLR7 y TLR8). La reducción de la respuesta inmunitaria innata también puede medirse por la disminución de la muerte celular después de una o más administraciones de ARN modificados a una población celular; *por ejemplo*, la muerte celular es un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de un 95 % menor que la frecuencia de muerte celular observada con un ácido nucleico no modificado correspondiente. Además, la muerte celular puede afectar a menos del 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 % o menos del 0,01 % de células en contacto con los ácidos nucleicos modificados.

La presente descripción prevé la introducción repetida (por ejemplo, transfección) de ácidos nucleicos modificados en una población de células diana, *por ejemplo*, *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. La etapa de poner en contacto la población de células puede repetirse una o más veces (tal como dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco veces). En algunas realizaciones, la etapa de poner en contacto la población de células con los ácidos nucleicos modificados se repite un número de veces suficiente para lograr una eficiencia predeterminada de traducción de proteínas en la población celular. Dada la citotoxicidad reducida de la población de células diana proporcionada por las modificaciones del ácido nucleico, dichas transfecciones repetidas se pueden lograr en una serie diversa de tipos de células.

#### Variantes de polipéptidos

Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes, que tienen una determinada identidad

con una secuencia polipeptídica de referencia. El término "identidad", como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más péptidos, según se determina comparando las secuencias. En la técnica, identidad también significa el grado de relación de secuencia entre péptidos según lo determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La identidad mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la menor de dos o más secuencias con alineaciones de espacios (si los hubiera) conforme a un modelo matemático o programa informático particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de los péptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo y col., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido tiene la misma actividad o similar que el polipéptido de referencia. Alternativamente, la variante puede tener una actividad alterada (por ejemplo, aumentada o disminuida) con respecto a un polipéptido de referencia. En general, las variantes de un polinucleótido o polipéptido particular de la presente descripción tendrán al menos alrededor del 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con las del polinucleótido o polipéptido de referencia particular, según se determina mediante parámetros y programas de alineación de secuencia descritos en esta invención y conocidos por los expertos en la materia.

Como reconocen los expertos en la materia, los fragmentos proteicos, los dominios proteicos funcionales y las proteínas homólogas también se consideran dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, se proporciona en el presente documento cualquier fragmento proteico de una proteína de referencia (es decir, una secuencia de polipéptidos al menos un residuo de aminoácido más corta que una secuencia de polipéptidos de referencia, pero de cualquier otro modo idéntica) de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 aminoácidos de longitud. En otro ejemplo, cualquier proteína que incluya un tramo de alrededor de 20, alrededor de 30, alrededor de 40, alrededor de 50 o alrededor de 100 aminoácidos que sean alrededor del 40 %, alrededor del 50 %, alrededor del 60 %, alrededor del 70 %, alrededor del 80 %, alrededor del 90 %, alrededor del 95 % o alrededor del 100 % idénticos a cualquiera de las secuencias descritas en esta invención se puede utilizar según la presente descripción. En determinadas realizaciones, una secuencia de proteína para ser utilizada según la presente descripción incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mutaciones, según se muestra en cualquiera de las secuencias que se proporcionan o a las que se hace referencia en esta invención.

#### Complejos polipéptido-ácido nucleico

La traducción adecuada de proteínas implica la agregación física de varios polipéptidos y ácidos nucleicos asociados con el ARNm. El ARNm puede estar unido a uno o más polipéptidos. Generalmente, las proteínas se proporcionan en una cantidad efectiva para evitar o reducir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el complejo.

#### Síntesis de ácidos nucleicos modificados

Los ácidos nucleicos para su uso según la presente descripción pueden prepararse según cualquier técnica disponible, incluyendo, pero sin limitación, síntesis química, síntesis enzimática, que generalmente se denomina transcripción *in vitro*, escisión enzimática o química de un precursor más largo, etc. Los procedimientos para sintetizar ARN son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gait, M.J. (ed.) Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; y Herdewijn, P. (ed.) Oligonucleotide synthesis: methods and applications, Methods in Molecular Biology, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005).

Los nucleósidos y nucleótidos modificados descritos en esta invención se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes procedimientos generales. Se entiende que cuando se dan condiciones de procedimiento típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, disolventes, presiones, etc.), también se pueden utilizar otras condiciones de procedimiento a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos particulares o el disolvente utilizado, pero un experto en la materia puede determinar dichas condiciones mediante procedimientos de optimización habituales.

Los procedimientos descritos en esta invención pueden monitorearse según cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación de productos se puede monitorear por medios espectroscópicos, tal como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo,  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV visible) o espectrometría de masas, o por cromatografía tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de capa fina.

La preparación de nucleósidos y nucleótidos modificados puede implicar la protección y la desprotección de diversos grupos químicos. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección y la selección de los grupos protectores apropiados. La química de los grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en Greene, y col., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª ed., Wiley & Sons, 1991.

Las reacciones de los procedimientos descritos en esta invención se pueden llevar a cabo en disolventes adecuados que un experto en la técnica de la síntesis orgánica puede seleccionar fácilmente. Los disolventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los compuestos intermedios o los productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, temperaturas que pueden variar entre la temperatura de congelación del disolvente y la temperatura de ebullición del disolvente. Se puede llevar a cabo una determinada reacción en un disolvente o en una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, se pueden seleccionar disolventes adecuados para una etapa de reacción particular.

La resolución de mezclas racémicas de nucleósidos y nucleótidos modificados se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica. Un procedimiento de ejemplo incluye la recristalización fraccionada usando un "ácido de resolución quiral" que es un ácido orgánico formador de sal ópticamente activo. Los agentes de resolución adecuados para los procedimientos de recristalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L de ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos alcanforsulfónicos ópticamente activos. La resolución de mezclas racémicas también puede llevarse a cabo mediante la elución en una columna empacada con un agente de resolución ópticamente activo (por ejemplo, dinitrobenzoilfenilglicina). Un experto en la materia puede determinar la composición adecuada del disolvente de elución. No es necesario que los ácidos nucleicos modificados se modifiquen uniformemente a lo largo de toda la longitud de la molécula. Pueden existir diferentes modificaciones de nucleótidos y/o estructuras principales en diversas posiciones en el ácido nucleico. Un experto en la materia apreciará que los análogos de nucleótidos u otra modificación o modificaciones se pueden encontrar en cualquier posición o posiciones de un ácido nucleico de manera que la función del ácido nucleico no se vea sustancialmente disminuida. Una modificación también puede ser una modificación terminal en 5' o 3'.

Los ácidos nucleicos pueden contener un modificado. En algunas realizaciones, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % de la citosina en el ácido nucleico se reemplaza con una citosina modificada. La citosina modificada se puede reemplazar por un compuesto que tiene una estructura única simple o se puede reemplazar por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas).

Generalmente, la longitud más corta de un ARNm modificado de la presente descripción puede ser la longitud de una secuencia de ARNm que sea suficiente para codificar un dipéptido. En otra realización, la longitud de la secuencia de ARNm es suficiente para codificar un tripéptido. En otra realización, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un tetrapéptido. En otra realización, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un pentapéptido. En otra realización, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un hexapéptido. En otra realización, la longitud de una secuencia de un ARNm es suficiente para codificar un heptapéptido. En otra realización, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un octapéptido. En otra realización, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un nonapéptido. En otra realización, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un decapéptido.

Los ejemplos de dipéptidos que las secuencias de ácido nucleico modificadas pueden codificar incluyen, pero no se limitan a, carnosina y anserina.

En una realización adicional, el ARNm tiene más de 30 nucleótidos de longitud. En otra realización, la molécula de ARN tiene más de 35 nucleótidos de longitud. En otra realización, la longitud es de al menos 40 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 45 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 55 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 80 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 90 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 100 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 120 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 140 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 160 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 180 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 200 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 250 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 300 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 350 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 400 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 450 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 600 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 700 nucleótidos. En otra

realización, la longitud es de al menos 800 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 900 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1100 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1200 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1300 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1400 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1600 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 1800 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 2000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 2500 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 3000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 4000 nucleótidos. En otra realización, la longitud es de al menos 5000 nucleótidos o mayor que 5000 nucleótidos.

#### Usos de los ácidos nucleicos modificados

##### Agentes terapéuticos

El ácido nucleico modificado descrito en el presente documento puede administrarse a un sujeto, en donde el ácido nucleico modificado se traduce *in vivo* para producir un péptido terapéutico en el sujeto. En consecuencia, se proporcionan composiciones, métodos, kits y reactivos para el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones en seres humanos y otros mamíferos. Los agentes terapéuticos activos de la presente descripción incluyen ácidos nucleicos modificados, o células que contienen ácidos nucleicos modificados.

En ciertas realizaciones, se proporcionan terapias de combinación que contienen uno o más ácidos nucleicos modificados que contienen regiones traducibles que codifican una proteína o proteínas que potencian la inmunidad de un sujeto mamífero junto con una proteína que induce toxicidad celular dependiente de anticuerpos. Por ejemplo, se proporcionan compuestos terapéuticos que contienen uno o más ácidos nucleicos que codifican trastuzumab y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En particular, dichas terapias de combinación son útiles en pacientes con cáncer de mama Her2+ que desarrollan resistencia inducida a trastuzumab. (Véase, por ejemplo, Albrecht, *Immunotherapy*. 2(6):795-8 (2010)).

Se puede inducir la traducción de un polipéptido recombinante en una población celular que utiliza los ácidos nucleicos modificados descritos en el presente documento. La población celular se pone en contacto con una cantidad efectiva de una composición que contiene un ácido nucleico según la región traducible reivindicada que codifica el polipéptido recombinante. La población se pone en contacto en condiciones tales que el ARNm se localiza en una o más células de la población celular y el polipéptido recombinante se traduce en la célula a partir del ácido nucleico.

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

Aspectos de la presente descripción están dirigidos a procedimientos para inducir la traducción *in vivo* de un polipéptido recombinante en un sujeto mamífero que lo necesita. Allí, se administra al sujeto una cantidad efectiva de una composición que contiene un ácido nucleico según las reivindicaciones que codifica el polipéptido recombinante usando los procedimientos de administración descritos en esta invención. El ácido nucleico se proporciona en una cantidad y en otras condiciones tales que el ácido nucleico se localiza en una célula del sujeto y el polipéptido recombinante se traduce en la célula a partir del ácido nucleico. La célula en la que se localiza el ácido nucleico, o el tejido en el que está presente la célula, puede ser alcanzada con una o más rondas de administración de ácido nucleico.

Otros aspectos de la presente descripción se refieren al trasplante de células que contienen ácidos nucleicos modificados a un sujeto mamífero. La administración de células a sujetos mamíferos es conocida por los expertos en la materia, tales como la implantación local (por ejemplo, administración tópica o subcutánea), el suministro de órganos o inyección sistémica (por ejemplo, inyección intravenosa o inhalación), al igual que la formulación de células en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que contienen ácidos nucleicos modificados se formulan para la administración por vía intramuscular, transarterial, intraperitoneal, intravenosa, intranasal, subcutánea, endoscópica, transdérmica o intratecal. En algunas realizaciones, la composición se formula para una liberación prolongada.

El sujeto al que se administra el agente terapéutico padece o corre el riesgo de desarrollar una enfermedad,

trastorno o afección deletérea.

5 El ciertas realizaciones, el ácido nucleico modificado administrado dirige la producción de uno o más polipéptidos recombinantes que proporcionan una actividad funcional que está sustancialmente ausente en la célula en la que se traduce el polipéptido recombinante. Por ejemplo, la actividad funcional faltante puede ser de naturaleza enzimática, estructural o reguladora de genes.

10 En ciertas realizaciones, el ácido nucleico modificado administrado dirige la producción de uno o más polipéptidos recombinantes que reemplazan un polipéptido (o múltiples polipéptidos) que está sustancialmente ausente en la célula en la que se traduce el polipéptido recombinante. Dicha ausencia puede deberse a una mutación genética del gen codificante o vía reguladora del mismo. Alternativamente, el polipéptido recombinante sirve para antagonizar la actividad de una proteína endógena presente en, sobre la superficie de, o secretada de la célula. Generalmente, la actividad de la proteína endógena es perjudicial para el sujeto, por ejemplo, debido a la mutación de la proteína endógena que da como resultado una actividad o localización alterada. Además, el polipéptido recombinante antagoniza, directa o indirectamente, la actividad de un resto biológico presente en, sobre la superficie de, o secretado de la célula. Los ejemplos de restos biológicos antagonizados incluyen lípidos (*por ejemplo*, colesterol), una lipoproteína (*por ejemplo*, lipoproteína de baja densidad), un ácido nucleico, un carbohidrato o una toxina de molécula pequeña.

20 Las proteínas recombinantes descritas en esta invención están diseñadas para la localización dentro de la célula, potencialmente dentro de un compartimento específico tal como el núcleo, o están diseñadas para la secreción de la célula o la translocación a la membrana plasmática de la célula.

25 Como se describe en el presente documento, una característica útil de los ácidos nucleicos modificados de la presente descripción es la capacidad de reducir la respuesta inmunitaria innata de una célula a un ácido nucleico exógeno.

#### Tratamiento para enfermedades y afecciones

30 En algunas realizaciones, el ARNm de la invención, se usa en procedimientos para tratar o prevenir un síntoma de enfermedades caracterizadas por una actividad proteica faltante o aberrante, reemplazando la actividad proteica faltante o superando la actividad proteica aberrante. Debido al rápido inicio de la producción de proteínas tras la introducción de ARNm modificados, en comparación con los vectores de ADN viral, los ANRM de la presente descripción son particularmente ventajosos en el tratamiento de enfermedades agudas tales como sepsis, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio. Además, la falta de regulación transcripcional de los ARNm modificados de la presente descripción es ventajosa porque se puede lograr una titulación precisa de la producción de proteínas.

40 Las enfermedades caracterizadas por una actividad proteica disfuncional o aberrante incluyen, pero sin limitación, cáncer y enfermedades proliferativas, enfermedades genéticas (*por ejemplo*, fibrosis quística), enfermedades autoinmunes, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas. La presente descripción permite el tratamiento de tales afecciones o enfermedades en un sujeto mediante la introducción de ácidos nucleicos o terapias basadas en células que contienen los ácidos nucleicos modificados aquí proporcionados, en donde los ácidos nucleicos modificados codifican para una proteína que antagoniza o supera de otro modo la actividad proteica aberrante presente en la célula del sujeto. Los ejemplos específicos de una proteína disfuncional son las variantes de mutación sin sentido del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que producen una variante proteica disfuncional de la proteína CFTR, que provoca la fibrosis quística.

50 Múltiples enfermedades se caracterizan por la ausencia (o disminución sustancial de tal manera que no se produce la función proteica adecuada) de la actividad proteica. Dichas proteínas pueden no estar presentes o ser esencialmente no funcionales. La presente descripción permite el tratamiento de tales afecciones o enfermedades en un sujeto mediante la introducción de ácidos nucleicos o terapias basadas en células que contienen los ácidos nucleicos modificados aquí proporcionados, en donde los ácidos nucleicos modificados codifican para una proteína que reemplaza la actividad proteica que falta en las células diana del sujeto. Los ejemplos específicos de una proteína disfuncional son las variantes de mutación sin sentido del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que producen una variante proteica disfuncional de la proteína CFTR, que provoca la fibrosis quística.

60 El tratamiento de la fibrosis quística en un sujeto mamífero puede conseguirse poniendo en contacto una célula del sujeto con un ácido nucleico modificado que tenga una región traducible que codifique un polipéptido CFTR funcional, en condiciones tales que una cantidad efectiva del polipéptido CFTR está presente en la célula. Las células diana preferidas son las células epiteliales, tales como las de pulmón, y los procedimientos de administración se determinan teniendo en cuenta el tejido diana; es decir, para la administración pulmonar, las moléculas de ARN se formulan para administración por inhalación.

En otra realización, la presente descripción permite el tratamiento de la hiperlipidemia en un sujeto, introduciendo en una población celular del sujeto una molécula de ARNm modificada que codifica sortilina, una proteína recientemente caracterizada por estudios genómicos, mejorando así la hiperlipidemia en un sujeto. El gen *SORT1* codifica una proteína transmembrana de la red trans-Golgi (TGN) llamada sortilina. Los estudios genéticos han demostrado que uno de cada cinco individuos tiene un polimorfismo de un solo nucleótido, rs12740374, en el locus 1p13 del gen *SORT1* que los predispone a tener niveles bajos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Cada copia del alelo menor, presente en alrededor del 30 % de las personas, altera el colesterol LDL en 8 mg/dl, mientras que dos copias del alelo menor, presente en alrededor del 5 % de la población, reduce el colesterol LDL 16 mg/dl. También se ha demostrado que los vehículos del alelo menor tienen un 40 % menos de riesgo de infarto de miocardio. Los estudios funcionales *in vivo* en ratones describen que la sobreexpresión de *SORT1* en tejido hepático de ratón condujo a niveles de colesterol LDL significativamente más bajos, hasta un 80 % más bajos, y que silenciar *SORT1* aumentó el colesterol LDL aproximadamente en un 200 % (Musunuru K y col. From noncoding variant to phenotype via *SORT1* at the 1p13 cholesterol locus. Nature 2010; 466: 714-721).

#### Procedimientos de suministro de ácido nucleico celular

La administración *in vivo* de un ácido nucleico puede mejorarse. Por ejemplo, una composición que contiene un ácido nucleico mejorado también contiene generalmente un reactivo de transfección u otro compuesto que aumenta la eficiencia de la absorción del ácido nucleico mejorado en las células huésped. El ácido nucleico mejorado presenta una retención mejorada en la población celular, en relación con un ácido nucleico no modificado correspondiente. La retención del ácido nucleico mejorado es mayor que la retención del ácido nucleico no modificado. En algunas realizaciones, es de al menos alrededor del 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 100 %, 150 %, 200 % o más del 200 % mayor que la retención del ácido nucleico no modificado. Dicha ventaja de retención puede lograrse mediante una ronda de transfección con el ácido nucleico mejorado, o puede obtenerse después de repetidas rondas de transfección.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico mejorado se administra a una población de células diana con uno o más ácidos nucleicos adicionales. Dicha administración puede ser al mismo tiempo, o el ácido nucleico mejorado se administra antes de la administración del uno o más ácidos nucleicos adicionales. El uno o más ácidos nucleicos adicionales pueden ser ácidos nucleicos modificados o ácidos nucleicos no modificados. Se entiende que la presencia inicial de los ácidos nucleicos mejorados no induce sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de la población celular y, además, que la respuesta inmunitaria innata no se activará por la presencia posterior de los ácidos nucleicos no modificados. A este respecto, el ácido nucleico mejorado puede no contener por sí mismo una región traducible, si la proteína que se desea que esté presente en la población de células diana se traduce a partir de los ácidos nucleicos no modificados.

#### Restos de direccionamiento

En algunas realizaciones, se proporcionan ácidos nucleicos modificados para expresar un componente asociado de unión a proteínas o un receptor en la superficie de la célula, que funciona para dirigir la célula a un espacio de tejido específico o para interactuar con un resto específico, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Los componentes asociados de unión a proteínas adecuados incluyen anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos, proteínas estructurales o péptidos. Además, se pueden emplear ácidos nucleicos modificados para dirigir la síntesis y la localización extracelular de lípidos, carbohidratos u otros restos biológicos.

#### Silenciamiento permanente de la expresión génica

El ARNm se puede usar en un procedimiento para silenciar epigenéticamente la expresión génica en un sujeto mamífero, que comprende el ARNm en el que la región traducible codifica un polipéptido o polipéptidos capaces de dirigir la metilación de la histona H3 específica de secuencia para iniciar la formación de heterocromatina y reducir la transcripción génica alrededor de genes específicos con el fin de silenciar el gen. Por ejemplo, una mutación de ganancia de función en el gen Janus Kinase 2 es responsable de la familia de enfermedades mieloproliferativas.

#### Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente una o más sustancias terapéuticamente activas adicionales. En algunas realizaciones, las composiciones se administran a seres humanos. A los efectos de la presente descripción, la expresión "ingrediente activo" se refiere, en general, a un complejo que contiene proteínas como se describe en esta invención.

Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta invención se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para su administración a seres humanos, el experto en la materia entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para su administración a animales de todo tipo. La modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para

su administración a seres humanos con el fin de hacer las composiciones adecuadas para su administración a diversos animales es bien conocida, y el farmacólogo veterinario con experiencia habitual puede diseñar y/o realizar dicha modificación con experimentación, si es que la hay, meramente habitual. Los sujetos para los cuales se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y/u otros primates; mamíferos, incluyendo mamíferos pertinentes en términos comerciales, tales como ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, gatos, perros, ratones y/o ratas; y/o aves, incluyendo aves pertinentes en términos comerciales, tales como pollos, patos, gansos y/o pavos.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido o que se desarrolle posteriormente en la técnica de la farmacología. En general, dichos procedimientos de preparación incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con un excipiente y/o uno o más de otros ingredientes adicionales, y a continuación, si es necesario y/o deseable, conformar y/o envasar el producto en una unidad de dosis única o múltiple deseada.

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

Las cantidades relativas del ingrediente activo, el excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica según la presente descripción variarán conforme a la identidad, el tamaño y/o la condición del sujeto tratado y adicionalmente según la vía por la que se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1 % y el 100 % (p/p) de ingrediente activo.

Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, el cual, como se usa en esta invención, incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes, y similares, según se adapte a la forma de dosificación particular deseada. Remington the Science and Practice of Pharmacy, 21.<sup>a</sup> edición, A.R. Gennaro (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) describe diversos excipientes utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Salvo en la medida en que cualquier medio excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como al producir cualquier efecto biológico no deseado o en la interacción de otro modo de forma nociva con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, su uso está contemplado dentro del ámbito de la presente descripción.

