

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 961 245**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)
C12N 15/64 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2020** **PCT/US2020/063494**
87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2021** **WO21113777**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2020** **E 20834039 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2023** **EP 3920976**

54 Título: **Composiciones y métodos de ARN circular**

30 Prioridad:

04.12.2019 US 201962943779 P
04.12.2019 US 201962943797 P
10.02.2020 US 202062972194 P
08.05.2020 US 202063022248 P
05.10.2020 US 202063087582 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2024

73 Titular/es:

ORNA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
620 Memorial Drive, 2nd Floor
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

GOODMAN, BRIAN;
WESSELHOEFT, ALEXANDER;
HORHOTA, ALLEN T.;
YANG, JUNGHOON y
OTT, KRISTEN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 961 245 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos de ARN circular

5 ANTECEDENTES

[0001] La terapia génica convencional implica el uso de ADN para la inserción de información genética deseada en las células huésped. El ADN introducido en la célula suele integrarse hasta cierto punto en el genoma de una o más células transfectadas, lo que permite una acción duradera del material genético introducido en el huésped. Si bien tal acción sostenida puede generar beneficios sustanciales, la integración del ADN exógeno en el genoma del huésped también puede tener muchos efectos nocivos. Por ejemplo, es posible que el ADN introducido se inserte en un gen intacto, dando como resultado una mutación que impida o incluso elimine totalmente la función del gen endógeno. Por lo tanto, la terapia génica con ADN puede dar como resultado el deterioro de una función genética vital en el huésped tratado, como, por ejemplo, la eliminación o la reducción perjudicial de la producción de una enzima esencial o la interrupción de un gen crítico para la regulación del crecimiento celular, lo que resulta en proliferación celular no regulada o cancerosa. Además, con la terapia génica convencional basada en ADN es necesario para que la expresión eficaz del producto génico deseado incluya una secuencia promotora fuerte, lo que de nuevo puede conducir a cambios indeseables en la regulación de la expresión génica normal en la célula. También es posible que el material genético basado en ADN dé como resultado la inducción de anticuerpos anti-ADN no deseados, lo que a su vez puede desencadenar una respuesta inmune posiblemente fatal. Los enfoques de terapia génica que utilizan vectores virales también pueden provocar una respuesta inmunitaria adversa. En algunas circunstancias, el vector viral puede incluso integrarse en el genoma del huésped. Además, la producción de vectores virales de grado clínico también es costosa y requiere mucho tiempo. Dirigir la entrega del material genético introducido utilizando vectores virales también puede ser difícil de controlar. Por lo tanto, aunque se ha evaluado la terapia génica basada en ADN para la administración de proteínas secretadas utilizando vectores virales (patente de EE. UU. nº 6.066.626; US2004/0110709), estos enfoques pueden estar limitados por estas diversas razones.

[0002] A diferencia del ADN, el uso de ARN como agente de terapia génica es sustancialmente más seguro porque el ARN no implica el riesgo de integrarse de forma estable en el genoma de la célula transfectada, eliminando así la preocupación de que el material genético introducido altere el funcionamiento normal de un gen esencial, o causar una mutación que resulte en efectos nocivos u oncogénicos, y no se requieren secuencias promotoras extrañas para la traducción efectiva de la proteína codificada, evitando nuevamente posibles efectos secundarios nocivos. Además, no es necesario que el ARNm entre en el núcleo para realizar su función, mientras que el ADN debe superar esta importante barrera.

[0003] El ARN circular es útil en el diseño y producción de formas estables de ARN. La circularización de una molécula de ARN proporciona una ventaja para el estudio de la estructura y función del ARN, especialmente en el caso de moléculas que son propensas a plegarse en una conformación inactiva (Wang y Ruffner, 1998). El ARN circular también puede ser particularmente interesante y útil para aplicaciones *in vivo*, especialmente en el área de investigación del control de la expresión génica y la terapéutica basada en ARN, incluida la terapia de reemplazo de proteínas y la vacunación.

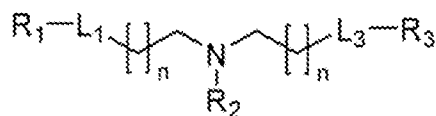
[0004] Antes de esta invención, existían tres técnicas principales para producir ARN circularizado *in vitro*: el método mediado por férula, el método intrón-exón permutado y el método mediado por ARN ligasa. Sin embargo, las metodologías existentes están limitadas por el tamaño del ARN que puede circularizarse, lo que limita su aplicación terapéutica.