En algunas realizaciones, un excipiente farmacéuticamente aceptable tiene una pureza de al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %. En algunas realizaciones, un excipiente se aprueba para su uso en seres humanos y para uso veterinario. En algunas realizaciones, un excipiente está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos. En algunas realizaciones, un excipiente tiene un grado farmacéutico. En algunos casos, un excipiente cumple con los estándares de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea europea (EP), la Farmacopea británica y/o la Farmacopea internacional.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes dispersantes y/o granulantes, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes tamponadores, agentes lubricantes y/o aceites. Dichos excipientes pueden incluirse opcionalmente en formulaciones farmacéuticas. Los excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y/o perfumantes pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

Los diluyentes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, carbonato de sodio, fosfato de calcio, fosfato de dicalcio, sulfato de calcio, hidrogenofosfato de calcio, fosfato de sodio, lactosa, sacarosa, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, sorbitol, inositol, cloruro de sodio, almidón seco, almidón de maíz, azúcar en polvo, *etc.*, y/o combinaciones de los mismos.

Los agentes de granulación y/o dispersión ejemplares incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato de almidón de sodio, arcillas, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio de cationes, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio, poli(vinil-pirrolidona) reticulada (crospovidona), almidón de carboximetilo de sodio (glicolato de almidón de sodio), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio reticulada (croscarmelosa), metilcelulosa, almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino,

almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio, aluminosilicato de magnesio (Veegum), laurilsulfato de sodio, compuestos de amonio cuaternario, *etc.*, y/o combinaciones de los mismos.

5 Los agentes tensioactivos y/o emulsionantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, emulsionantes naturales (por ejemplo, acacia, agar, ácido alginico, alginato de sodio, tragacanto, chondrux, colesterol, xantana, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, lanolina, colesterol, cera y lecitina), arcillas coloidales (por ejemplo, bentonita [silicato de aluminio] y Veegum® [aluminosilicato de magnesio]), derivados de aminoácidos de cadena larga, alcoholes de peso molecular alto (por ejemplo, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol oleílico, monoestearato de triacetina, diestearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo y monoestearato de propilenglicol, alcohol polivinílico), carbómeros (por ejemplo, carboxipolimetileno, ácido poliacrílico, polímero de ácido acrílico y polímero de carboxivinilo), carragenano, derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monolaurato de sorbitán polioxietileno [Tween®20], polioxietileno de sorbitán [Tween®60], monooleato de sorbitán polioxietileno [Tween®80], monopalmitato de sorbitán [Span®40], monoestearato de sorbitán [Span®60], triestearato de sorbitán [Span®65], monooleato de glicerilo, monooleato de sorbitán [Span®80]), ésteres de polioxietileno (por ejemplo, monoestearato de polioxietileno [Myr®45], aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, estearato de polioximetileno y Solutol®), ésteres de ácido graso de sacarosa, ésteres de ácido graso de polietilenglicol (por ejemplo, Cremophor®), éteres de polioxietileno (por ejemplo, lauril éter de polioxietileno [Brij®30]), poli(vinilpirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, lauril sulfato de sodio, Pluronic®F 68, Poloxamer®188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato de sodio, *etc.*, y/o combinaciones de los mismos.

25 Los agentes aglutinantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, almidón (por ejemplo, almidón de maíz y pasta de almidón), gelatina; azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa, dextrina, melaza, lactosa, lactitol, manitol,); gomas naturales y sintéticas (por ejemplo, acacia, alginato de sodio, extracto de musgo irlandés, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscara de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, poli(vinil-pirrolidona), aluminosilicato de magnesio (Veegum®), y arabogalactano de lárice); alginatos; óxido de polietileno; polietilenglicol; sales inorgánicas de calcio; ácido silícico; polimetacrilatos; ceras; agua; alcohol; *etc.*; y combinaciones de los mismos.

35 Los conservantes ejemplares pueden incluir, pero no se limitan a, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes de alcohol, conservantes ácidos, y/u otros conservantes. Los antioxidantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de acorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y/o sulfito de sodio. Los agentes quelantes ejemplares incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidrato, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato sódico, ácido tartárico y/o edetato trisódico. Los conservantes antimicrobianos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, fenetidina, fenetidina, imidureaxidinio, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y/o timerosal.

45 Conservantes antifúngicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, butil paraben, metil paraben, etil paraben, propil paraben, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y/o ácido sórbico. Los conservantes de alcohol ejemplares incluyen, pero no se limitan a, etanol, polietilenglicol, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o alcohol feniletílico. Los conservantes ácidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroacético, ácido ascórbico, ácido sórbico y/o ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero no se limitan a, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitoluenado butilado (BHT), etilendiamina, lauril sulfato de sodio (SLS), lauril éter sulfato de sodio (SLES), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio, metabisulfito de potasio, Glydant Plus®, Phenonip®, metilparabeno, Germall®115, Germaben®II, Neolone™, Kathon™ y/o Euxyl®.

60 Los agentes tamponadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, soluciones tampón de citrato, soluciones tampón de acetato, soluciones tampón de fosfato, cloruro de amonio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, glubionato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, ácido d-glucónico, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, ácido propanoico, levulinato de calcio, ácido pentanoico, fosfato de calcio dibásico, ácido fosfórico, fosfato de calcio tribásico, hidróxido fosfato de calcio, acetato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, mezclas de potasio, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, mezclas de fosfato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, lactato de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, mezclas de fosfato de sodio, trometamina, hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio, ácido alginico, agua sin pirógenos, solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico, *etc.*, y/o combinaciones de los mismos.

Los agentes lubricantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, sílice, talco, malta, behenato de glicerilo, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, lauril sulfato de magnesio, lauril sulfato de sodio, etc., y combinaciones de los mismos.

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

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

Se pueden formular las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, según la técnica conocida utilizando agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles pueden ser soluciones, suspensiones y/o emulsiones inyectables estériles en diluyentes y/o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicos, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los solventes y vehículos aceptables que pueden ser empleados se encuentran agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como un solvente o medio de suspensión. A tales efectos, se puede emplear cualquier aceite no volátil insípido, inclusive mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como el ácido oleico se pueden usar en la preparación de inyectables.

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

Para prolongar el efecto de un ingrediente activo, a menudo es deseable retardar la absorción del ingrediente activo por inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con una escasa solubilidad en agua. Entonces, la velocidad de absorción del fármaco depende de su velocidad de disolución, la que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. De manera alternativa, la absorción retardada de una forma de fármaco administrado parenteralmente se logra al disolver o suspender el fármaco en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices de microcápsulas de los fármacos en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. En función de la relación del fármaco respecto al polímero y de la naturaleza del polímero particular utilizado se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de depósito inyectables se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las composiciones para la administración rectal o vaginal son típicamente supositorios que pueden prepararse mezclando las composiciones con excipientes no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio, los cuales son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se derriten en el recto o cavidad vaginal y liberan el ingrediente activo.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, un ingrediente activo se mezcla con al menos un excipiente inerte farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cargas o diluyentes (*por ejemplo*, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico), aglutinantes (*por ejemplo*, 5 carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia), humectantes (*por ejemplo*, glicerol), agentes desintegrantes (*por ejemplo*, agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio), agentes retardantes de la solución (*por ejemplo*, parafina), aceleradores de absorción (*por ejemplo*, compuestos de amonio cuaternario), agentes humectantes (*por ejemplo*, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol), absorbentes (*por ejemplo*, caolín y 10 arcilla de bentonita) y lubricantes (*por ejemplo*, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio), y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y pastillas, las formas de dosificación pueden comprender agentes tamponadores.

Las composiciones sólidas de un tipo similar se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto 15 peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden comprender agentes opacificantes y pueden ser de una composición que liberen el ingrediente o ingredientes activos solo, 20 o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto 25 peso molecular y similares.

Las formas de dosificación para administración tópica y/o transdérmica de una composición pueden incluir ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, atomizadores, inhaladores y/o parches. Generalmente, un ingrediente activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente farmacéuticamente 30 aceptable y/o cualquier conservante y/o tampón necesario, según sea necesario. Además, la presente descripción contempla el uso de parches transdérmicos, que a menudo tienen la ventaja adicional de proporcionar una administración controlada de un compuesto al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo y/o dispersando el compuesto en el medio apropiado. Como alternativa o adicionalmente, la velocidad se puede controlar ya sea proporcionando una membrana de control de velocidad y/o mediante la dispersión del compuesto en un gel y/o una matriz polimérica. 35

Los dispositivos adecuados para usar en la administración de composiciones farmacéuticas intradérmicas descritas en esta invención incluyen dispositivos de aguja corta, tales como los que se describen en las Patentes de EE.UU. 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; y 5.417.662. Las composiciones intradérmicas se pueden administrar mediante dispositivos que limitan la 40 extensión de penetración efectiva de una aguja en la piel, tales como los que se describen en la publicación PCT WO99/34850 y equivalentes funcionales del mismo. Son adecuados los dispositivos de inyección a chorro que administran las composiciones líquidas a la dermis mediante un inyector a chorro de líquidos y/o mediante una aguja que perfora la capa córnea y que produce un chorro que alcanza la dermis. Se describen dispositivos de inyección a chorro, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. 5.480,381; 5,599,302; 5,334,144; 5,993,412; 45 5,649,912; 5,569,189; 5,704,911; 5,383,851; 5,893,397; 5,466,220; 5,339,163; 5,312,335; 5,503,627; 5,064,413; 5,520,639; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 4,940,460; y las publicaciones PCT WO 97/37705 y WO 97/13537. Son adecuados los dispositivos balísticos de administración de polvo/partículas que utilizan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel hasta la dermis. Como alternativa o adicionalmente, se pueden usar jeringas convencionales en el procedimiento clásico de 50 administración intradérmica de mantoux.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen, pero no se limitan a, preparaciones líquidas y/o semilíquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua y/o de agua en aceite 55 tales como cremas, ungüentos y/o pastas y/o soluciones y/o suspensiones. Las formulaciones administrables tópicamente pueden comprender, por ejemplo, de alrededor del 1 % a alrededor del 10 % (p/p) de ingrediente activo, aunque la concentración de ingrediente activo puede ser tan alta como el límite de solubilidad del ingrediente activo en el disolvente. Las formulaciones para administración tópica pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en esta invención.

Se puede preparar, empaquetar y/o vender una composición farmacéutica en una formulación adecuada para 60 administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Dicha formulación puede comprender partículas secas que comprenden el ingrediente activo y que tienen un diámetro en el intervalo de alrededor de 0,5 nm a alrededor de 7 nm o de alrededor de 1 nm a alrededor de 6 nm. De manera conveniente, dichas composiciones se encuentran en forma de polvos secos para su administración con un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que es posible dirigir una corriente de propulsor para dispersar el polvo y/o utilizar un recipiente 65 dispensador de disolvente/polvo autopropulsor tal como un dispositivo que comprende el ingrediente activo

5 disuelto y/o suspendido en un propulsor de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Dichos polvos comprenden partículas en donde al menos el 98 % de las partículas en peso tienen un diámetro superior a 0,5 nm y al menos el 95 % de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 7 nm. Alternativamente, al menos el 95 % de las partículas en peso tienen un diámetro mayor de 1 nm y al menos el 90 % de las partículas en número tienen un diámetro menor de 6 nm. Las composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente de polvo fino sólido tal como azúcar y se proporcionan convenientemente en forma de dosis unitaria.

10 Los propulsores de bajo punto de ebullición generalmente incluyen propulsores líquidos que tienen un punto de ebullición por debajo de 65 °F a presión atmosférica. Generalmente, el propulsor puede constituir del 50 % al 99,9 % (p/p) de la composición, y el ingrediente activo puede constituir del 0,1 % al 20 % (p/p) de la composición. Un propulsor puede comprender además ingredientes adicionales tales como un tensioactivo líquido no iónico y/o aniónico sólido y/o un diluyente sólido (que puede tener un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que comprenden el ingrediente activo).

15 Las composiciones farmacéuticas formuladas para administración pulmonar pueden proporcionar un ingrediente activo en forma de gotitas de una solución y/o suspensión. Dichas formulaciones pueden prepararse, empaquetarse y/o venderse como soluciones y/o suspensiones acuosas y/o alcohólicas diluidas, opcionalmente estériles, que comprenden ingrediente activo, y pueden administrarse convenientemente usando cualquier dispositivo de nebulización y/o atomización. Dichas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, un agente aromatizante como sacarina sódica, un aceite volátil, un agente tamponador, un agente tensioactivo y/o un conservante como metilhidroxibenzoato. Las gotitas proporcionadas por esta vía de administración pueden tener un diámetro promedio en el intervalo de alrededor de 0,1 nm a alrededor de 200 nm.

25 Las formulaciones descritas en esta invención como útiles para la administración pulmonar son útiles para la administración intranasal de una composición farmacéutica. Otra formulación adecuada para la administración intranasal es un polvo grueso que comprende el ingrediente activo y que tiene una partícula promedio de alrededor de 0,2 µm a 500 µm. Dicha formulación se administra de la manera en que se toma el rapé, *es decir*, mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de la nariz.

30 Las formulaciones adecuadas para la administración nasal pueden comprender, por ejemplo, desde alrededor de tan solo un 0,1 % (p/p) hasta un 100 % (p/p) de ingrediente activo, y pueden comprender uno o más de los ingredientes adicionales descritos en esta invención. Se puede preparar, empaquetar y/o vender una composición farmacéutica en una formulación adecuada para administración bucal. Tales formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de comprimidos y/o pastillas preparadas usando procedimientos convencionales, y pueden, por ejemplo, de 0,1 % a 20 % (p/p) de ingrediente activo, comprendiendo el resto un ingrediente activo que se disuelve por vía oral y/o composición degradable y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en esta invención. Alternativamente, las formulaciones adecuadas para la administración bucal pueden comprender un polvo y/o una solución y/o suspensión aerosolizada y/o atomizada que comprende un ingrediente activo. Dichas formulaciones en polvo, aerosolizadas y/o en aerosol, cuando se dispersan, pueden tener un tamaño promedio de partículas y/o gotas en el intervalo de alrededor de 0,1 nm a alrededor de 200 nm, y pueden comprender además uno o más de cualquiera de los ingredientes adicionales descritos en esta invención.

45 Se puede preparar, empaquetar y/o vender una composición farmacéutica en una formulación adecuada para administración oftálmica. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de gotas para los ojos que incluyen, por ejemplo, una solución y/o suspensión al 0,1/1,0 % (p/p) del ingrediente activo en un excipiente líquido acuoso u oleoso. Dichas gotas pueden comprender además agentes tamponadores, sales y/o uno o más de cualquiera de los ingredientes adicionales descrito en esta invención. Otras formulaciones que se pueden administrar de forma oftálmica útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina y/o en una preparación liposomal. Se contempla que las gotas para los oídos y/o las gotas oftálmicas quedan comprendidas en el alcance de la presente descripción.

55 Es posible encontrar consideraciones generales de la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

#### Administración

60 La presente descripción permite la administración de proteínas o complejos según la presente descripción a un sujeto que lo necesite. Los complejos, o composiciones farmacéuticas o profilácticas de los mismos se pueden administrar a un sujeto usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración efectiva para prevenir, tratar, diagnosticar u obtener imágenes de una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, una enfermedad, trastorno y/o afección relacionada con déficits de memoria de trabajo). La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la

gravedad de la enfermedad, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad, y similares. Las composiciones se formulan típicamente en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente descripción lo decidirá el médico responsable dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis de formación de imágenes específico terapéuticamente efectivo, profilácticamente efectivo o apropiado para cualquier paciente particular dependerán de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. En algunas realizaciones, los complejos, y/o las composiciones farmacéuticas o profilácticas se administran mediante inyección intravenosa sistémica. En determinadas realizaciones, los complejos y/o las composiciones farmacéuticas o profilácticas pueden administrarse por vía intravenosa y/u oral. En determinadas realizaciones, los complejos, y/o las composiciones farmacéuticas o profilácticas pueden administrarse de una manera que permita que la proteína o el complejo atraviese la barrera hematoencefálica, la barrera vascular u otra barrera epitelial.

Sin embargo, la presente descripción abarca a la administración de proteínas o complejos, y/o composiciones farmacéuticas o profilácticas de las mismas por cualquier vía apropiada teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias de la administración de fármacos.

En general, la vía de administración más apropiada dependerá de una variedad de factores, incluida la naturaleza del complejo que comprende proteínas asociadas con al menos un agente que se administrará (*por ejemplo*, su estabilidad en el entorno del tracto gastrointestinal, torrente sanguíneo, *etc.*), la condición del paciente (*por ejemplo*, si el paciente es capaz de tolerar determinadas vías de administración), *etc.* La presente descripción abarca a la administración de las composiciones farmacéuticas o profilácticas por cualquier vía apropiada teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias de la administración de fármacos.

En ciertas realizaciones, las composiciones según la presente descripción pueden administrarse en niveles de dosificación suficientes para administrar de alrededor de 0,0001 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg, de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg, de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 40 mg/kg, de alrededor de 0,5 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg, de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, o de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 25 mg/kg del peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico o profiláctico deseado. La dosis deseada se puede administrar tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tercer día, semanalmente, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. En ciertas realizaciones, la dosis deseada se puede administrar usando múltiples administraciones (*por ejemplo*, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, o más administraciones).

Los complejos se pueden usar en combinación con uno o más agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de formación de imágenes. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deben administrarse al mismo tiempo y/o que deben formularse para su administración conjunta, aunque estos procedimientos de administración están dentro del alcance de la presente descripción. Las composiciones se pueden administrar simultáneamente con, antes o después de, uno o más de otros procedimientos terapéuticos o médicos deseados. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o según un calendario determinado para ese agente. En algunas realizaciones, la presente descripción abarca la administración de composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de formación de imágenes en combinación con agentes que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción y/o modifican su distribución dentro del cuerpo.

Se apreciará además que los agentes activos terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de formación de imágenes utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una sola composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, se espera que los agentes utilizados en combinación se utilicen en niveles que no excedan los niveles en los que se utilizan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles utilizados en combinación serán inferiores a los utilizados individualmente.

La combinación particular de terapias (productos terapéuticos o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación deberá tener en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y/o los procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado a conseguir. También se apreciará que las terapias empleadas pueden alcanzar un efecto deseado para el mismo trastorno (*por ejemplo*, se puede administrar una composición útil para tratar el cáncer según la presente descripción simultáneamente con un agente quimioterapéutico), o pueden alcanzar efectos diferentes (*por ejemplo*, control de cualquier efecto adverso).

#### Kits

La presente descripción proporciona una variedad de kits para llevar a cabo conveniente y/o eficazmente la

presente descripción. Típicamente, los kits comprenderán números y/o cantidades suficientes de componentes para permitir que un usuario realice múltiples tratamientos de un sujeto o sujetos.

5 El ARNm para uso de la invención puede estar comprendido en cualquiera de los kits siguientes. En un aspecto, la descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado según las reivindicaciones, en donde el ácido nucleico es capaz de evadir una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el primer ácido nucleico aislado, y empaque e instrucciones.

10 En otras realizaciones, el ARNm comprende además un nucleósido seleccionado de entre el grupo que consiste en 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina.

15 En otras realizaciones, el ARNm comprende además un nucleósido seleccionado de entre el grupo que consiste en 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil) adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonil carbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina y 2-metoxi-adenina.

25 En otras realizaciones, el ARNm comprende además un nucleósido seleccionado de entre el grupo que consiste en inosina, 1-metil-inosina, wyosina, wybutosina, 7-deaza-guanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosa, N2-metilguanosa, N2,N2-dimetilguanosa, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

Ejemplos

35 La invención se describe además en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Transcripción in vitro de ARNm modificado

*Materiales y procedimientos*

40 Los ARNm modificados (ARNmod) se fabricaron utilizando procedimientos y materiales de laboratorio estándar para la transcripción in vitro, con la excepción de que la mezcla de nucleótidos contenía nucleótidos modificados. El marco de lectura abierto (ORF) del gen de interés está flanqueado por una región no traducida (UTR) 5' que contiene una fuerte señal de iniciación de la traducción Kozak y una UTR 3' de globina alfa que termina con una secuencia de oligo(dT) para la adición moldeada de una cola poliA para ARNmod que no incorporan análogos de adenosina. Los ARNmod que contienen adenosina se sintetizaron sin una secuencia de oligo (dT) para permitir la formación de cola poli(A) de poli(A) polimerasa posterior a la transcripción. Los ARNmod se modificaron mediante la incorporación de nucleótidos modificados químicamente indicados en la Tabla 3 (a continuación) durante la transcripción in vitro con el 100 % de sustitución del nucleótido natural correspondiente o la sustitución parcial del nucleótido natural correspondiente en el porcentaje indicado.

La Tabla 3 indica la identidad química de cada nucleótido modificado químicamente distinto incorporado en un ARNm modificado con el número de designación química dado.

55 Tabla 3

<b><u>Nucleótido modificado</u></b>	<b><u>Química n.º</u></b>	<b><u>Combinación de nucleótidos modificados</u></b>	<b><u>Química n.º</u></b>
6-aza-citidina	Quím 1	α-tio-citidina/5-yodo-uridina	Quím 29
2-tio-citidina	Quím 2	α-tio-citidina/N1-metil-pseudo-uridina	Quím 30
α-tio-citidina	Quím 3	α-tio-citidina/α-tio-uridina	Quím 31
Pseudo-iso-citidina	Quím 4	α-tio-citidina/5-metil-uridina	Quím 32

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Química n.º</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>	<u>Química n.º</u>
5-aminoalil-uridina	Quím 5	$\alpha$ -tio-citidina/pseudo-uridina	Quím 33
5-yodo-uridina	Quím 6	Pseudo-iso-citidina/5-yodo-uridina	Quím 34
N1-metil-pseudouridina	Quím 7	Pseudo-iso-citidina/N1-metil-pseudo-uridina	Quím 35
5,6-dihidrouridina	Quím 8	Pseudo-iso-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina	Quím 36
$\alpha$ -tio-uridina	Quím 9	Pseudo-iso-citidina/5-metil-uridina	Quím 37
4-tio-uridina	Quím 10	Pseudo-iso-citidina/Pseudo-uridina	Quím 38
6-aza-uridina	Quím 11	Pirroló-citidina	Quím 39
5-hidroxi-uridina	Quím 12	Pirroló-citidina/5-yodo-uridina	Quím 40
Desoxi-timidina	Quím 13	Pirroló-citidina/N1-metil-pseudo-uridina	Quím 41
Pseudo-uridina	Quím 14	Pirroló-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina	Quím 42
Inosina	Quím 15	Pirroló-citidina/5-metil-uridina	Quím 43
$\alpha$ -tio-guanosina	Quím 16	Pirroló-citidina/Pseudo-uridina	Quím 44
8-oxo-guanosina	Quím 17	5-metil-citidina/5-yodo-uridina	Quím 45
O6-metil-guanosina	Quím 18	5-metil-citidina/N1-metil-pseudo-uridina	Quím 46
7-deaza-guanosina	Quím 19	5-metil-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina	Quím 47
Sin modificación	Quím 20	5-metil-citidina/5-metil-uridina	Quím 48
N1-metil-adenosina	Quím 21	5-metil-citidina/Pseudo-uridina	Quím 49
2-amino-6-Cloro-purina	Quím 22	5-metil-citidina	Quím 50
N6-metil-2-aminopurina	Quím 23	25 % de Pseudo-iso-citidina	Quím 51
6-Cloro-purina	Quím 24	25 % de N1-metil-pseudo-uridina	Quím 52
N6-metil-adenosina	Quím 25	25 % de N1-Metil-pseudo-uridina/75 % de pseudo-uridina	Quím 53
$\alpha$ -tio-adenosina	Quím 26	5-metil-uridina	Quím 54
8-azido-adenosina	Quím 27	5-yodo-citidina	Quím 55
7-deaza-adenosina	Quím 28		

5 **Electroforesis en gel de agarosa de ARNmod:** se cargaron ARNmod individuales (200-400 ng en un volumen de 20  $\mu$ l) en un pocillo de agarosa E-Gel al 1,2 % no desnaturizante (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se corrieron durante 12-15 minutos según el protocolo del fabricante (Fig. 1A). Las Tablas 4 y 5 a continuación indican el nucleótido modificado (Tabla 4) o el ácido nucleico (Tabla 5) cargado en cada carril. Estos datos indican qué nucleótidos modificados químicamente se transcribieron en ARNm modificados químicamente y la calidad de cada ARNmod individual. Estos datos demuestran que los nucleótidos con modificaciones químicas en la cara del surco mayor y del surco menor del nucleótido eran capaces de transcribirse en un ARNmod.

Tabla 4

Carril	NTP modificado
1	$\alpha$ -tio-citidina
2	Pseudo-iso-citidina
3	5-aminoalil-uridina
4	5-yodo-uridina
5	N1-metil-pseudo-uridina
6	$\alpha$ -tio-uridina
7	4-tio-uridina
8	5-hidroxi-uridina
9	Desoxi-timidina
10	Pseudo-uridina
11	Inosina
12	$\alpha$ -tio-guanosina
13	8-oxo-guanosina
14	N1-metil-guanosina
15	O6-metil-guanosina
16	Sin modificación
17	N1-metil-adenosina
18	2-amino-6-Cloro-purina
19	N6-metil-2-amino-purina
20	6-Cloro-purina
21	$\alpha$ -tio-adenosina
22	8-azido-adenosina
23	7-deaza-adenosina
24	6-aza-citidina
25	2-tio-citidina
26	5,6-dihidro-uridina
27	6-aza-uridina
28	7-deaza-guanosina
29	N6-metil-adenosina

Tabla 5

Carril	Combinación de NTP modificados
1	$\alpha$ -tio-citidina/5-yodo-uridina
2	$\alpha$ -tio-citidina/N1-metil-pseudouridina
3	$\alpha$ -tio-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
4	$\alpha$ -tio-citidina/5-metil-uridina
5	$\alpha$ -tio-citidina/pseudouridina
6	5-yodo-citidina/5-yodo-uridina
7	5-yodo-citidina/N1-metil-pseudouridina
8	5-yodo-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
9	5-yodo-citidina/5-metil-uridina
10	5-yodo-citidina/pseudouridina
11	Pseudo-iso-citidina/5-yodo-uridina
12	Pirrol-citidina
13	Pirrol-citidina/5-yodo-uridina
14	Pirrol-citidina/N1-metil-pseudouridina
15	Pirrol-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
16	Pirrol-citidina/5-metil-uridina
17	Pirrol-citidina/pseudouridina
18	5-metil-citidina/5-yodo-uridina
19	5-metil-citidina/N1-metil-uridina
20	5-metil-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
21	5-metil-citidina/5-metil-uridina
22	5-metil-citidina/pseudouridina
23	Pseudo-iso-citidina/N1-metil-pseudouridina
24	Pseudo-iso-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
25	Pseudo-iso-citidina/5-metil-uridina
26	Pseudo-iso-citidina/pseudouridina
27	5-metil-citidina
28	25 % de pseudo-iso-citidina
29	25 % de N1-metil-pseudouridina
30	25 % de N1-metil-pseudouridina/75 % de pseudouridina

5 **Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR:** se cargaron productos de PCR de la transcripción inversa individual (200-400 ng) en un pocillo de agarosa E-Gel al 1,2 % no desnaturizante (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se corrieron durante 12-15 minutos según el protocolo del fabricante (Fig. 1B). La Tabla 5 a continuación indica el nucleótido modificado cargado en cada carril.

10 **Cuantificación de ARNmod con Nanodrop y datos espectrales UV:** los ARNmod en tampón TE (1  $\mu$ l) se utilizaron para las lecturas de absorbancia UV de Nanodrop para cuantificar el rendimiento de cada ARNmod a partir de una reacción de transcripción *in vitro* (las trazas de absorbancia de UV se muestran en las Figuras 6A-6L). Estos datos indican qué nucleótidos modificados químicamente se transcribieron en ARNm modificados químicamente. Estos datos también demuestran que los nucleótidos con modificaciones químicas en la cara del surco mayor y del surco menor del nucleótido eran capaces de transcribirse en un ARNmod. Estos datos demuestran además que los nucleótidos de la presente invención son aptos para la transcripción y compatibles con la incorporación en un ARNmod, que puede tener espectros UV alterados debido a la presencia de un nucleótido modificado dado. Por ejemplo, los ARNmod que contienen Pirrolo-C tienen un aumento en la absorbancia UV a una longitud de onda más baja debido a la presencia del anillo de pirrolo del nucleótido C modificado. En otro ejemplo, los ARNmod que contienen nucleótidos de 2-amino-adenina tienen

un aumento en la absorbancia UV a una longitud de onda más alta debido a la presencia de una amina exocíclica fuera del anillo de purina. Los nucleótidos que no son aptos para la transcripción y no pueden incorporarse en un ARNmod tienen un espectro UV mezclado que indica que no hay producto de la reacción de transcripción.

5

#### Ejemplo 2. Transfección de ARN modificado

**Transfección inversa:** para los experimentos realizados en una placa de cultivo de tejidos recubierta de colágeno de 24 pocillos, se sembraron queratinocitos a una densidad celular de  $1 \times 10^5$ . Para los experimentos realizados en una placa de cultivo de tejidos recubierta de colágeno de 96 pocillos, se sembraron queratinocitos a una densidad celular de  $0,5 \times 10^5$ . Para cada ARNmod a transfectar, se preparó ARNmod: RNAiMAX como se ha descrito y se mezcló con las células en la placa multipocillo dentro de un período de tiempo, por ejemplo, 6 horas, desde la siembra celular antes de que las células se adhirieran a la placa de cultivo de tejido.

**Transfección directa:** en una placa de cultivo de tejidos recubierta de colágeno de 24 pocillos, se sembraron queratinocitos a una densidad celular de  $0,7 \times 10^5$ . Para los experimentos realizados en una placa de cultivo de tejidos recubierta de colágeno de 96 pocillos, se sembraron queratinocitos a una densidad celular de  $0,3 \times 10^5$ . A continuación, los queratinocitos se cultivaron hasta una confluencia de  $>70\%$  durante más de 24 horas. Para cada ARNmod a transfectar, se preparó ARNmod: RNAiMAX como se ha descrito y se transfectó en las células de la placa de múltiples pocillos durante 24 horas después de la siembra celular y la adherencia a la placa de cultivo de tejidos.

#### Cribado de traducción de ARNmod: G-CSF ELISA

Las Fig. 2A y 2B muestran un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (hu-G-CSF) de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro*. Los queratinocitos se cultivaron en medio EpiLife con Suplemento S7 de Invitrogen en una confluencia de  $>70\%$ . Fig. 2A Los queratinocitos se transfectaron inversamente con 300 ng del ARNm modificado químicamente indicado en complejo con RNAiMAX de Invitrogen. Fig. 2B Los queratinocitos se transfectaron directamente con 300 ng de ARNmod en complejo con RNAiMAX de Invitrogen. El complejo ARN:RNAiMAX se formó incubando primero el ARN con medios EpiLife sin suplemento en una dilución volumétrica 5X durante 10 minutos a temperatura ambiente. En un segundo vial, el reactivo RNAiMAX se incubó con medios EpiLife sin suplemento en una dilución volumétrica 10X durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el vial de ARN se mezcló con el vial de RNAiMAX y se incubó durante 20-30 a temperatura ambiente antes de añadirlo a las células gota a gota. La concentración de huG-CSF secretada en el medio de cultivo se midió 18 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente por triplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de queratinocitos humanos transfectados se cuantificó utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems (Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. Estos datos muestran que los ARNmod de huG-CSF compuestos por análogos de nucleótidos químicamente distintos (SEQ ID NO: 2) pueden traducirse en células de queratinocitos humanos y que huG-CSF se transporta fuera de las células y se libera en el entorno extracelular. Estos datos indican que nucleótidos modificados se tradujeron en proteína cuando se incorporaron a un ARNm modificado químicamente. Estos datos muestran que los nucleótidos que contienen ARN modificado con modificaciones químicas en la cara del surco mayor de los análogos de pirimidina tienen los niveles más altos de hu-G-CSF secretado en el medio de cultivo celular.

#### Dosis y duración de ARNmod: G-CSF ELISA

Las Fig. 3A-N muestran ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro*. Los queratinocitos se cultivaron en medio EpiLife con Suplemento S7 de Invitrogen en una confluencia de  $>70\%$ . Los queratinocitos se transfectaron inversamente con 0 ng, 46,875 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng o 1500 ng de ARNmod en complejo con RNAiMAX de Invitrogen. El complejo ARNmod:RNAiMAX se formó como se describe. La concentración de huG-CSF secretada en el medio de cultivo se midió a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas después de la transfección para cada concentración de cada ARNmod por triplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de queratinocitos humanos transfectados se cuantificó utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. Estos datos muestran que los ARNmod de huG-CSF compuestos por análogos de nucleótidos químicamente distintos (SEQ ID NO: X y Tabla 6) secretaron la proteína hu-G-CSF de una manera dependiente de la dosis de ARNmod de las células de queratinocitos humanos y que huG-CSF se transporta fuera de las células y se libera al medio extracelular. Estos datos indican que ARN modificados que contienen análogos de nucleótidos modificados mantienen la expresión de hu-G-CSF durante más tiempo y en los niveles más altos. Estos datos muestran que el ARN modificado que contiene nucleótidos modificados con modificaciones químicas en la cara del surco mayor de los análogos de pirimidina tiene los niveles más altos de hu-G-CSF secretado en el medio de cultivo celular y que 750 ng de ARNmod provocan el nivel más alto de hu-G-CSF secretado.

## Ejemplo 3. Respuesta inmunitaria innata celular a ARNmod

IFN- $\beta$  ELISA y TNF- $\alpha$  ELISA:

5 Las Fig. 4A-F muestran un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el factor de necrosis tumoral humano- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Fig. 4A y 4B); interferón- $\beta$  humano (IFN- $\beta$ ) (Fig. 4C y 4D); y el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) (Fig. 4E y 4F) secretado a partir de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro*. Los queratinocitos se cultivaron en medio EpiLife con suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos en ausencia de hidrocortisona de Invitrogen en una confluencia de >70 %. En las Fig. 4A y 4B, los queratinocitos se transfectaron inversamente con 0 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng, 1500 ng o 3000 ng del ARNm modificado químicamente indicado en complejo con RNAiMAX de Invitrogen como se describe por triplicado. El TNF- $\alpha$  secretado en el medio de cultivo se midió 24 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente usando un kit ELISA de Invitrogen según los protocolos del fabricante.

En las Fig. 4C y 4D, el IFN- $\beta$  secretado en el medio de cultivo se midió 24 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente usando un kit ELISA de Invitrogen según los protocolos del fabricante. En las Fig. 4E y 4F, se midió la concentración de hu-G-CSF secretada en el mismo medio de cultivo 24 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de queratinocitos humanos transfectados se cuantificó utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems (Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. Estos datos indican qué ARN modificados que contienen nucleótidos modificados fueron capaces de provocar una respuesta inmunitaria innata celular reducida en comparación con los nucleótidos naturales y otros modificados químicamente midiendo las citocinas de tipo I ejemplares TNF- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . Estos datos muestran que los ARN modificados que contienen nucleótidos modificados con modificaciones químicas en la cara del surco mayor de los análogos de pirimidina tienen los niveles más bajos de TNF- $\alpha$  e IFN- $\beta$  secretados en el medio de cultivo celular mientras mantienen altos niveles de ARNmod que codifica la secreción de hu-G-CSF en el medio de cultivo celular.

## Ejemplo 4. Ensayo de proliferación celular inducida por ARN modificado con factor estimulante de colonias de granulocitos humanos

Las Fig. 5A-D muestran que el ARNmod que codifica hu-G-CSF producido por una capa de células alimentadoras de queratinocitos humanos indujo la proliferación de células mieloblásticas humanas KG-1 y Kasumi-1 que expresan el receptor de G-CSF donde las poblaciones celulares están separadas por una membrana semipermeable.

Se cultivaron queratinocitos humanos en medio EpiLife con Suplemento S7 de Invitrogen en una confluencia de >70 % en una placa de cultivo de tejidos de cocultivo Transwell® (Corning, Lowell, MA) recubierta de colágeno de 24 pocillos. Los queratinocitos se transfectaron inversamente con 750 ng del ARNm modificado químicamente indicado en complejo con RNAiMAX de Invitrogen como se describe por triplicado. El complejo ARNmod:RNAiMAX se formó como se describe. El medio de queratinocitos se intercambié 6-8 horas después de la transfección. 42 horas después de la transfección, se colocó el inserto de placa Transwell® de 24 pocillos con una membrana de poliéster semipermeable de poro de 0,4  $\mu$ m en la placa de cultivo que contenía queratinocitos transfectados con ARNmod de hu-G-CSF. La Fig. 5A es una tabla que muestra los resultados de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para G-CSF humano secretado a partir de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* muestreadas de pocillos individuales en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos de cocultivo 42 horas después de la transfección con 750 ng de cada ARNmod que codifica hu-G-CSF indicado.

Se sembraron células de mieloblastos humanos, células Kasumi-1 (Fig. 5C) o KG-1 (Fig. 5D) ( $0,2 \times 10^5$  células), en el pocillo del inserto y se cuantificó la proliferación celular 42 horas después del inicio del cocultivo utilizando el ensayo de proliferación celular directa CyQuant (Invitrogen) en un volumen de 100-120  $\mu$ l en una placa de 96 pocillos. La proliferación de células mieloblásticas inducida por ARNmod que codifica hu-G-CSF se expresó como un porcentaje de proliferación celular normalizada a pocillos de control de cocultivo de queratinocitos/mieloblastos no transfectados. La concentración de hu-G-CSF secretada en los pocillos de cocultivo del inserto de queratinocitos y mieloblastos se midió 42 horas después del inicio del cocultivo para cada ARNmod por duplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) se cuantificó utilizando un kit ELISA de Invitrogen siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes.

El ARNmod de hu-G-CSF transfectado en células alimentadoras de queratinocitos humanos y células mieloblásticas humanas no transfectadas se detectaron mediante RT-PCR. El ARN total de las células de muestra se extrajo y lisó utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. El ARN total extraído se envió a RT-PCR para la amplificación específica de ARNmod-G-CSF usando el kit

ProtoScript® M-MuLV Taq RT-PCR (New England BioLabs, Ipswich, MA) según las instrucciones del fabricante con cebadores específicos hu-G-CSF (véase más abajo). Los productos de RT-PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % (Fig. 5B). La Tabla 6 a continuación muestra qué ARNmod se corrieron en el gel de agarosa.

5

**Tabla 6**

Carril	Tipo celular	ARNmod diana de hu-G-CSF por RT-PCR
1	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Vehículo
2	Alimentadora de queratinocitos KG-1	ARN mezclado
3	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Sin modificación
4	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Quím. 7
5	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Quím. 6
6	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Quím. 37
7	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Vehículo
8	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	ARN mezclado
9	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Sin modificación
10	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Quím. 7
11	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Quím. 6
12	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Quím. 37
13	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Quím. 46
14	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Quím. 48
15	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Quím. 49
16	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Quím. 53
17	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Quím. 46
18	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Quím. 48
19	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Quím. 49
20	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Quím. 53
21	Kasumi-1	Vehículo
22	KG-1	Vehículo
23	Kasumi-1	Vehículo
24	Kasumi-1	ARN mezclado
25	Kasumi-1	Sin modificación
26	Kasumi-1	Quím. 7
27	Kasumi-1	Quím. 6
28	Kasumi-1	Quím. 37
29	Kasumi-1	Quím. 46
30	Kasumi-1	Quím. 48
31	Kasumi-1	Quím. 49
32	Kasumi-1	Quím. 53
33	KG-1	Vehículo
34	KG-1	ARN mezclado
35	KG-1	Sin modificación
36	KG-1	Quím. 7
37	Vacío	Vacío
38	Vacío	Vacío
39	Vacío	Vacío
40	Vacío	Vacío
41	Vacío	Vacío
42	Vacío	Vacío
43	Vacío	Vacío
44	Vacío	Vacío

10 Estos datos muestran que las células de queratinocitos humanos que contienen ARNmod de hu-G-CSF compuestos por análogos de nucleótidos químicamente distintos secretaron proteína hu-G-CSF y que el hu-G-CSF secretado fue fisiológicamente activo en la inducción de la proliferación de células mieloblásticas

humanas que expresan el receptor de G-CSF. Estos datos también muestran que la proteína hu-G-CSF secretada era permeable a través de una membrana semipermeable y actuaba sobre una población celular diferente que no producía G-CSF. Además, estos datos muestran que el ARNmod de hu-G-CSF transfectado en células de queratinocitos humanos en un entorno de cocultivo estaba presente solo en las células de queratinocitos transfectadas y no en las células de mieloblastos no transfectadas. Además, estos datos muestran que la composición química de nucleótidos modificada de ARNmod de hu-G-CSF no afectó a la actividad de la proteína resultante.

Ejemplo 5. El efecto de ARNmod en la viabilidad celular

Citotoxicidad y apoptosis:

Este experimento demuestra la viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis para distintas células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* con ARNmod. Los queratinocitos se cultivan en medio EpiLife con suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos en ausencia de hidrocortisona de Invitrogen a una confluencia de >70 %. Los queratinocitos se transfectaron inversamente con 0 ng, 46,875 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng, 1500 ng, 3000 ng o 6000ng de ARNmod en complejo con RNAiMAX de Invitrogen. Se forma el complejo ARNmod:RNAiMAX. La concentración de huG-CSF secretada en el medio de cultivo se mide a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas después de la transfección para cada concentración de cada ARNmod por triplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de queratinocitos humanos transfectados se cuantifica utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. La viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis se miden a las 0, 12, 48, 96 y 192 horas después de la transfección utilizando el kit ApoToxGlo de Promega (Madison, WI) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 6. Cocultivo

El ARNm modificado compuesto por nucleótidos modificados químicamente distintos que codifican el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano puede estimular la proliferación celular de una célula no apta para la transfección en un entorno de cocultivo. El cocultivo incluye un tipo celular altamente transfectable tal como un queratinocito humano y un tipo celular no apto para la transfección tal como un glóbulo blanco (WBC). El ARNm modificado que codifica G-CSF puede transfectarse en la célula altamente transfectable, lo que permite la producción y secreción de la proteína G-CSF en el entorno extracelular donde G-CSF actúa de manera paracrina para estimular los glóbulos blancos que expresan el receptor de G-CSF para proliferar. La población de WBC ampliada se puede usar para tratar pacientes inmunocomprometidos o reconstituir parcialmente la población de WBC de un paciente inmunodeprimido y así reducir el riesgo de infecciones oportunistas.

Otro ejemplo, una célula altamente transfectable tal como un fibroblasto puede transfectarse con determinados factores de crecimiento para apoyar y simular el crecimiento, mantenimiento o diferenciación de células madre embrionarias mal transfectables o células madre pluripotentes inducidas.