[0005] Lesca M. Holdt et al se refiere a "Circular RNAs as Therapeutic Agents and Targets" in *Frontiers in Physiology*, vol. 9, 9 de octubre de 2018.

RESUMEN

[0006] La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Esta solicitud proporciona ARN circulares y vehículos de transferencia, junto con composiciones relacionadas para su uso en métodos de tratamiento. Los vehículos de transferencia pueden comprender, por ejemplo, lípidos ionizables, lípidos modificados con PEG y/o lípidos estructurales, formando así nanopartículas lipídicas que encapsulan los ARN circulares. Los ARN circulares pueden comprender fragmentos de intrones del grupo I, espaciadores, un IRES, regiones formadoras de dúplex y/o una secuencia de expresión, teniendo así las características de expresión mejorada, estabilidad funcional, baja inmunogenicidad, facilidad de fabricación y/o semitransmisión extendida. vida en comparación con el ARN lineal. Las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos ARN circulares y vehículos de transferencia son particularmente adecuadas para la expresión eficaz de proteínas en células inmunitarias *in vivo*. La presente solicitud también proporciona ARN precursores y materiales útiles para producir los ARN precursores o circulares, que tienen una eficiencia de circularización mejorada y/o son compatibles con métodos eficaces de purificación de ARN circular.

[0007] En consecuencia, un aspecto de la presente solicitud proporciona una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido de ARN circular y un vehículo de transferencia que comprende un lípido ionizable representado por la Fórmula (1):

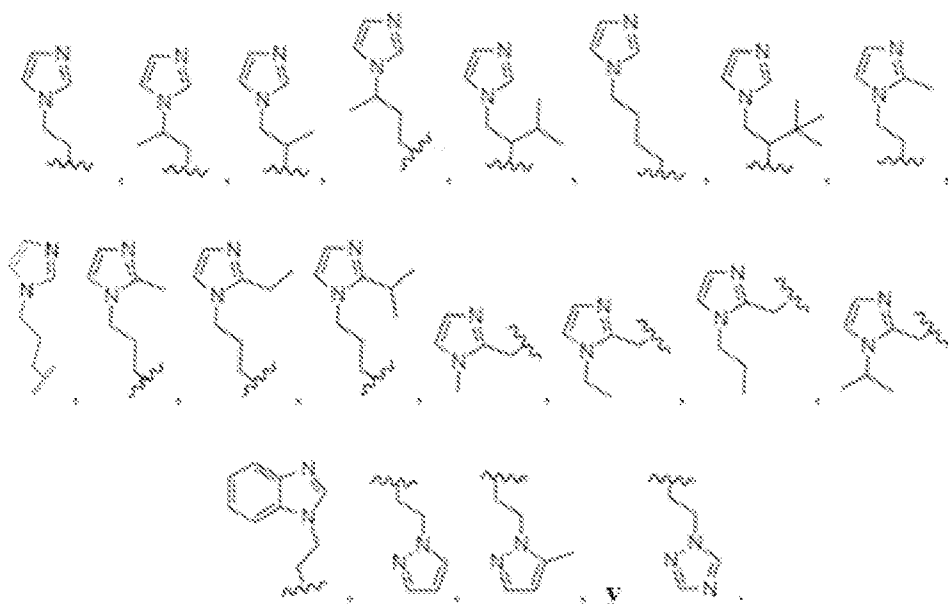


Formula (I).

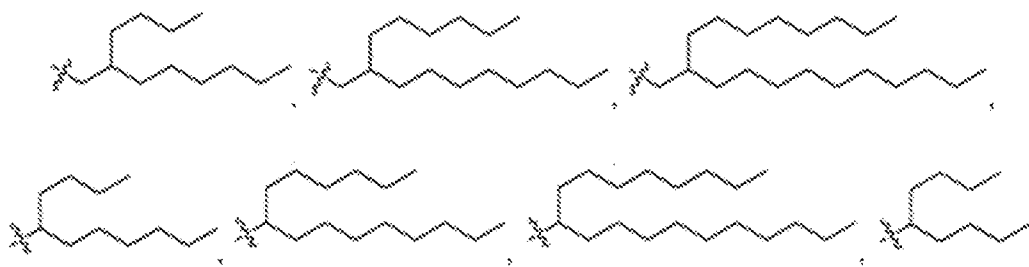
donde:

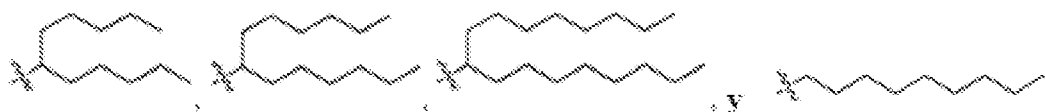
cada n es independientemente un número entero de 2 a 15;

L_1 y L_3 son cada uno independientemente $-OC(O)-^*$ o $-C(O)O-^*$, en donde "*" indica el punto de unión a R_1 o R_3 ; R_1 y R_3 son cada uno independientemente un alquilo C_9-C_{20} o alquenilo C_9-C_{20} lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo que consiste en oxo, halo, hidroxi, ciano, alquilo, alquenilo, aldehído, heterociclilalquilo, hidroxialquilo, dihidroxialquilo, hidroxialquilaminoalquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, (heterociclil)(alquil)aminoalquilo, heterociclilo, heteroarilo, alquilheteroarilo, alquinilo, alcoxi, amino, dialquilamino, aminoalquilcarbonilamino, aminocarbonilalquilamino, (aminocarbonilalquil)(alquil)amino, alquenilcarbonilamino, hidroxicarbonilo, alquiloxicarbonilo, aminocarbonilo, aminoalquilaminocarbonilo, alquilaminoalquilaminocarbonilo, dialquilaminoalquilaminocarbonilo, heterociclilalquilaminocarbonilo, (alquilaminoalquil)(alquil)aminocarbonilo, alquilaminoalquilcarbonilo, dialquilaminoalquilcarbonilo, heterociclilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alquinilcarbonilo, alquilsulfóxido, alquilsulfóxidoalquilo, alquilsulfonilo y alquilsulfonaalquilo; y R_2 se selecciona de un grupo que consta de:



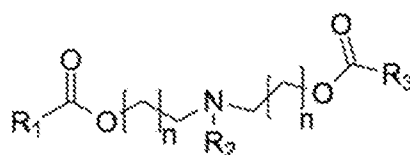
[0008] En algunas formas de realización, R_1 y R_3 se seleccionan cada uno independientemente de un grupo que consiste en:



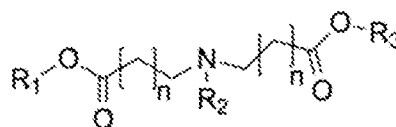


En algunas formas de realización, R_1 y R_3 son iguales. En algunas formas de realización, R_1 y R_3 son diferentes.

[0009] En algunas formas de realización, el lípido ionizable de Fórmula (1) está representado por la Fórmula (1-1) o la Fórmula (1-2):