Ejemplo 7. Capping de 5'-guanosina en ácidos nucleicos modificados (ARNmod)

La clonación, síntesis de genes y secuenciación de vectores fue realizada por DNA2.0 Inc. (Menlo Park, CA). La secuencia y la secuencia de inserción se exponen en esta invención. El ORF se digirió por restricción usando XbaI y se usó para la síntesis de ADNc usando PCR con cola o sin cola. El producto de ADNc de PCR con cola se usó como plantilla para la reacción de síntesis de ARNm modificado usando una mezcla de 25 mM para cada nucleótido modificado (todos los nucleótidos modificados se sintetizaron a medida o se adquirieron en TriLink Biotech, San Diego, CA, excepto el trifosfato de pirrolo-C adquirido en Glen Research, Sterling VA; los nucleótidos no modificados se adquirieron de Epicenter Biotechnologies, Madison, WI) y el kit completo de síntesis de ARNm de CellScript MegaScript™ (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI). La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo durante 4 horas a 37 °C. Los ARNmod que incorporaban análogos de adenosina se acoplaron con poli (A) utilizando poli (A) polimerasa de levadura (Affymetrix, Santa Clara, CA). La reacción de PCR utilizó HiFi PCR 2X Master Mix™ (Kapa Biosystems, Woburn, MA). Los ARNmod se sometieron a capping postranscripcionalmente usando la enzima de capping del virus Vaccinia recombinante (New England BioLabs, Ipswich, MA) y una 2'-O-metiltransferasa recombinante (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI) para generar la estructura Cap1 de 5'-guanosina. La estructura Cap 2 y las estructuras Cap 3 se pueden generar usando 2'-O-metiltransferasas adicionales. El producto de ARNm transcrito *in vitro* se corrió en un gel de agarosa y se visualizó. El ARNmod se purificó con el kit de purificación MEGAClear RNA™ de Ambion/Applied Biosystems (Austin, TX). La PCR utilizó el kit de purificación de PCR PureLink™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). El producto se cuantificó en Nanodrop™ UV Absorbance (ThermoFisher, Waltham, MA). La calidad, la calidad de la absorbancia UV y la visualización del producto se realizaron en un gel de agarosa al 1,2 %. El producto se resuspendió en tampón TE.

Estructura de ácido nucleico modificado (ARNm) con capping en 5':

El capping de 5'-ARNmod se puede completar de manera concomitante durante la reacción de transcripción *in vitro* usando los siguientes análogos químicos de cap de ARN para generar la estructura de cap de 5'-guanosa según los protocolos del fabricante: 3'-O-Me-m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G; G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')A; m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). El capping de 5'-ARNmod puede completarse después de la transcripción utilizando una enzima de capping del virus Vaccinia para generar la estructura "Cap 0": m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). La estructura Cap 1 puede generarse usando tanto la enzima de capping del virus Vaccinia como una 2'-O metil-transferasa para generar: m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G-2'-O-metilo. La estructura Capa 2 puede generarse a partir de la estructura Capa 1 seguida de la 2'-O-metilación del nucleótido 5'-antepenúltimo usando una 2'-O metiltransferasa. La estructura Capa 3 puede generarse a partir de la estructura Capa 2 seguida de la 2'-O-metilación del nucleótido 5'-antepenúltimo usando una 2'-O metiltransferasa. Las enzimas se derivan preferentemente de una fuente recombinante.

15 Secuencias:

ADNc de G-CSF:

agctfttgaccctcgtacagaagctaatacgactcactatagggaaataagagagaaaaagagagtaagaagaatataagag  
 ccaccatggcgggcccgaccacaaagcccatgaaactatggccctgcagttgctgctftggcactcggccclctggacagtccaaga  
 agcgactccctcggacctgcctcatcgttggcgcagtcattcctfttgaagtgtctggagcaggtgcgaaagattcagggcgatggagccg  
 cactccaagagaagctctgcgcacatacaaaacttggccatcccaggagctcgtactgctcgggcaacagcttggggattccctgggctcc  
 tctctcctctgctcagcagcgttgcagttggcaggggtgccttccagctccactccggttfttctgtatcagggactgctgcaagccc  
 ttgagggaatctcgcagaattggcccgcagctggcacggttgcagctcagctggcggatttcgcaacaacctctggcagcagatgg  
 aggaactggggatggcaccggcctgcagcccacgcagggggcaatggcggccttgcctccggttcagcgcagggcggtggagat  
 cctcgtagcgcagccactcaatcattttggaagctcgtaccgggtgctgagacatctgcgcagc cgtgaagcgtgccltctcgggggc  
 ttgctctcggccatgccccttctctccttgcacctgtacctgtgttgaataaagcctgagtaggaagggcggccgctcgcagatgca  
 20 tctagagggcccaattgcacctattcgaagtcg (SEQ ID NO: 1)

ARNm de G-CSF:

agcuuuuaggaccucguacagaagcuaauacgacucacuaauagggaaaauagagagaaaaagagauaagaagaau  
 auaaagagccaccaugggccggucggaccacaaagcccaugaaacuaauaggccucgaguuugcucuuuugccacucggcccu  
 cuggacaguccaagaagcgacuccucucggaccugcccaucguuugccgacucauuuccuuuugaagugucuggagcaggug  
 cgaagauucagggcgauaggagccgcacuccaagagaagcucugcgcgacauacaacuuugccauccgagagcucguacu  
 gcucgggcacagcuuugggauuccugggcuccucucuguccuguccgucgagcggcuuugcaguugcagggugccuuuc  
 ccagcuccacuccgguuuguuucuuuauucagggacucugcaagcccuugagggaaucucgccagaauugggcccgcagcug  
 gacacguugcagcucgacgugggauuucgcaacaaccaucuggcagcagauggaggaacuggggauggcaccgccgucg  
 agcccacgcagggggcaauccggccuuuugcugccgcuuucagcgcagggcggguggaguccucguagcgcagccaccuua  
 aucauuuuuggaagucucguaccgggucgagacauuugcgcagccgugaagcgcugccuucgucggggcuugccuuc  
 ggccaugcccuucucuccuugcaccugcaccuucuggucuuuugaauaaagccugaguaggaaaggccggccgucgagca  
 25 ugcacuagagggcccaauucgcccauucgaagucg (SEQ ID NO: 2)

Proteína G-CSF:

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKI  
 QGDGAALQEKLVSECATYKLCHEPELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHS  
 GLFLYQGLIQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPA  
 FASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS YRVLRLHLAQP (SEQ ID NO: 3)

30 Cebadores de síntesis de ADNc:

## ES 3 005 233 T3

Cebador directo: 5'- TTG GAC CCT CGT ACA GAA GCT AAT ACG (SEQ ID NO: 4)

5 Cebador inverso para formación de la cola Poli (A) de la plantilla: 5'- T<sub>(120)</sub>CT TCC TAC TCA GGC TTT ATT  
CAA AGA CCA (SEQ ID NO: 5)

Cebador inverso para la formación de la cola de poli (A) polimerasa postranscripcional: 5'- CTT CCT ACT CAG  
GCT TTA TTC AAA GAC CA (SEQ ID NO: 6)

10 Cebadores de ARNmod de G-CSF por RT-PCR:

Cebador directo: 5'- TGG CCG GTC CCG CGA CCC AA (SEQ ID NO: 7)

15 Cebador inverso: 5'- GCT TCA CGG CTG CGC AAG AT (SEQ ID NO: 8)

Otras realizaciones

20 Debe entenderse que, si bien la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada detallada de la misma, la descripción anterior tiene por objeto ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un ARNm que comprende 1-metil-pseudouridina para su uso como medicamento, en donde el 100% de los nucleótidos que comprenden uracilo en el ARNm se sustituyen por nucleótidos que comprenden N1-metil-pseudouridina.
- 10 2. El ARNm para uso de la reivindicación 1, en donde el uso es para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un mamífero.
- 10 3. El ARNm para uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el uso es para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un humano.
- 15 4. El ARNm para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el ARNm es obtenible por transcripción in vitro, en donde los únicos NTPs usados para preparar el ARNm en dicha transcripción in vitro son N1-metil-pseudouridina trifosfato, ATP, CTP y GTP.

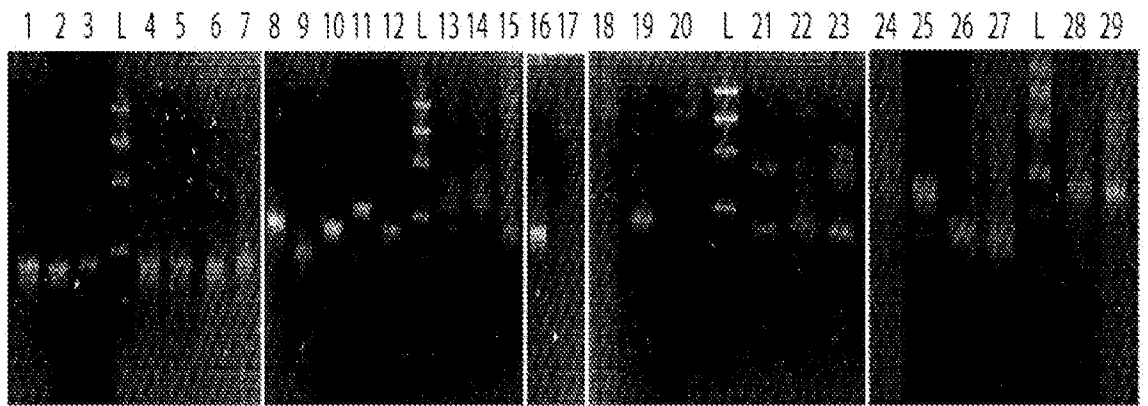


Fig. 1A

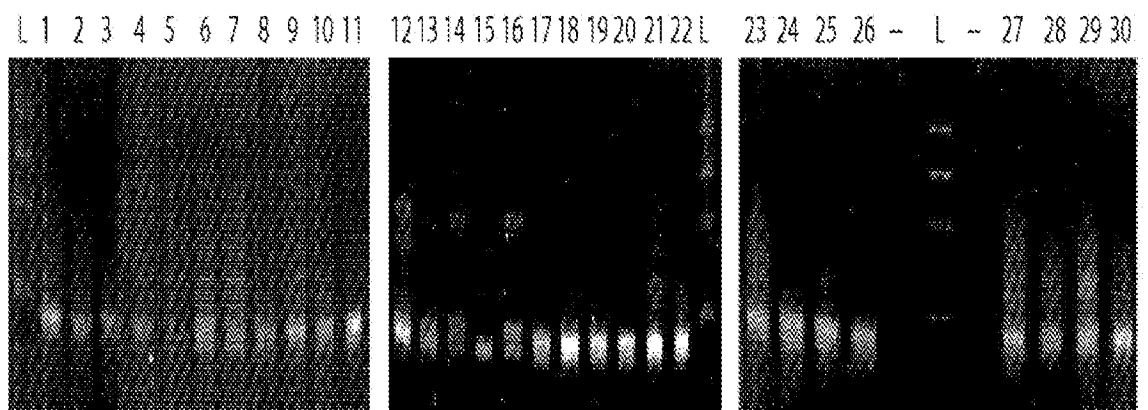


Fig. 1B

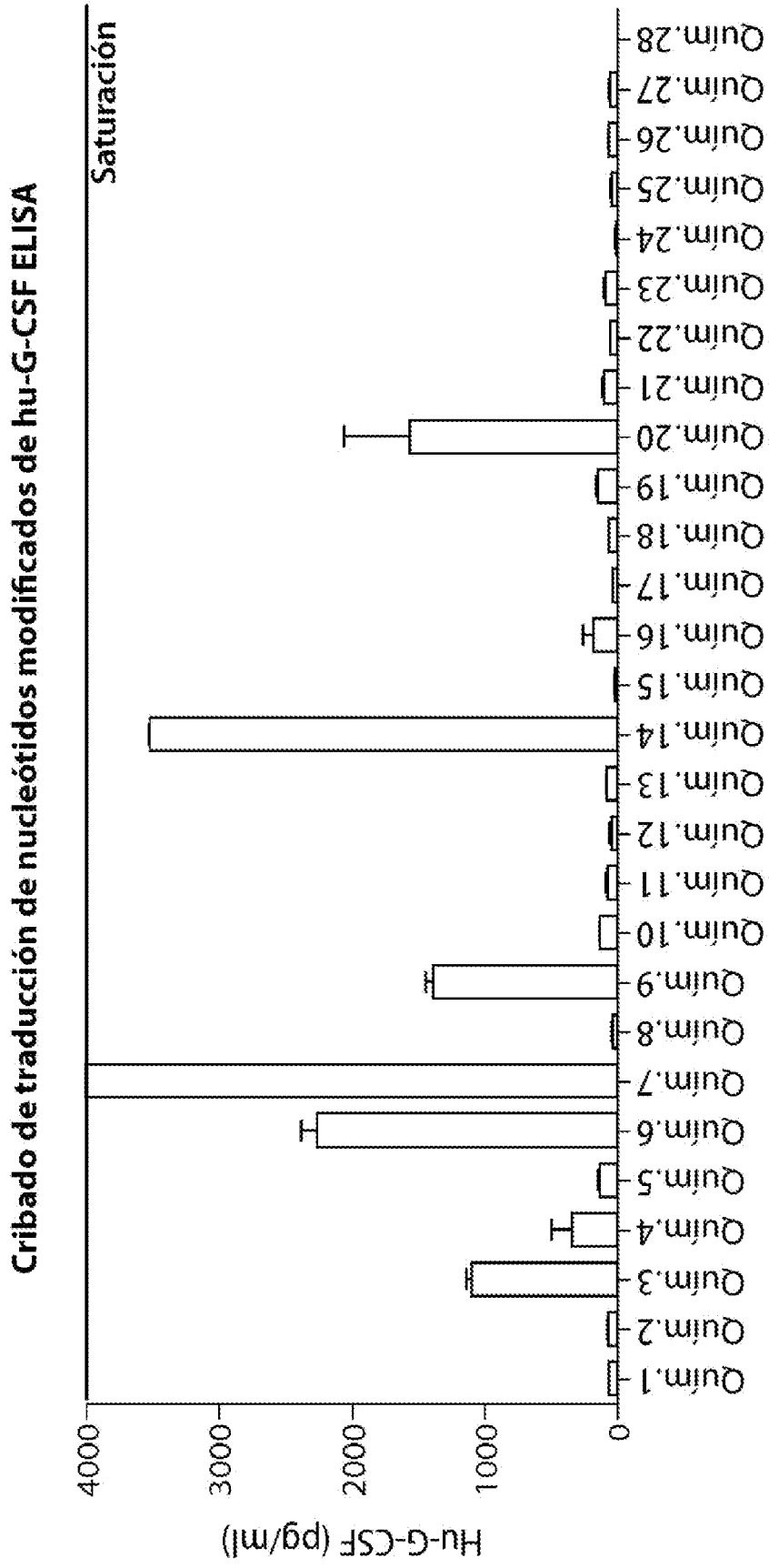


Fig. 2A

Cribado de traducción de combinación de nucleótidos modificados de hu-G-CSF ELISA

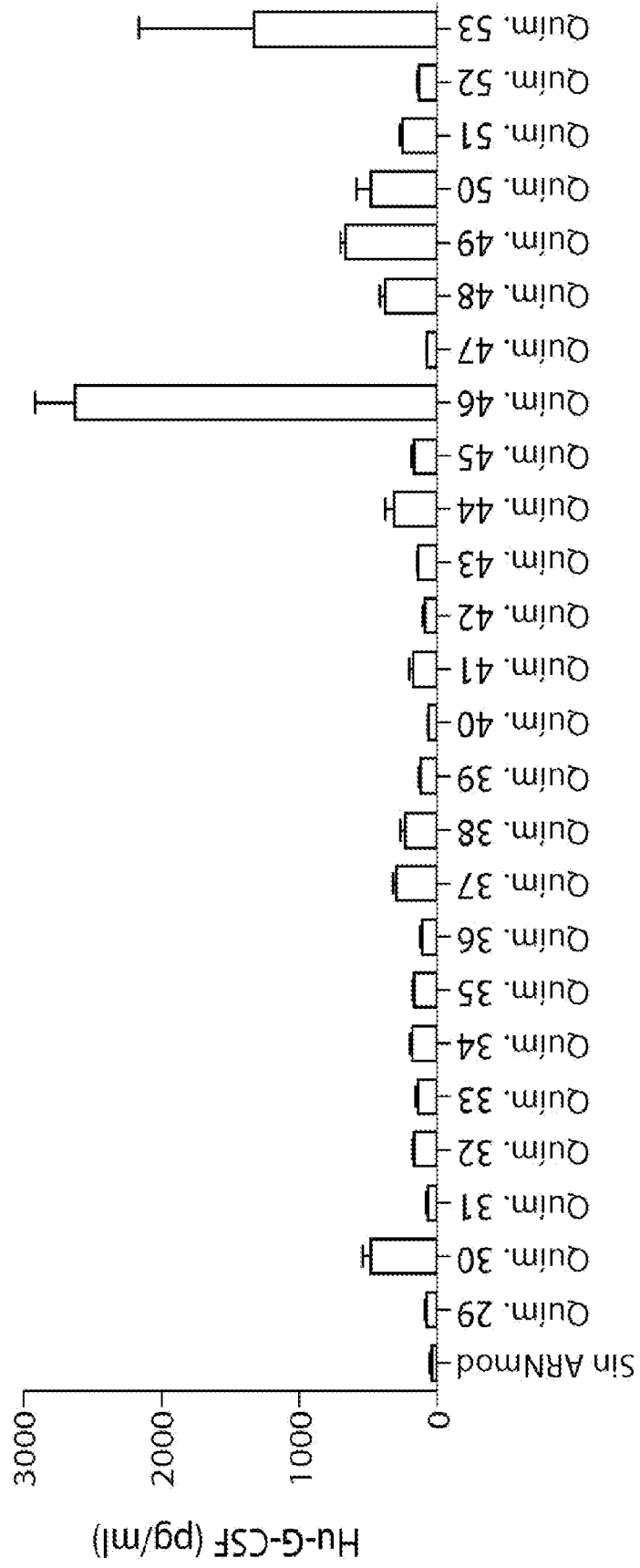
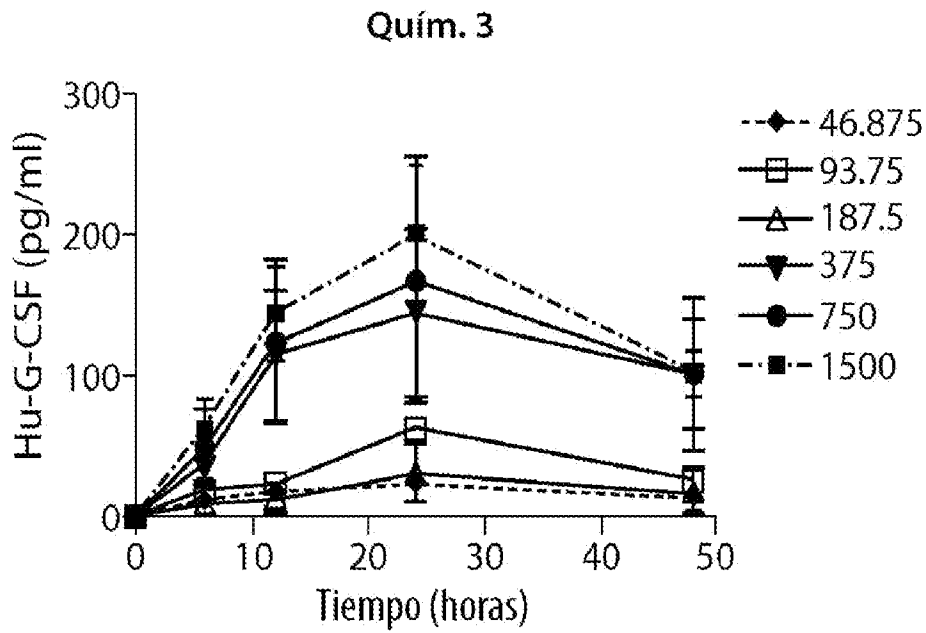
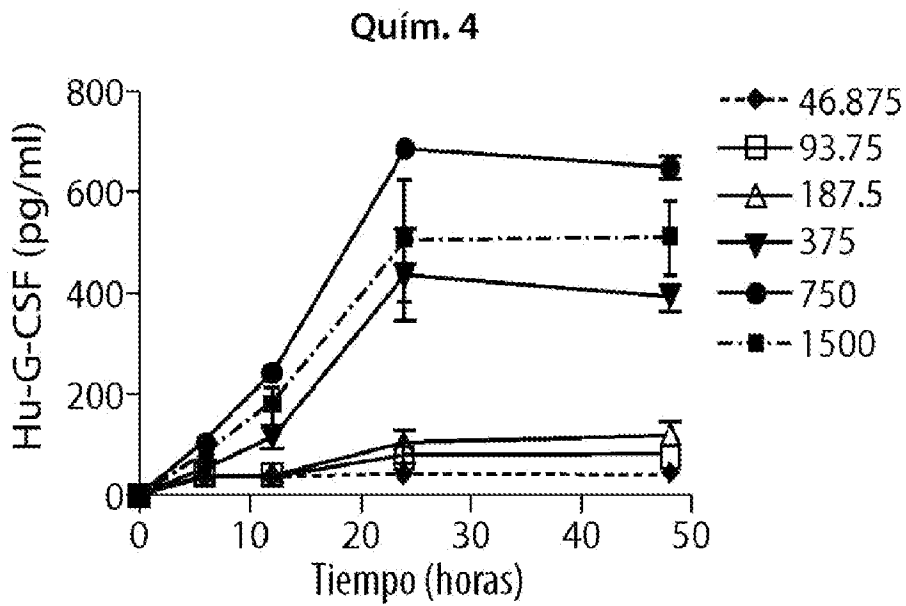


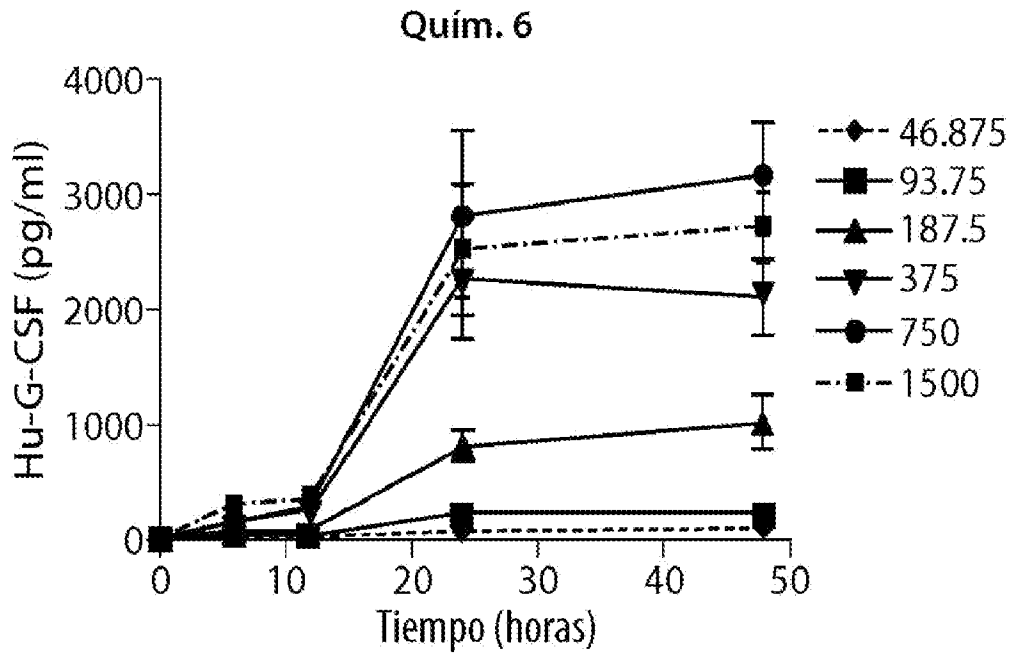
Fig. 2B



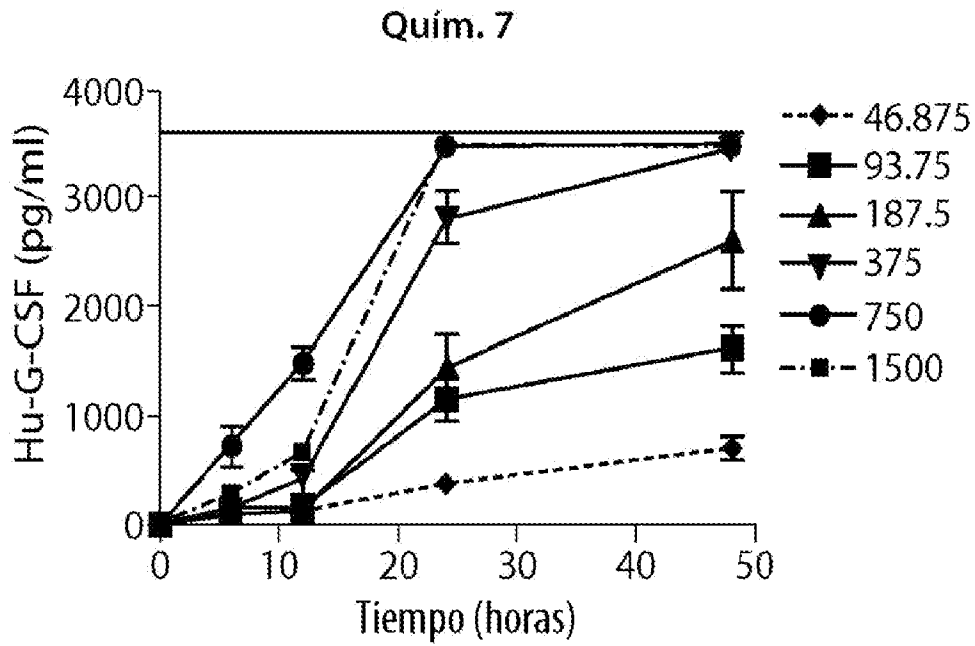
**Fig. 3A**



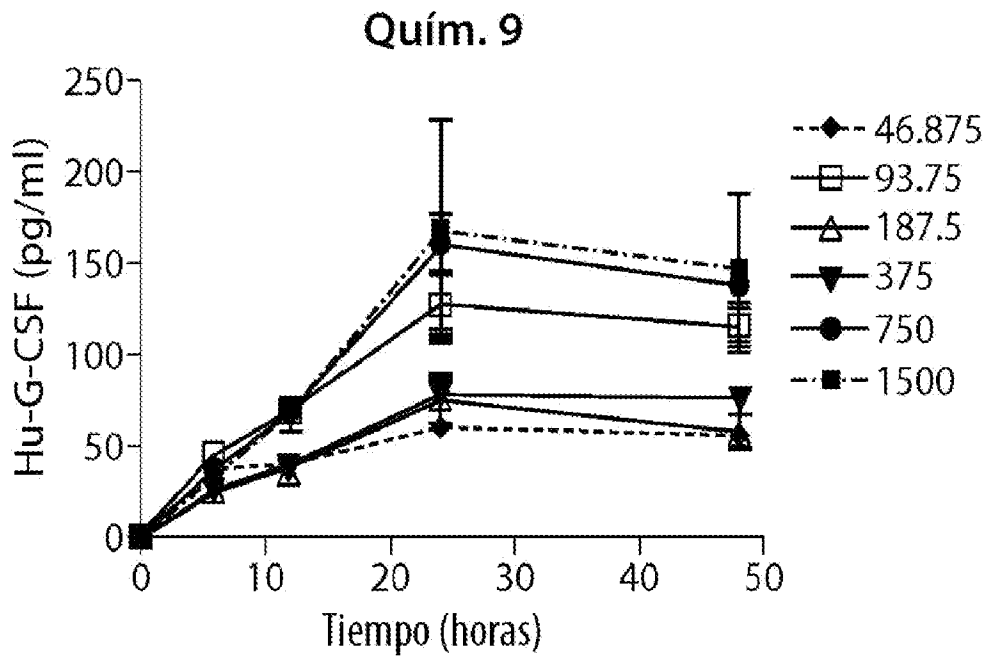
**Fig. 3B**



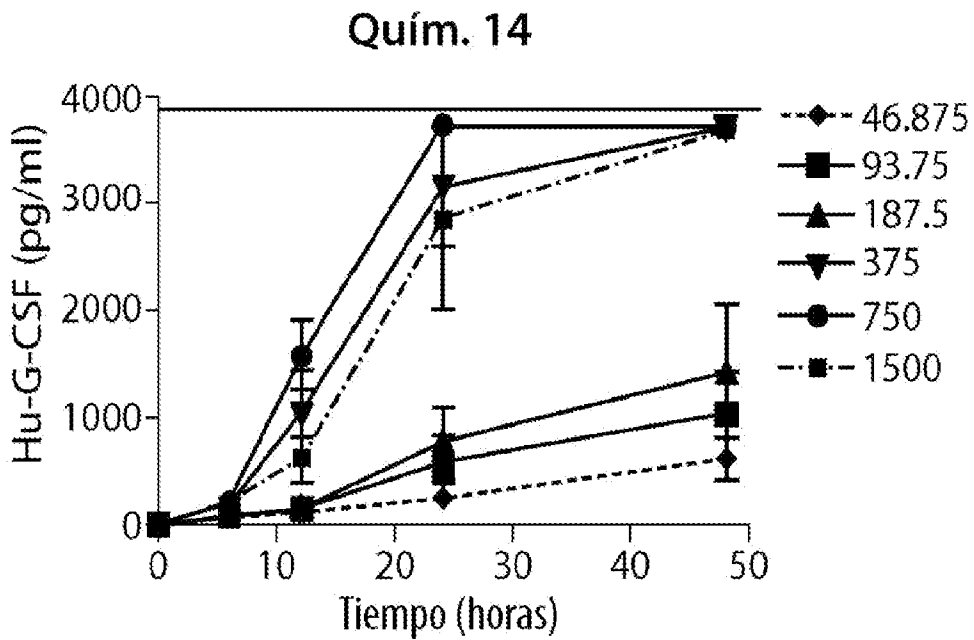
**Fig. 3C**



**Fig. 3D**



**Fig. 3E**



**Fig. 3F**

Quím. 20

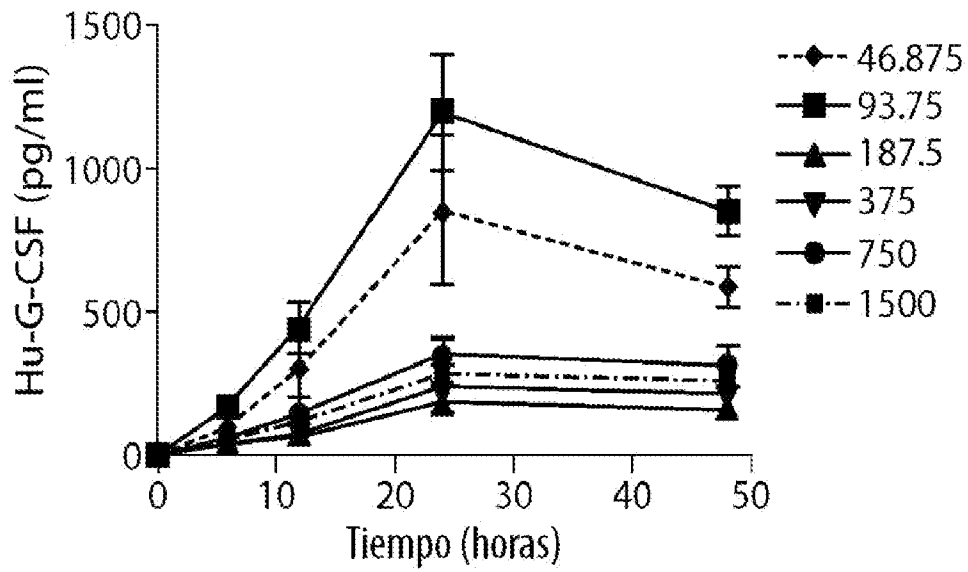


Fig. 3G

Quím. 30

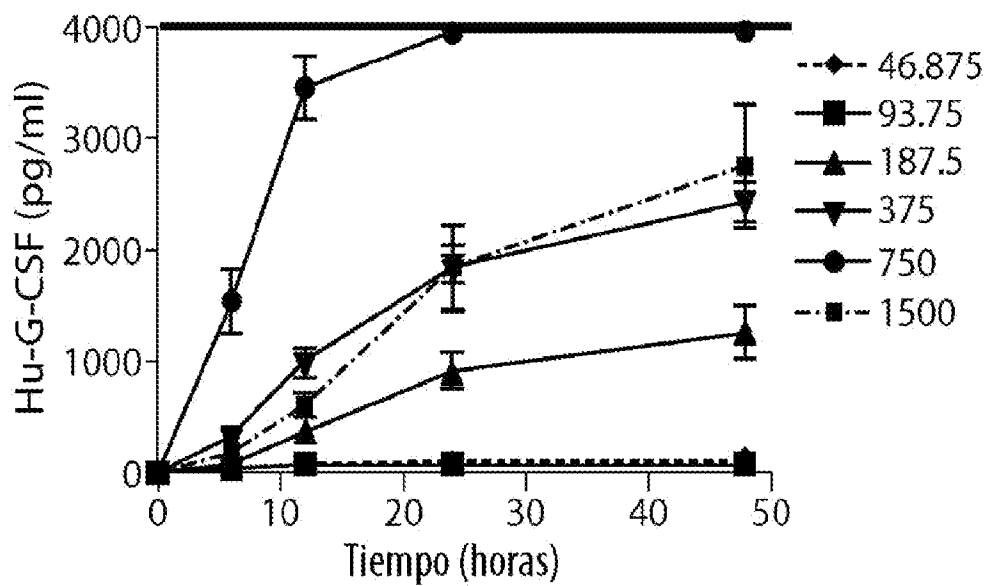


Fig. 3H

Quím. 44

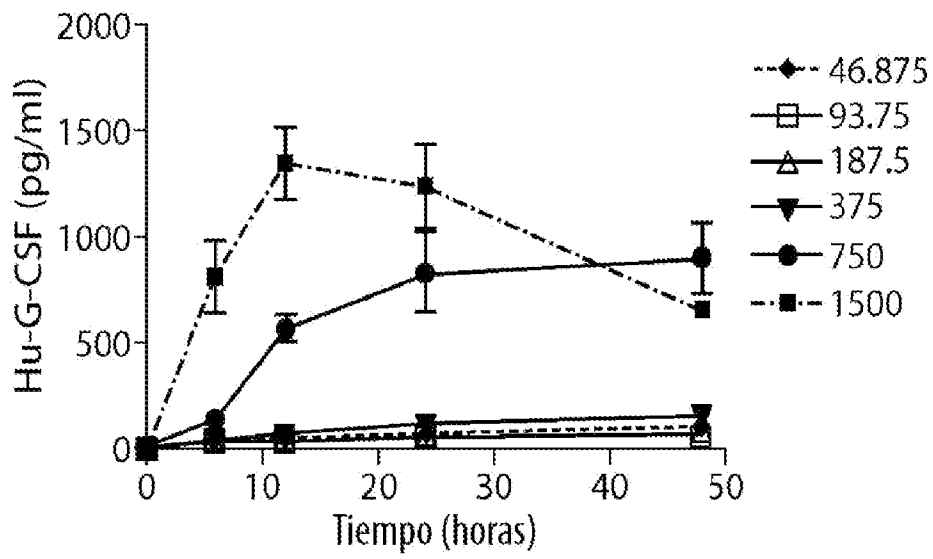


Fig. 3I

Quím. 48

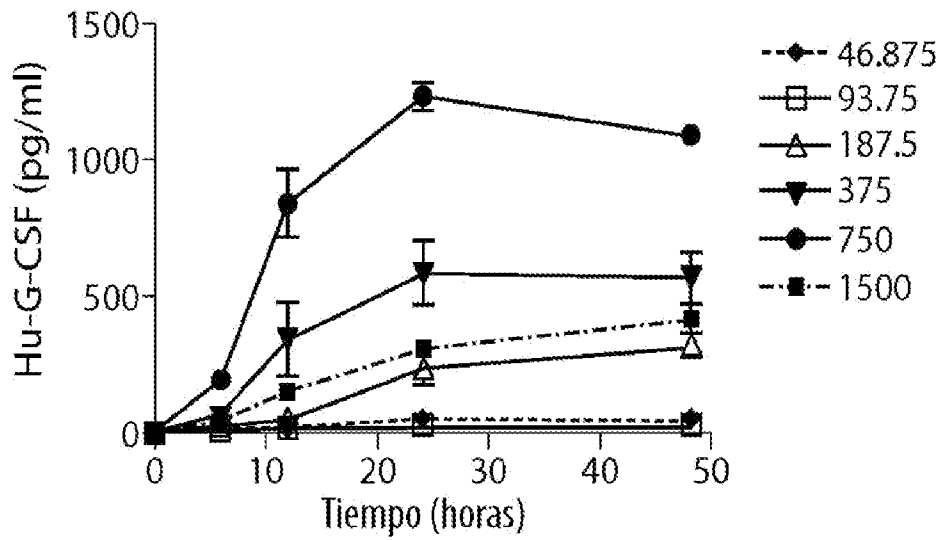


Fig. 3J

Quím. 49

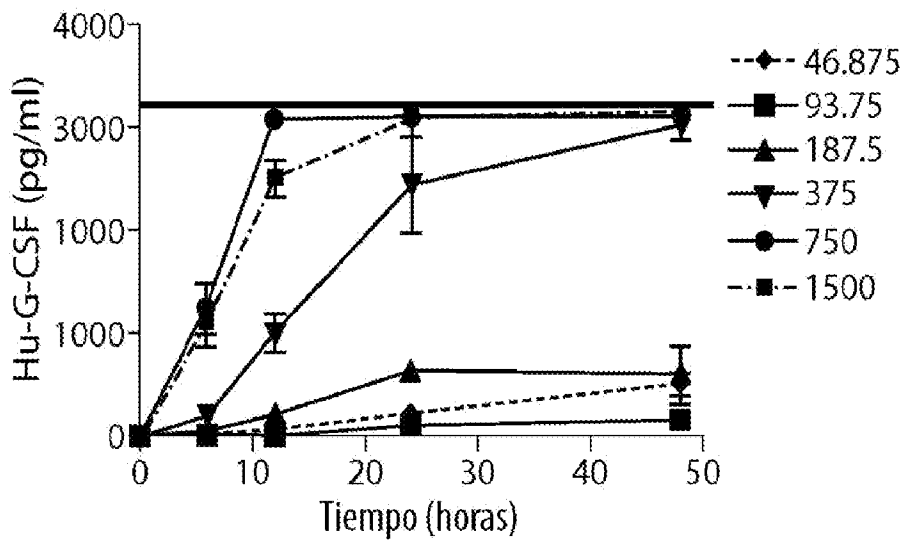


Fig. 3K

Quím. 50

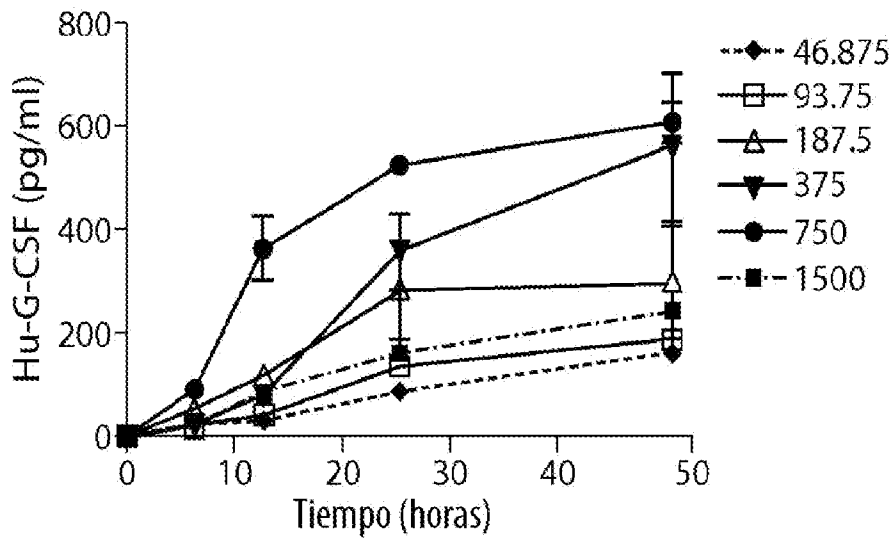
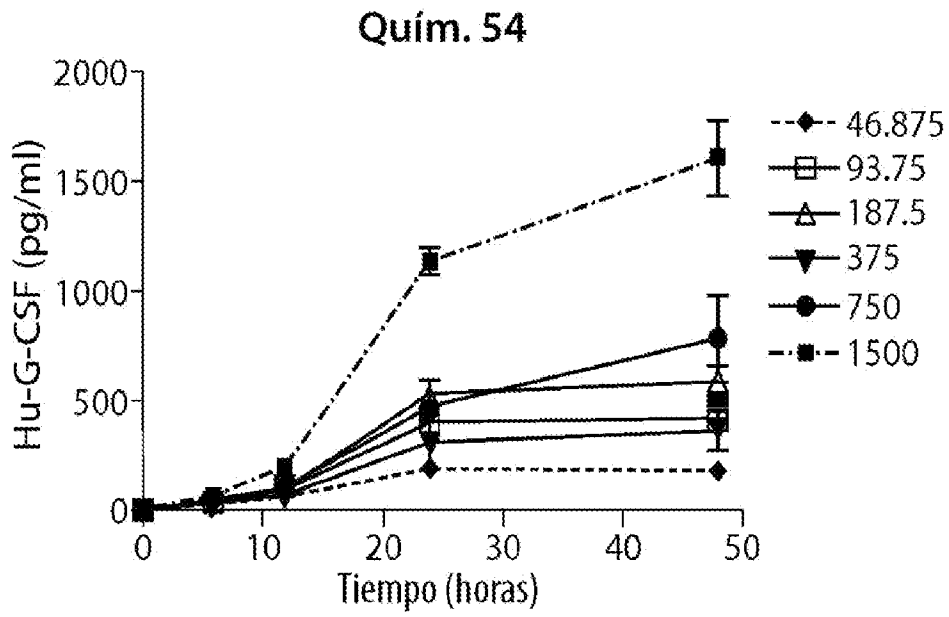
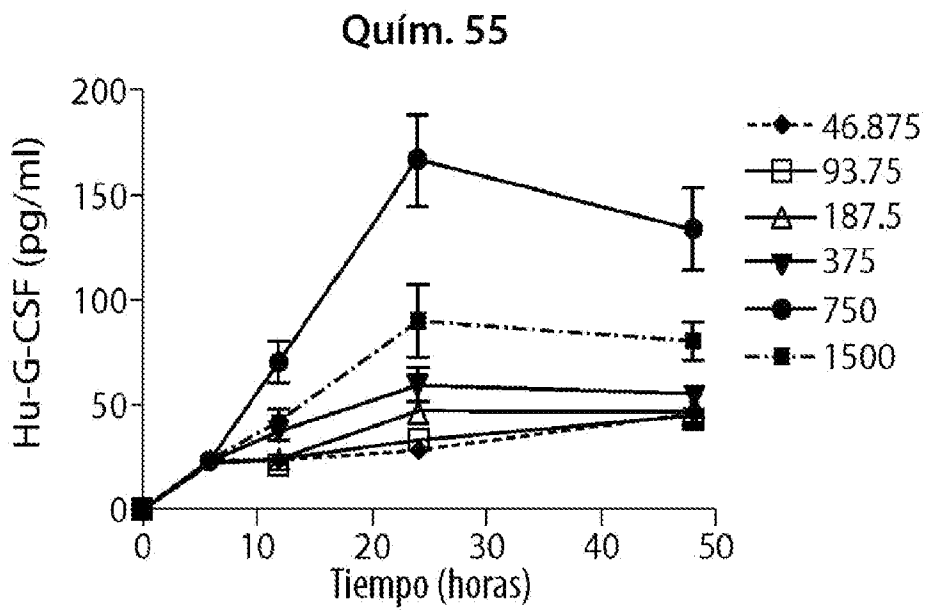