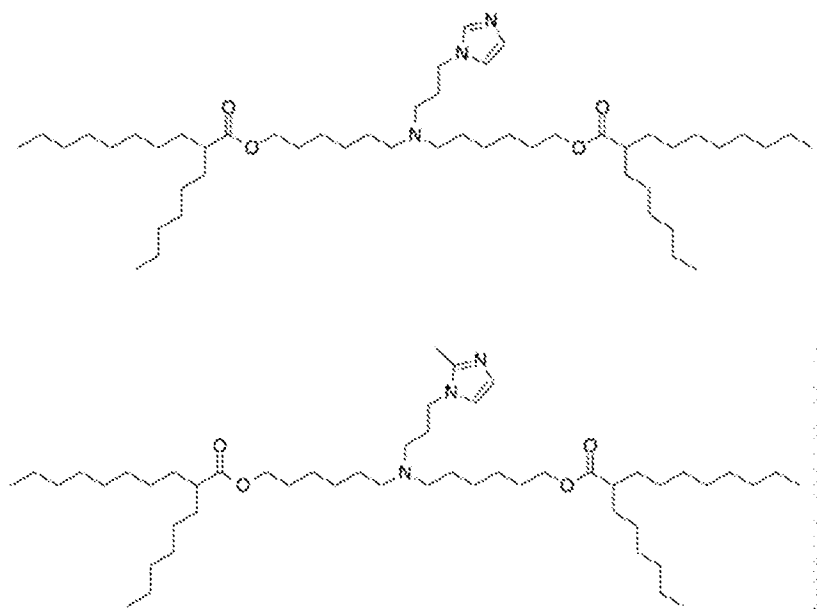


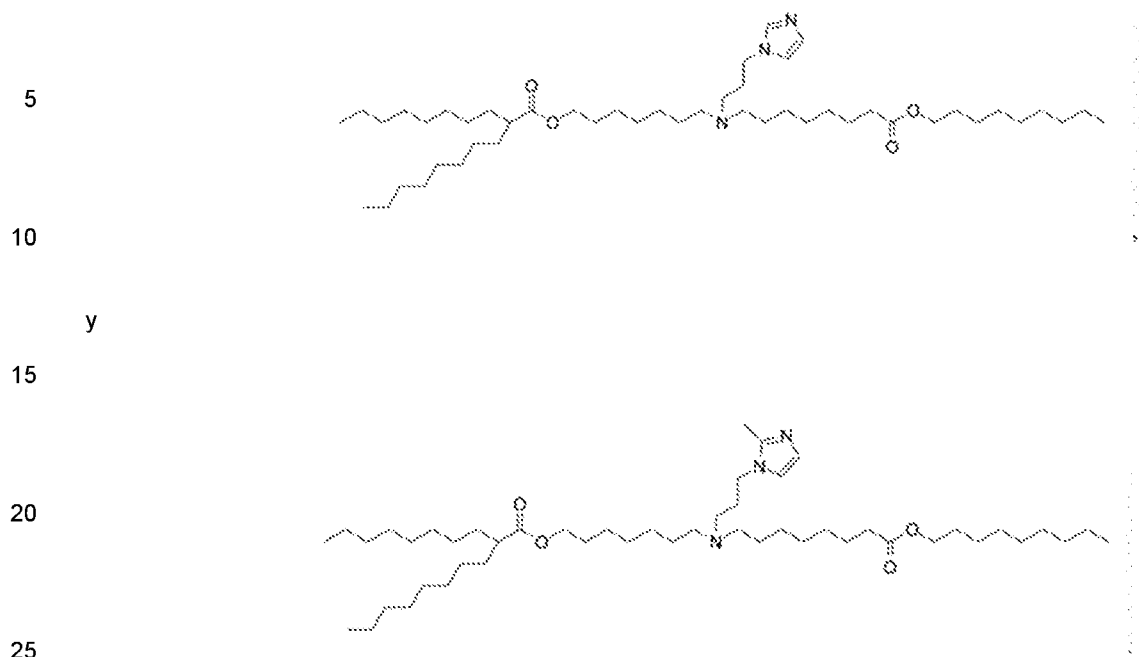
Fórmula (1-1).



Fórmula (1-2).

[0010] En algunas formas de realización, el lípido ionizable se selecciona del grupo que consiste en:





[0011] En algunas formas de realización, el ARN circular comprende una primera secuencia de expresión. En algunas formas de realización, la primera secuencia de expresión codifica una proteína terapéutica. En algunas formas de realización, la primera secuencia de expresión codifica una citoquina o un fragmento funcional de la misma. En algunas formas de realización, la primera secuencia de expresión codifica un factor de transcripción. En algunas formas de realización, la primera secuencia de expresión codifica un inhibidor del punto de control inmunológico. En algunas formas de realización, la primera secuencia de expresión codifica un receptor de antígeno quimérico.

[0012] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular comprende además una segunda secuencia de expresión. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular comprende además un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES).

[0013] En algunas formas de realización, la primera y segunda secuencias de expresión están separadas por un elemento de salto ribosómico o una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de escisión de proteasa. En algunas formas de realización, la primera secuencia de expresión codifica una primera cadena de receptor de células T (TCR) y la segunda secuencia de expresión codifica una segunda cadena de TCR.

[0014] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular comprende uno o más sitios de unión de microARN. El sitio de unión del microARN es reconocido por un microARN expresado en el hígado. En algunas formas de realización, el sitio de unión de microARN es reconocido por miR-122.

[0015] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular comprende un primer IRES asociado con una mayor expresión de proteínas en una célula inmune humana que en una célula humana de referencia. En algunas formas de realización, la célula inmunitaria humana es una célula T, una célula NK, una célula NKT, un macrófago o un neutrófilo. En algunas formas de realización, la célula humana de referencia es una célula hepática.