Fig. 3L



**Fig. 3M**



**Fig. 3N**

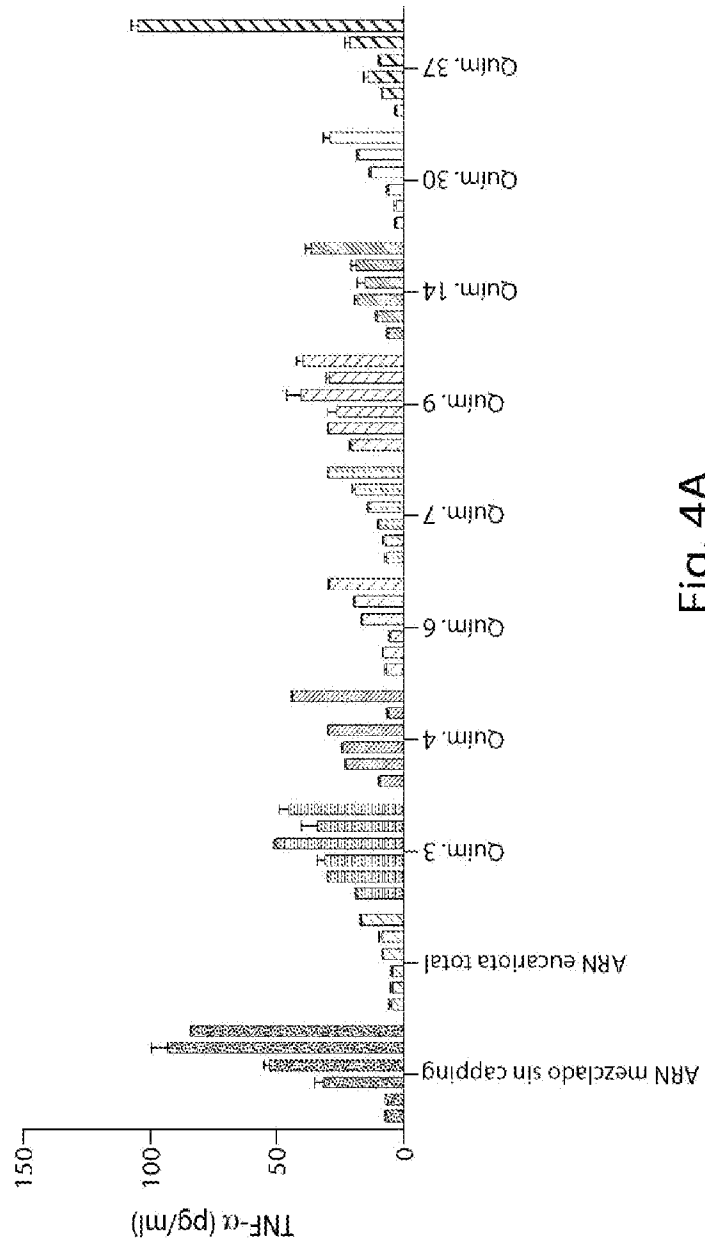


Fig. 4A

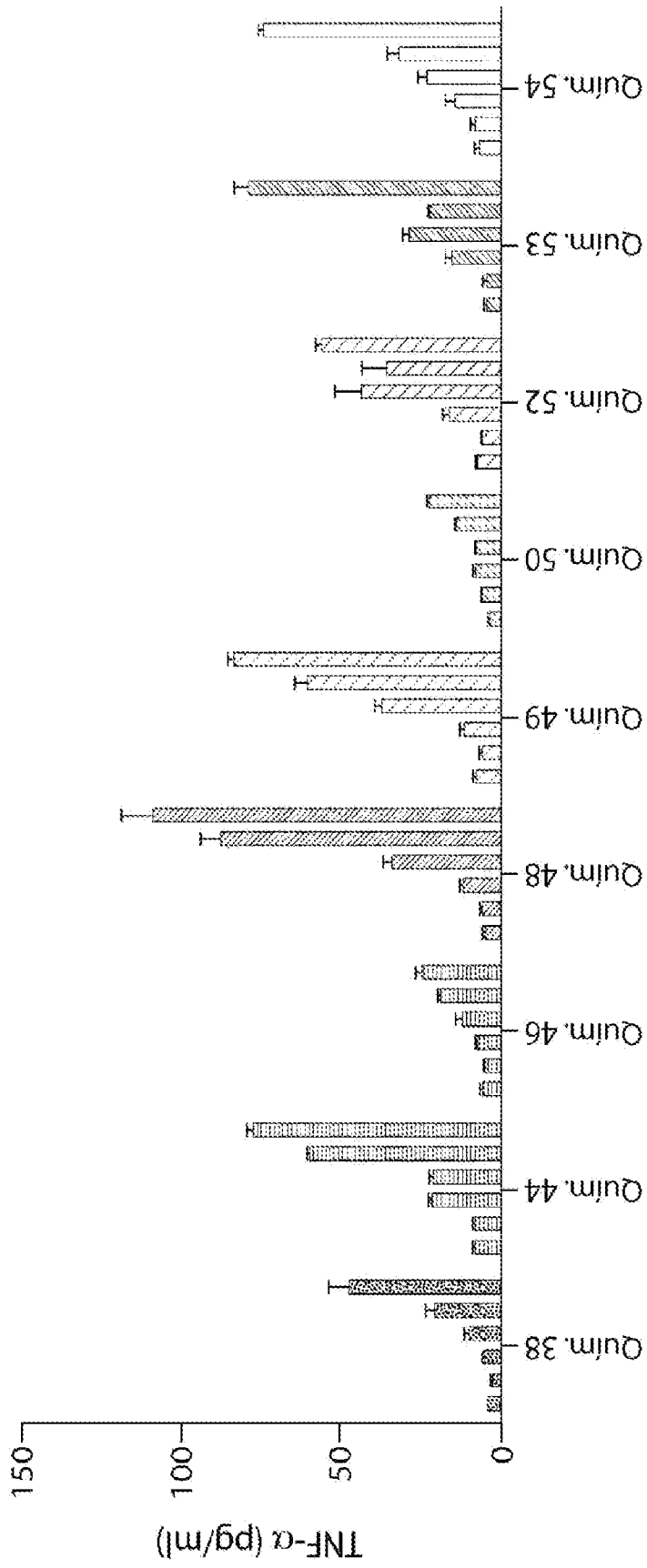


Fig. 4B

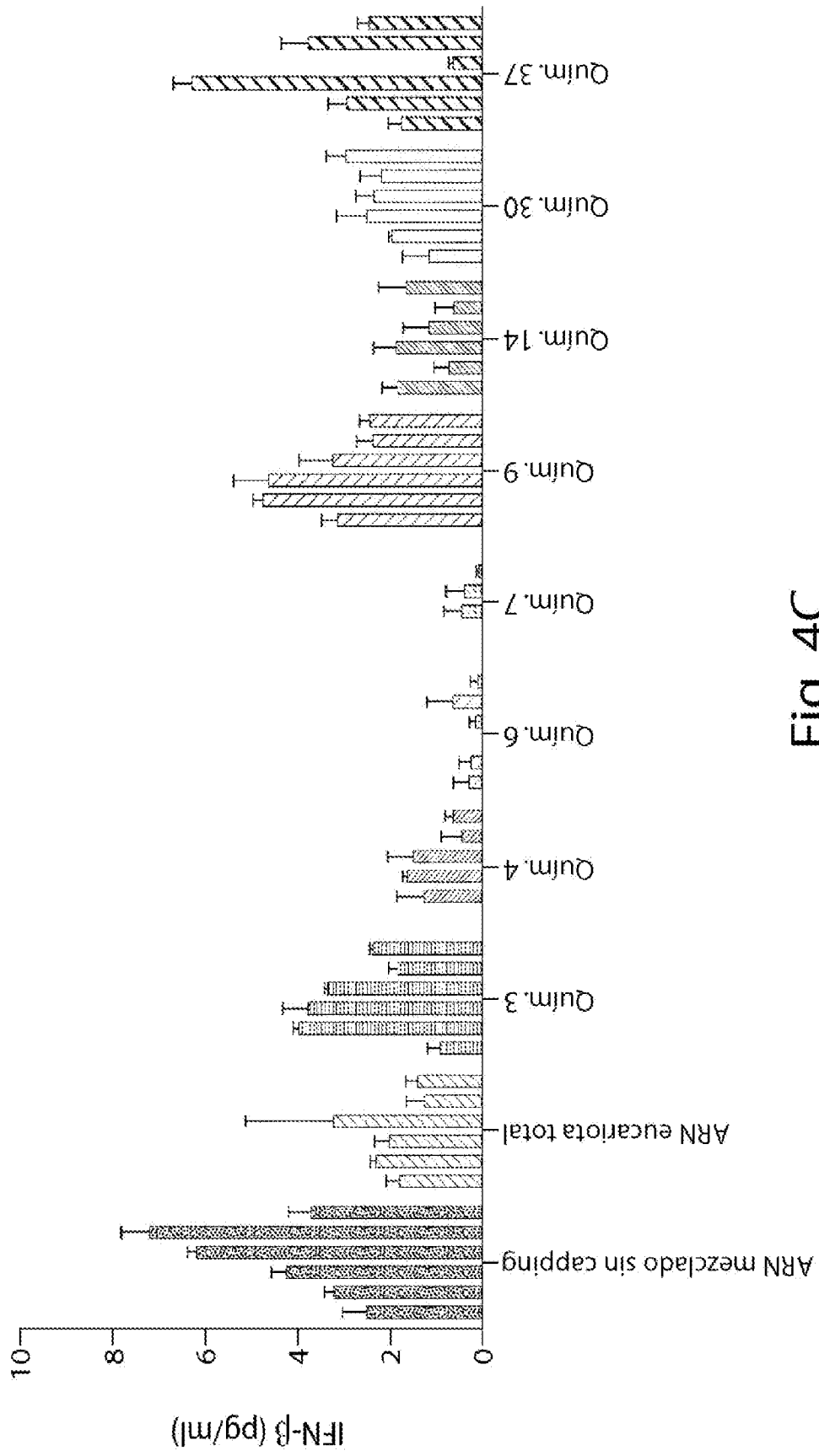


Fig. 4C

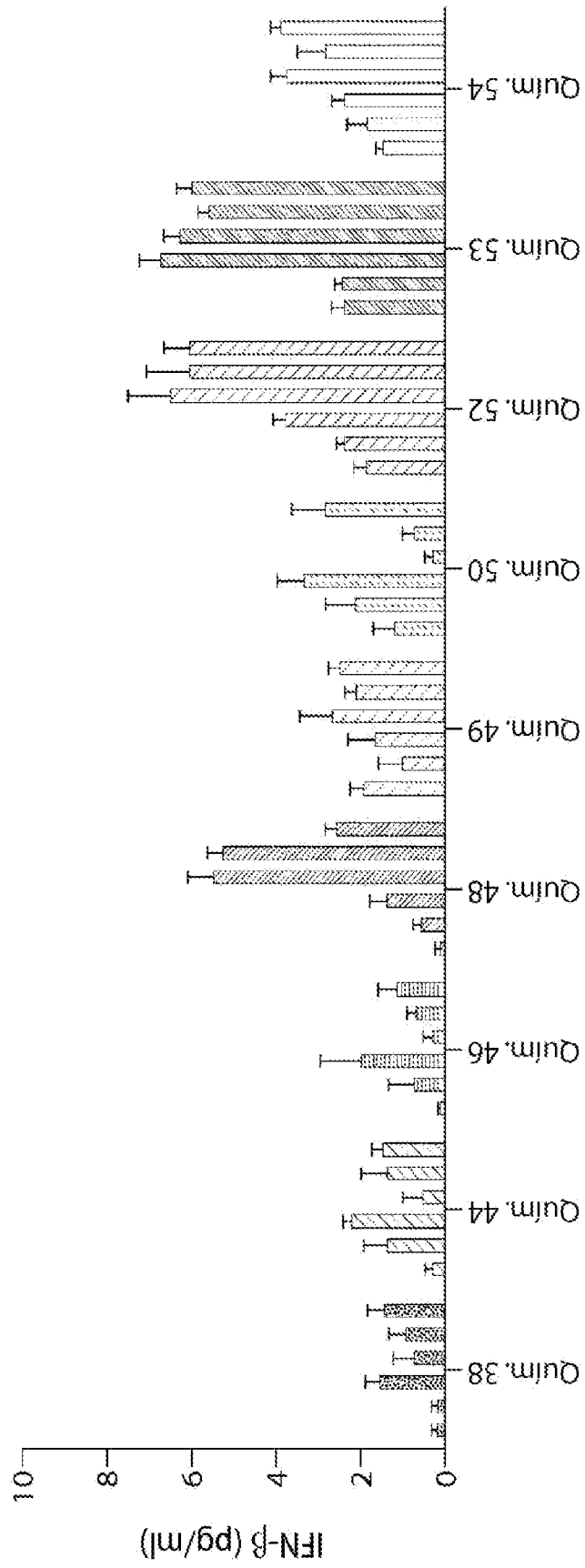


Fig. 4D

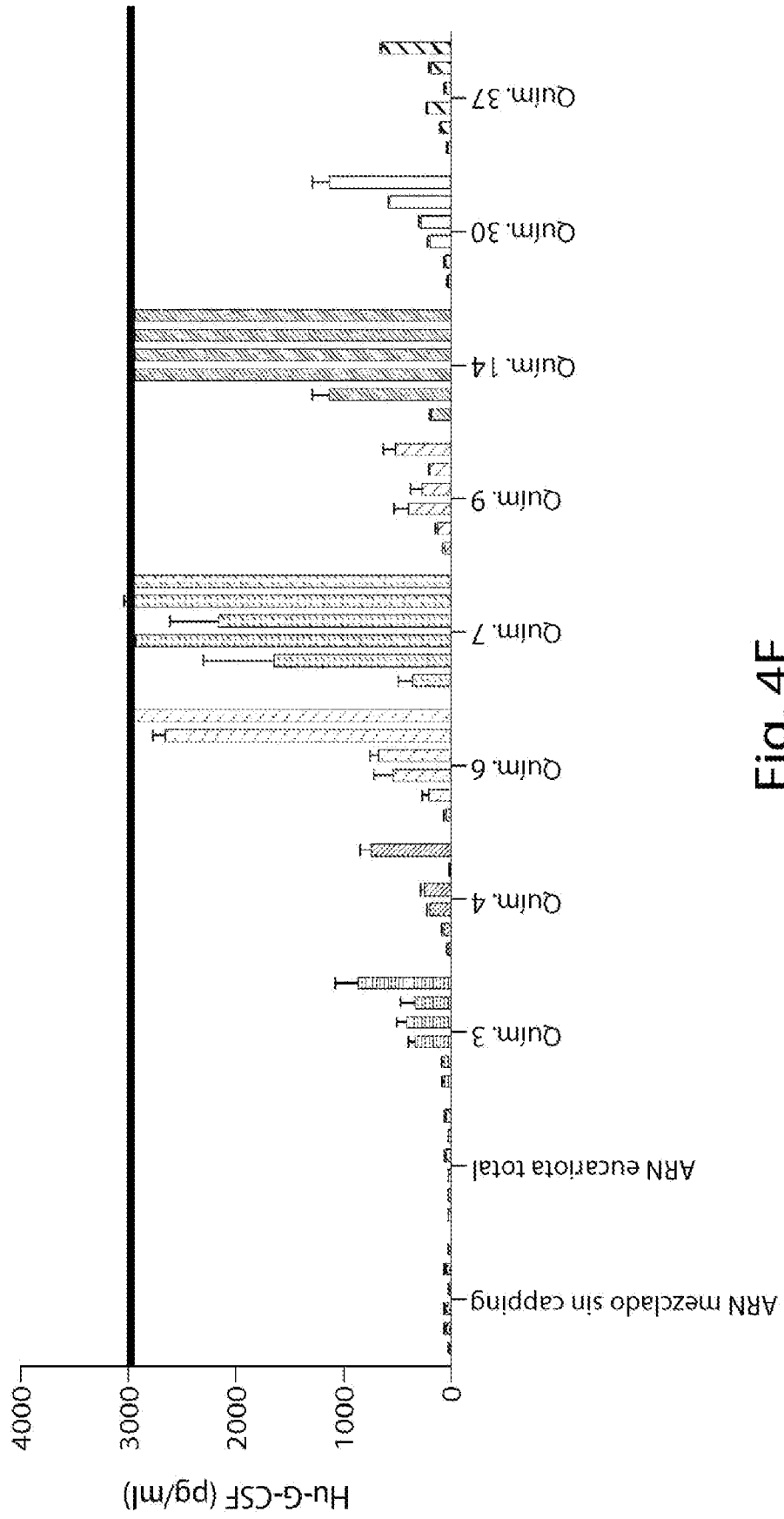


Fig. 4E

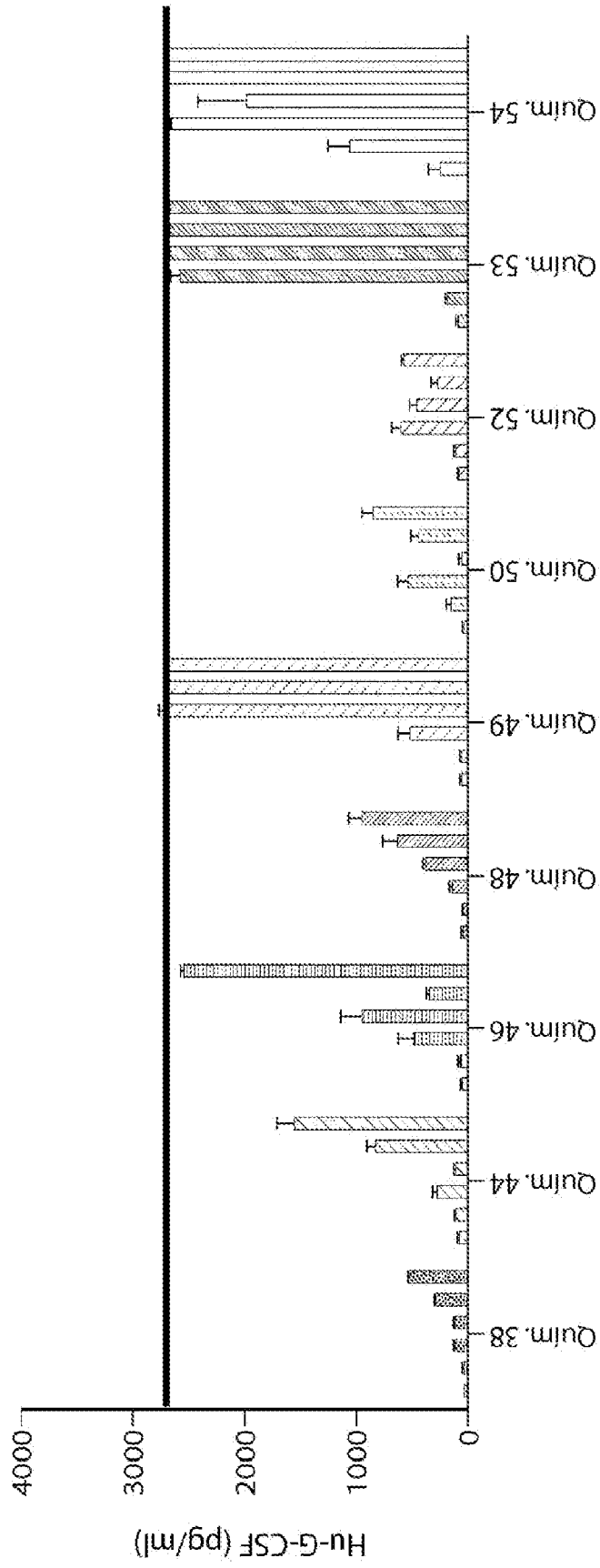


Fig. 4F

<b>ARNmod de Hu-G-CSF</b>	<b>hu-G-CSF por pocillo de queratinocitos (ng/ml)</b>	<b>hu-G-CSF por pocillo de KG-1 (ng/ml)</b>
Vehículo	0,0177	0,0189
Mezcla	0,6217	0,0086
Quím. 7	≥5	≥5
Quím. 20	≥5	≥5
Quím. 46	≥5	≥5
Quím. 53	≥5	≥5

<b>ARNmod de Hu-G-CSF</b>	<b>hu-G-CSF por pocillo de queratinocitos (ng/ml)</b>	<b>hu-G-CSF por pocillo de Kasumi-1 (ng/ml)</b>
Vehículo	0,0434	0,0256
Mezcla	0,0655	0,3317
Quím. 6	≥5	≥5
Quím. 7	≥5	≥5
Quím. 20	≥5	≥5
Quím. 37	≥5	≥5
Quím. 46	≥5	≥5
Quím. 48	≥5	≥5
Quím. 49	≥5	≥5
Quím. 53	≥5	≥5

Fig. 5A

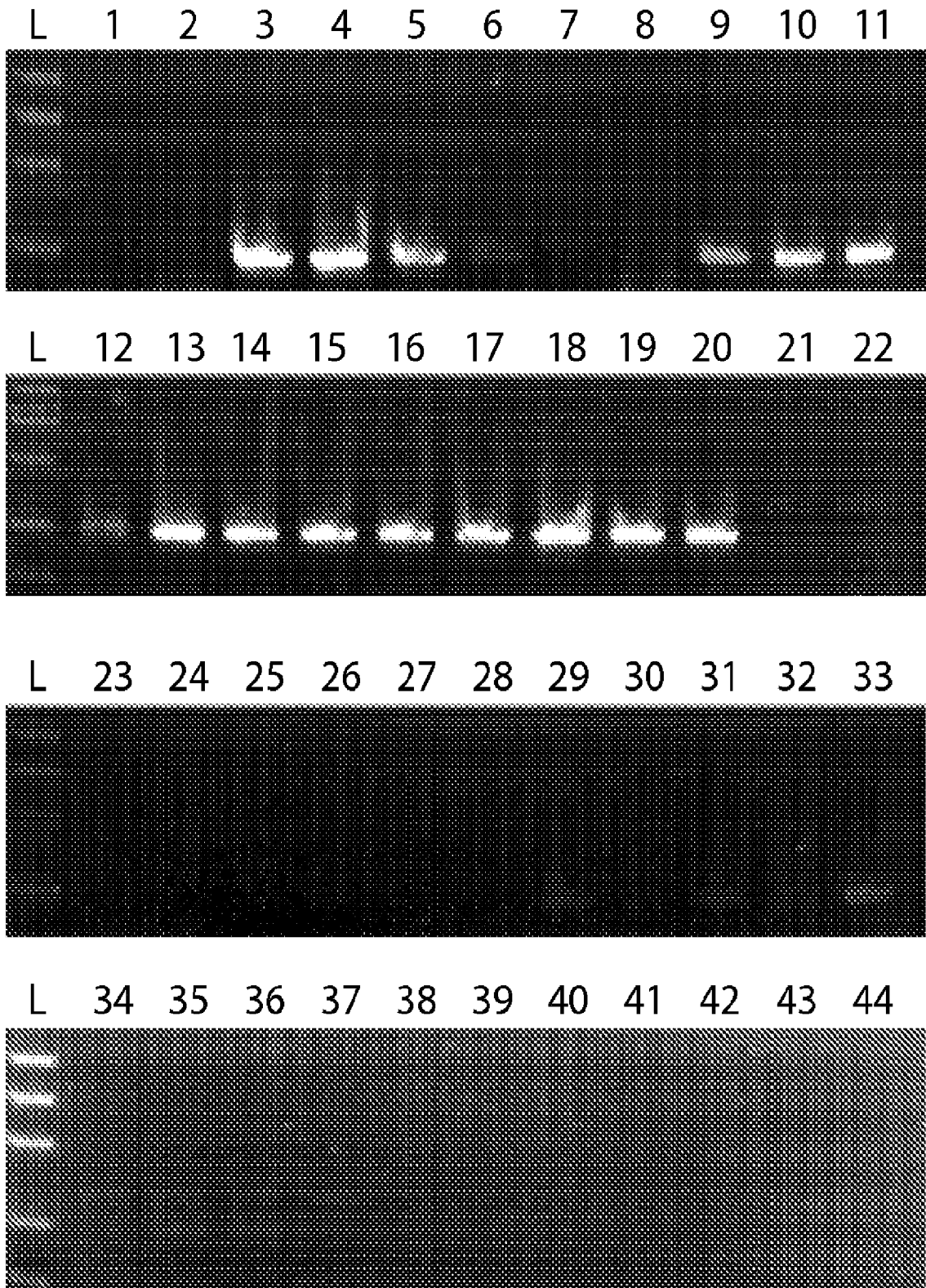
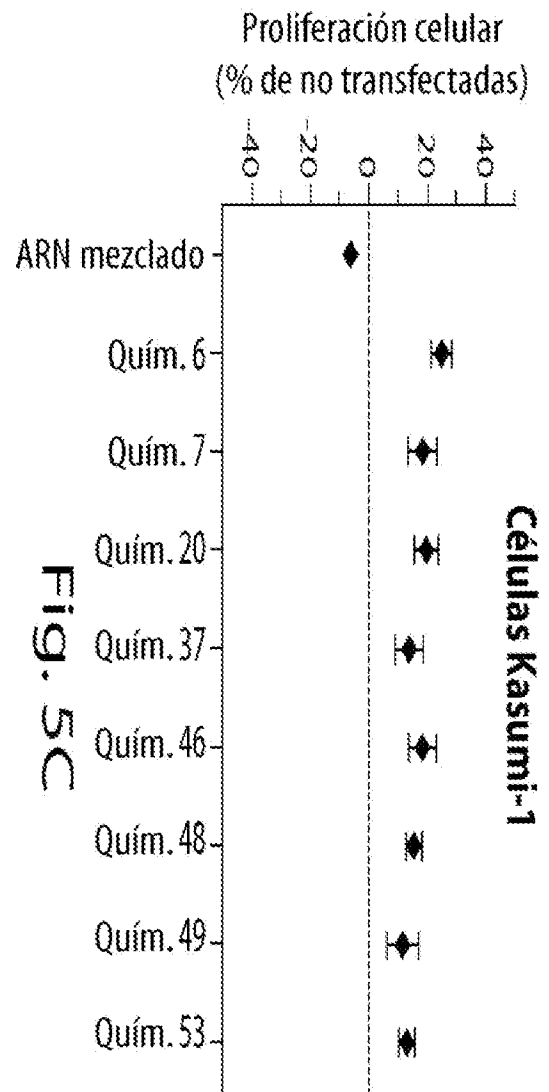
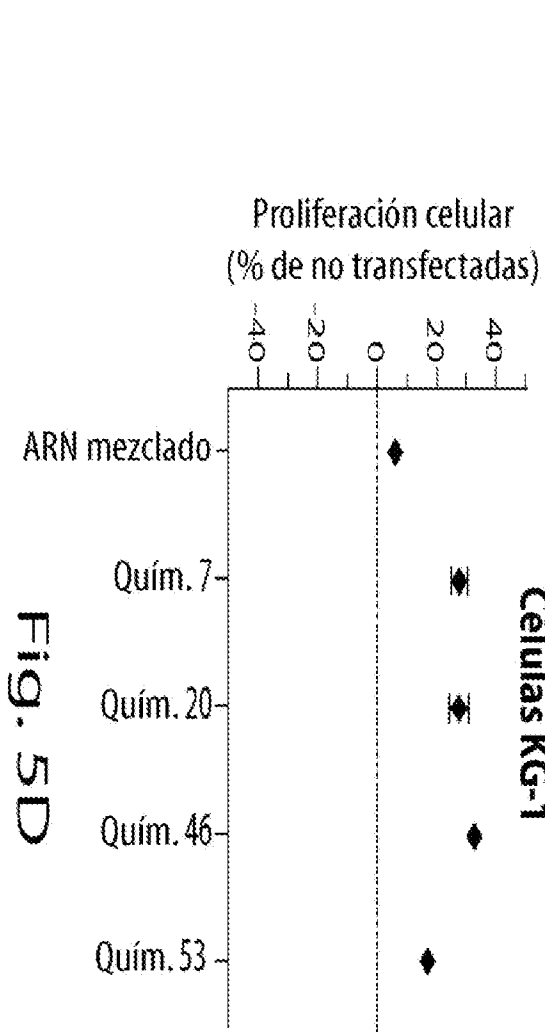


Fig. 5B



#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
21	NTP NO MODIFICADOS	lab	8/15/2011 11:45:55 AM	1599.6	ng/µl	39.990	17.841	2.24	2.41	ARN	40.00

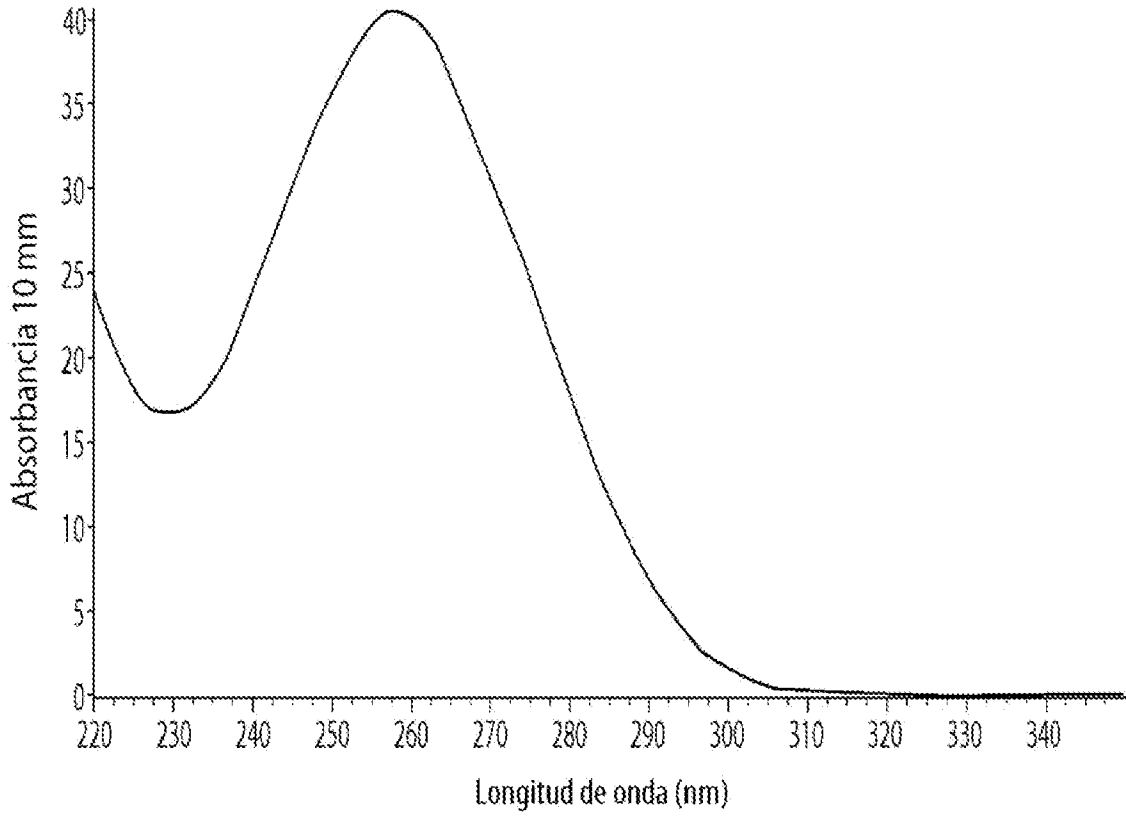


Fig. 6A

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
2	N1-metil-A	lab	8/16/2011 11:35:49 AM	20.1	ng/μl	0.503	0.288	1.75	0.92	ARN	40.00

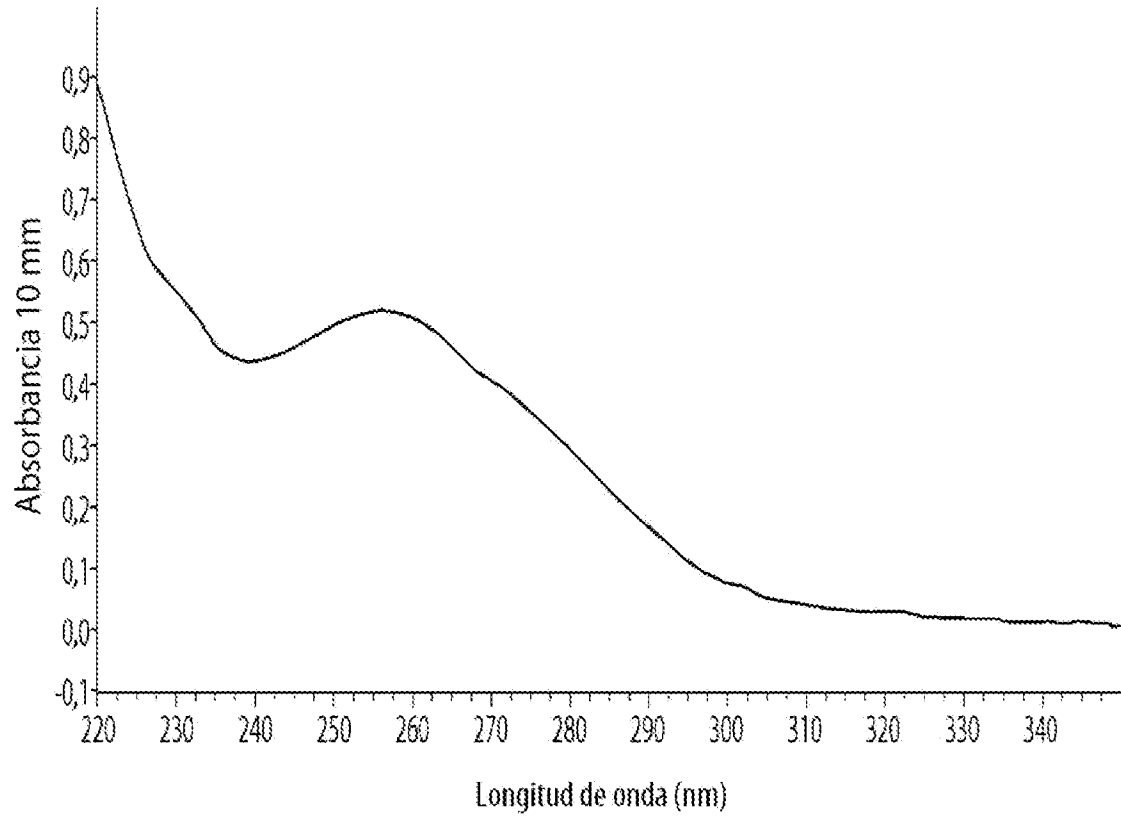


Fig. 6B

ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
N6-metil-2-amino-Purina	lab	8/16/2011 11:38:29 AM	1112.4	ng/μl	27.811	17.607	1.58	1.40	ARN	40.00

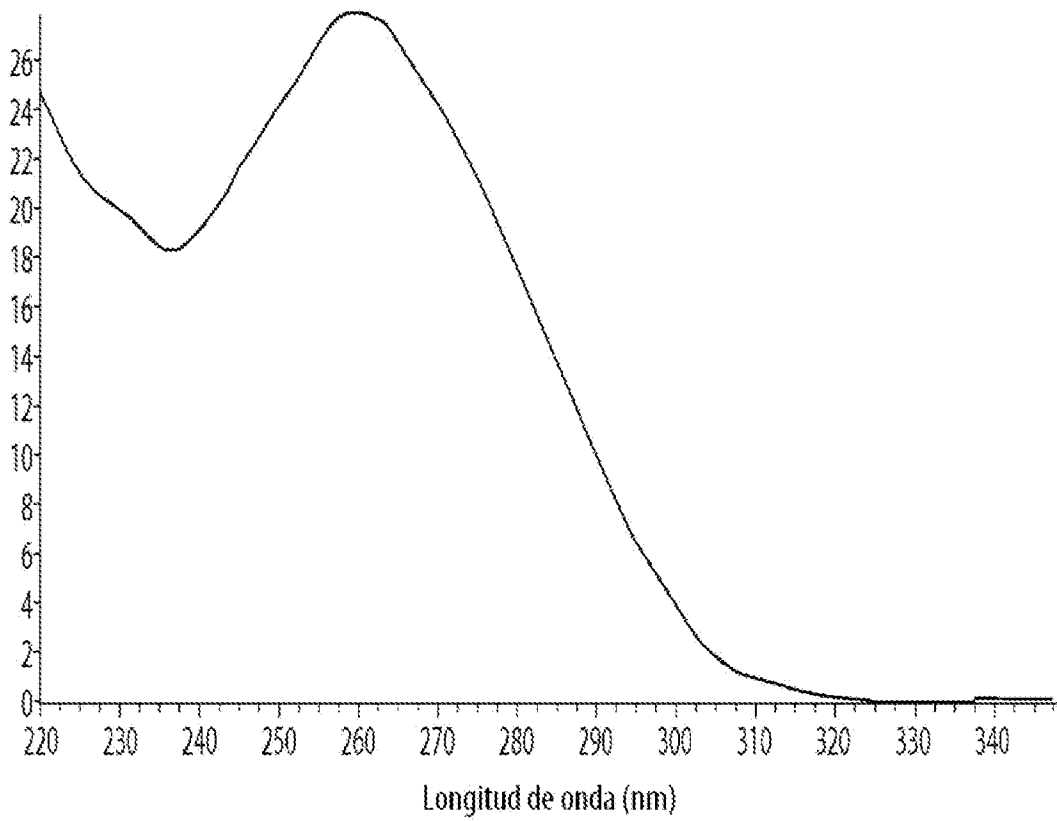


Fig. 6C

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
2	2-tio-CTP	lab	8/15/2011 11:26:59 AM	259.2	ng/µl	6.479	4.719	1.37	1.30	ARN	40.00

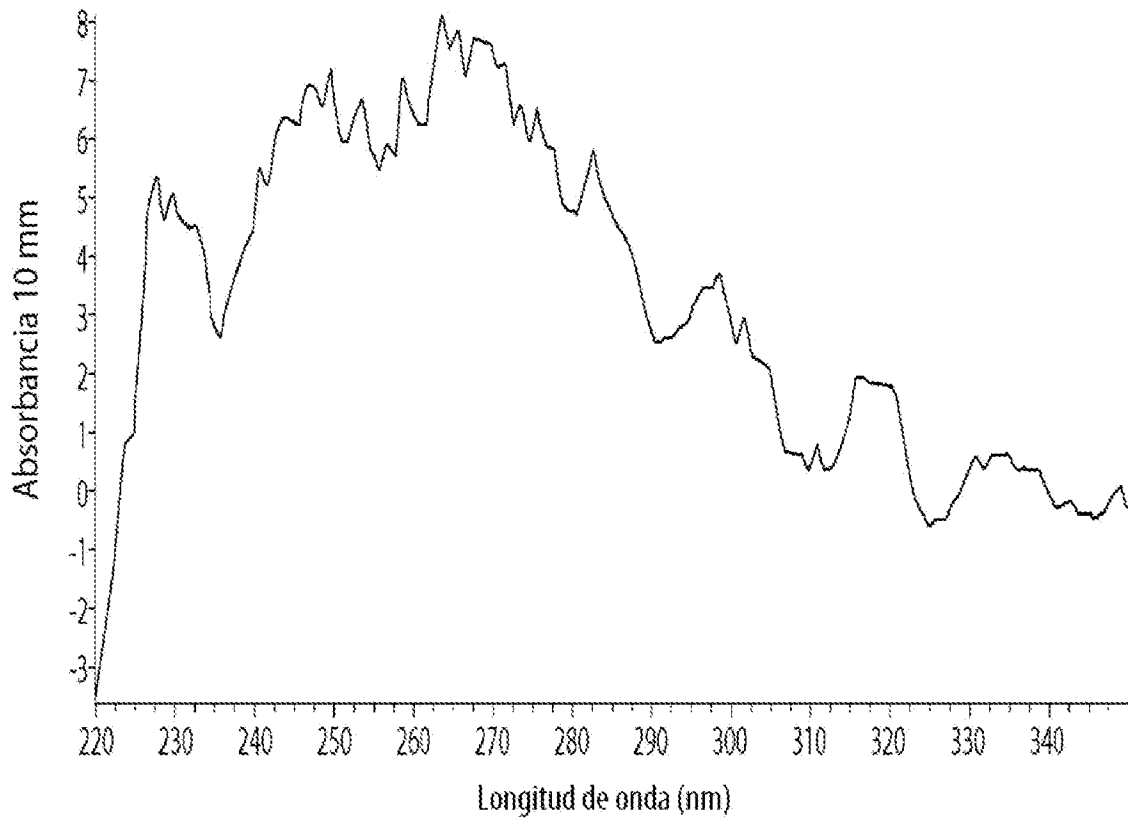


Fig. 6D

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
4	pseudo-iso-CTP	lab	8/15/2011 11:29:10 AM	1332.5	ng/µl	33.311	13.674	2.44	1.79	ARN	40.00

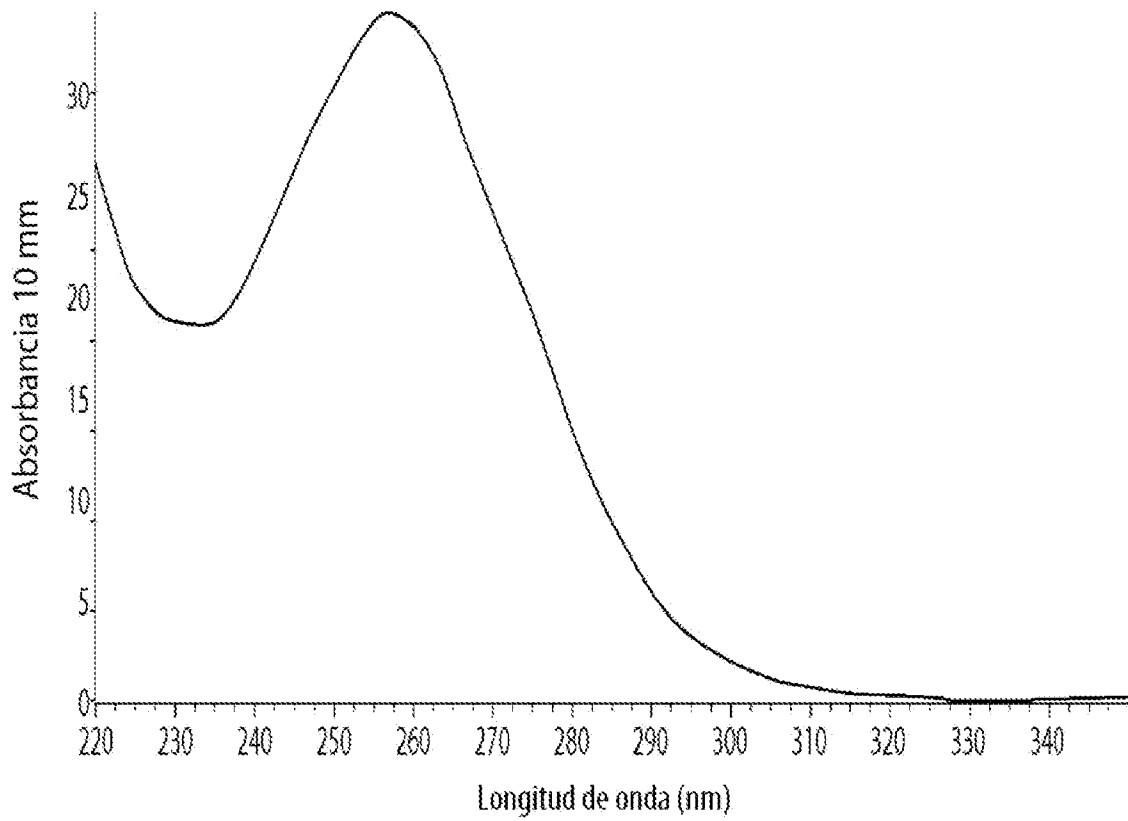


Fig. 6E

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
6	5-yodo-UTP	lab	8/15/2011 11:31:06 AM	1179.4	ng/ul	29.486	16.726	1.76	1.10	ARN	40.00

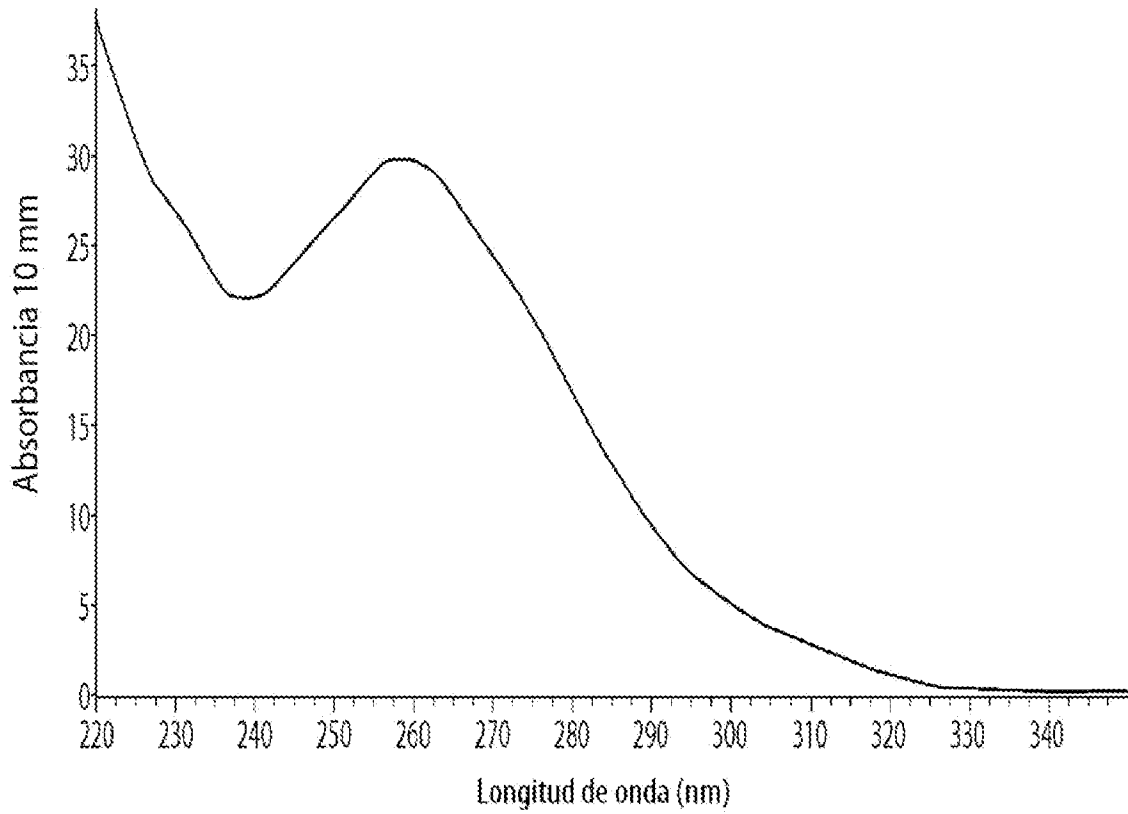


Fig. 6F

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
7	N1 metil-pseudoUTP	lab	8/15/2011 11:32:15 AM	1408.1	ng/ $\mu$ l	35.202	18.565	1.90	2.17	ARN	40.00

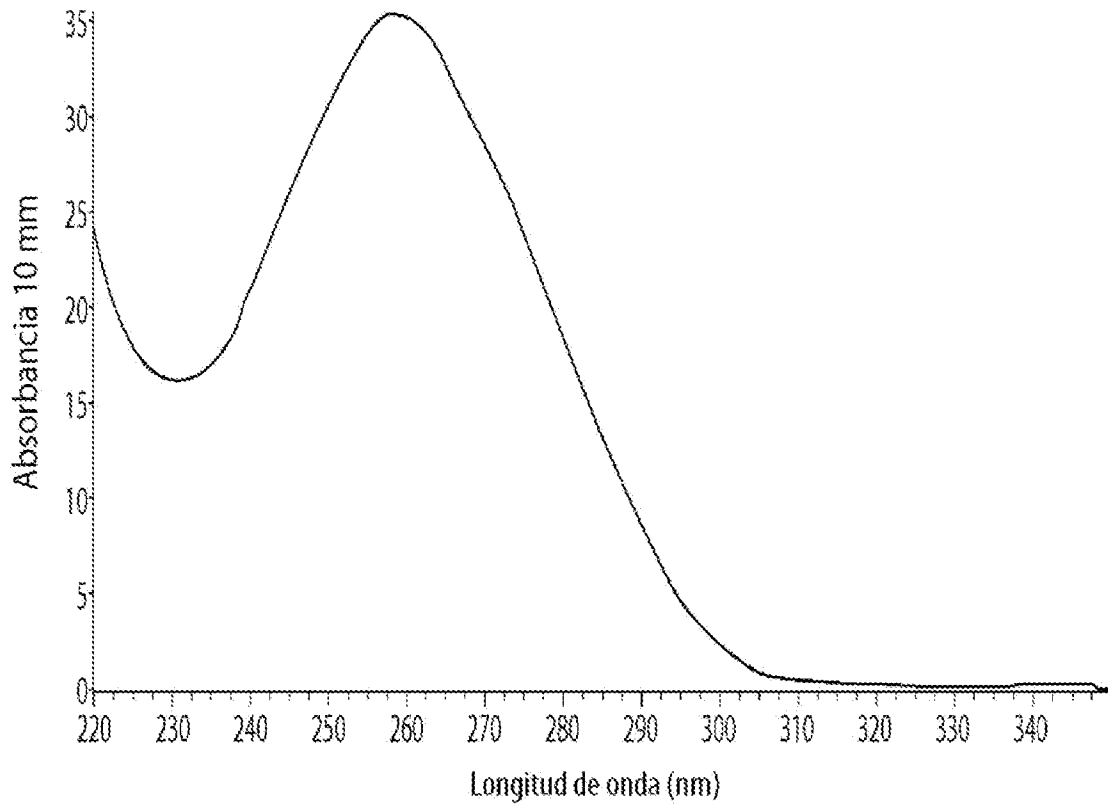


Fig. 6G

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
15	ITP	lab	8/15/2011 11:40:05 AM	225.1	ng/μl	5.628	5.781	0.97	1.05	ARN	40.00

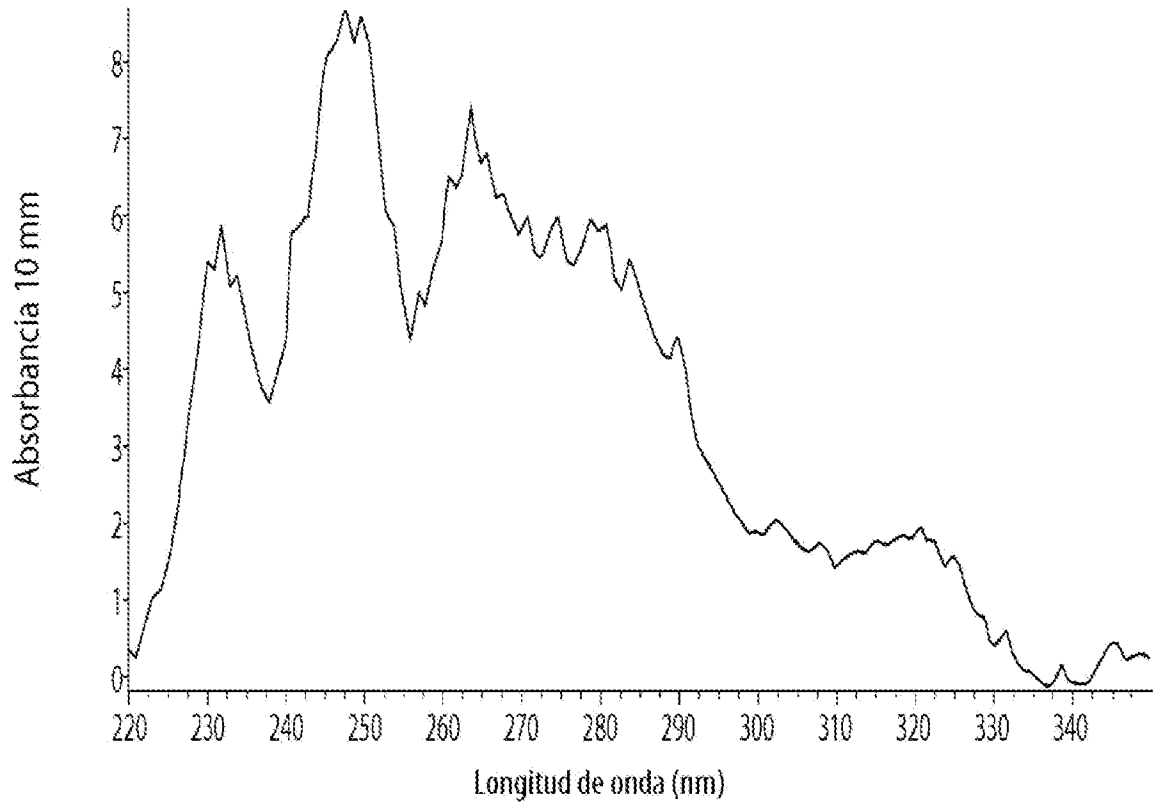


Fig. 6H

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
18	N1-metil-GTP	lab	8/15/2011 11:43:10 AM	161.5	ng/ $\mu$ l	4.036	2.917	1.38	0.67	ARN	40.00

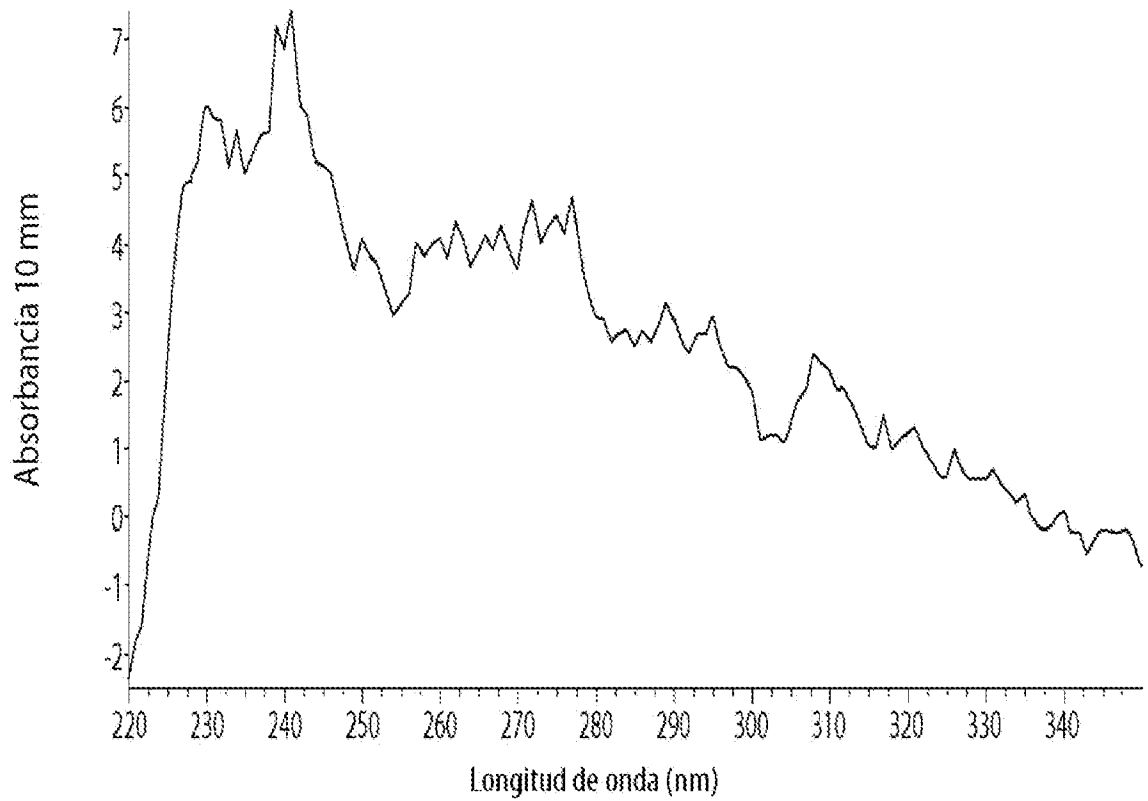


Fig. 6l

ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
pseudo-iso-CTP/ N1-metil-pseudo-UTP	lab	9/2/2011 3:48:37 PM	1268.3	ng/ $\mu$ l	31.707	17.208	1.84	1.64	ARN	40.00

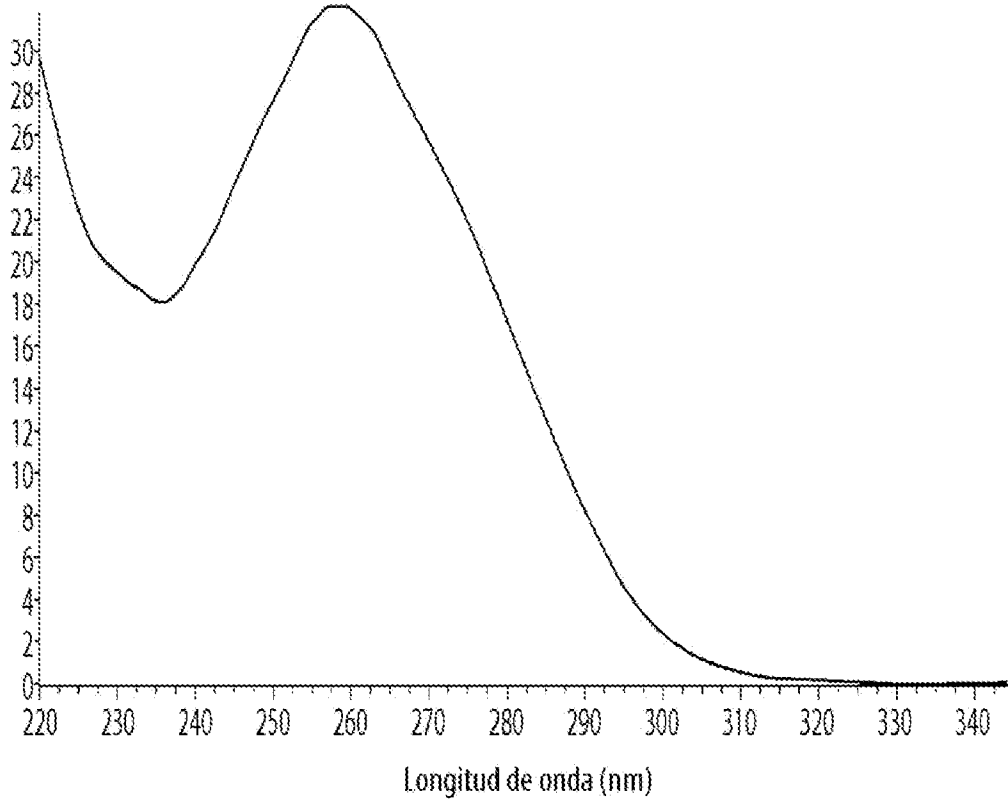


Fig. 6J

ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
Pir-CTP	lab	9/12/2011 2:03:00 PM	1103.7	ng/µl	27.592	11.101	2.49	1.14	ARN	40.00

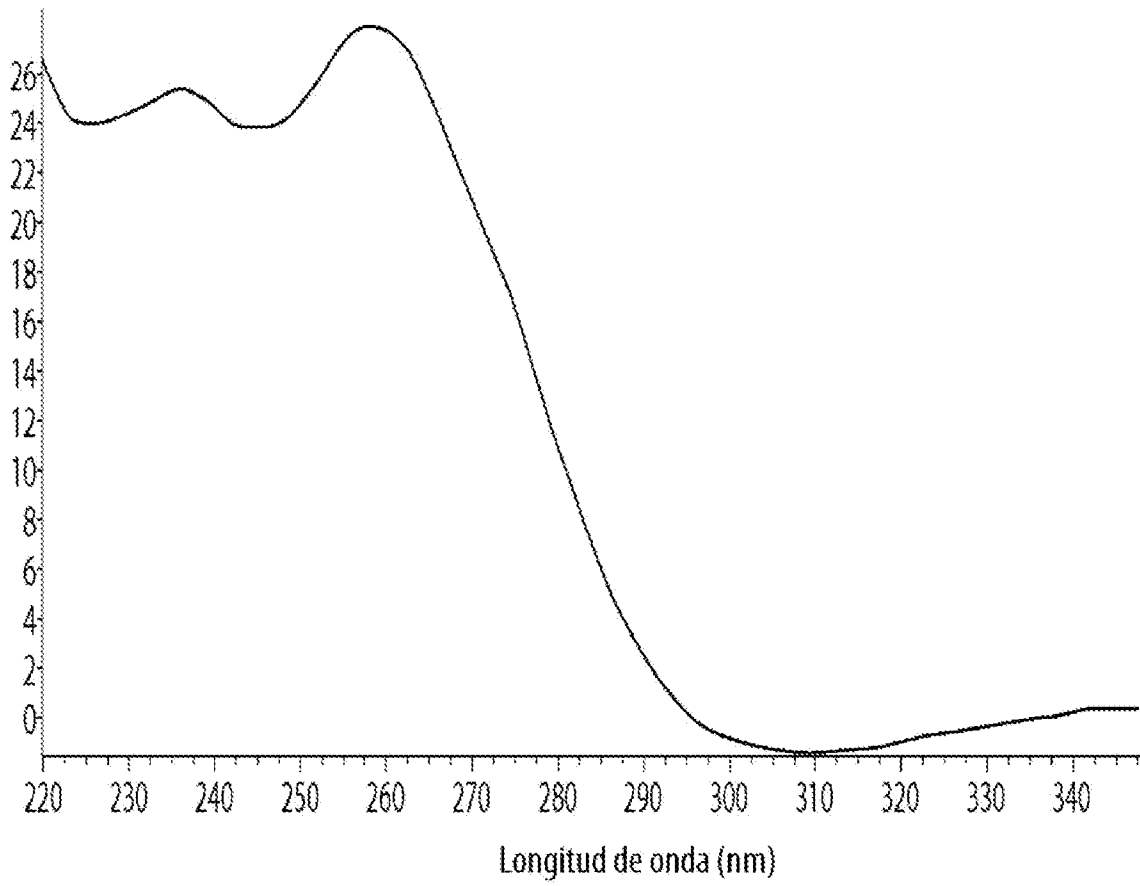


Fig. 6K

ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Conc. de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
S-me-CTP/N1-Me-pseudo-UTP	lab	9/12/2011 3:47:12 PM	1094.3	ng/μl	27.358	16.135	1.70	2.11	ARN	40.00

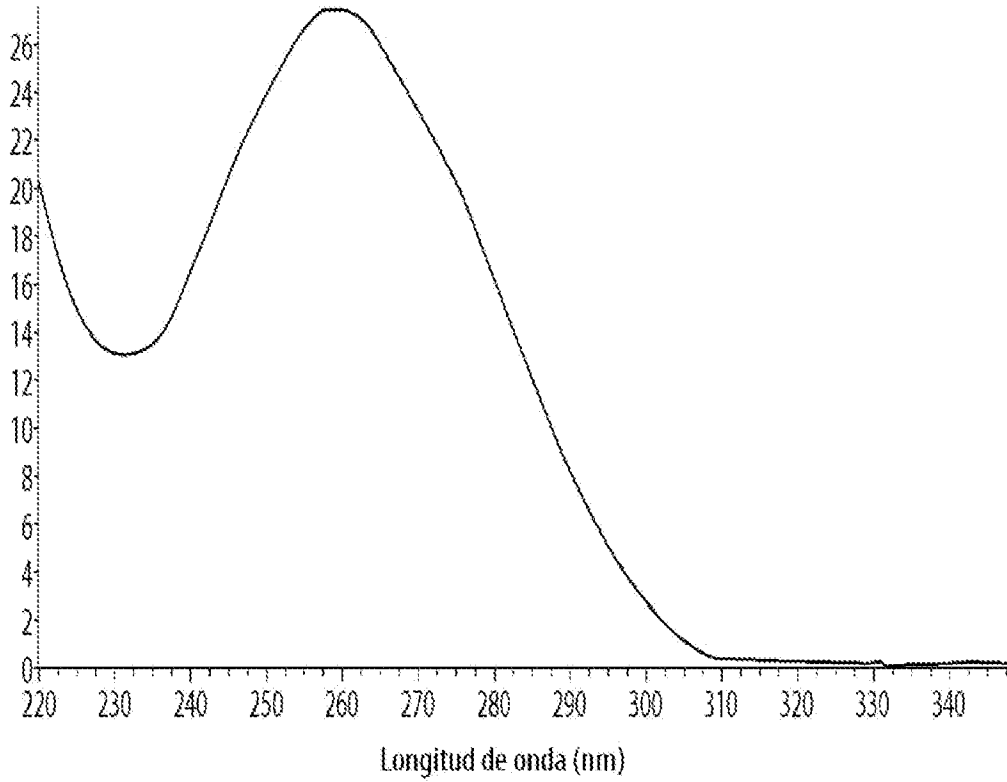


Fig. 6L