[0016] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular comprende, en el siguiente orden: a) un fragmento de intrón post-empalme de un fragmento de intrón del grupo I en 3', b) un IRES, c) una secuencia de expresión, y d) un fragmento de intrón post-empalme de un fragmento de intrón del grupo I en 5'. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular comprende. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular comprende un primer espaciador antes del fragmento de intrón posterior al empalme del fragmento de intrón del grupo I en 3', y un segundo espaciador después del fragmento de intrón posterior al empalme del fragmento de intrón del grupo I en 5'. En algunas formas de realización, el primer y segundo espaciadores tienen cada uno una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos.

[0017] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden: un fragmento de intrón del grupo I en 3', un IRES, una secuencia de expresión y un fragmento de intrón del grupo I en 5'.

- 5 **[0018]** En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden: una región formadora de dúplex externa en 5', un fragmento de intrón del grupo I en 3', un espaciador interno en 5' que comprende opcionalmente un región formadora de dúplex interna 5', un IRES, una secuencia de expresión, un espaciador interno 3' que comprende opcionalmente una región formadora de dúplex interna 3', un fragmento de intrón del grupo I en 5' y una región formadora de dúplex externa 3'.
- 10 **[0019]** En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden: una región formadora de dúplex externa en 5', un espaciador externo en 5', un fragmento de intrón del grupo I en 3', un 'espaciador interno que comprende opcionalmente una región formadora de dúplex interna en 5', un IRES, una secuencia de expresión, un espaciador interno en 3' que comprende opcionalmente una región formadora de dúplex interna en 3', un fragmento de intrón del grupo I en 5', un espaciador externo en 3', y una región de formación dúplex externa de 3'.
- 15 **[0020]** En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante la circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden: un fragmento de intrón del grupo I en 3', un espaciador interno en 5' que comprende una región formadora de dúplex interna en 5', un IRES, una secuencia de expresión, un espaciador interno en 3' que comprende una región formadora de dúplex interna en 3', y un fragmento de intrón del grupo I en 5'.
- 20 **[0021]** En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden: una región formadora de dúplex externa en 5', un espaciador externo en 5', un fragmento de intrón del grupo I en 3', un 'espaciador interno que comprende una región formadora de dúplex interna en 5', un IRES, una secuencia de expresión, un espaciador interno en 3' que comprende una región formadora de dúplex interna en 3', un fragmento de intrón del grupo I en 5', un espaciador externo en 3' y una región de formación dúplex externa 3'.
- 25 **[0022]** En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden: una primera secuencia poliA, una región formadora de dúplex externa 5', un espaciador externo 5', un fragmento de intrón del grupo I en 3', un espaciador interno 5' que comprende una región formadora de dúplex interna en 5', un IRES, una secuencia de expresión, un espaciador interno en 3' que comprende una región formadora de dúplex interna en 3', un fragmento de intrón del grupo I en 5', un espaciador, una región formadora de dúplex externa 3' y una segunda secuencia poliA.
- 30 **[0023]** En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden: una primera secuencia poliA, un espaciador externo 5', un fragmento de intrón del grupo I en 3', un espaciador interno 5' que comprende una región formadora de dúplex interna en 5', un IRES, una secuencia de expresión, un espaciador interno en 3' que comprende una región formadora de dúplex interna en 3', un fragmento de intrón del grupo I en 5', un espaciador externo en 3' y una segunda secuencia poliA.
- 35 **[0024]** En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden: una primera secuencia poliA, un espaciador externo 5', un fragmento de intrón del grupo I en 3', un espaciador interno 5' que comprende una región formadora de dúplex interna en 5', un IRES, una secuencia de expresión, un condón de parada, un espaciador interno en 3' que comprende una región formadora de dúplex interna en 3', un fragmento de intrón del grupo I en 5', un espaciador externo en 3' y un segunda secuencia poliA.
- 40 **[0025]** En algunas formas de realización, al menos uno de los espaciadores internos o externos 3' o 5' tiene una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 60 nucleótidos. En algunas formas de realización, las regiones formadoras de dúplex externas 3' y 5' tienen cada una una longitud de aproximadamente 10-50 nucleótidos. En algunas formas de realización, las regiones formadoras de dúplex internas 3' y 5' tienen cada una una longitud de aproximadamente 6-30 nucleótidos.
- 45 **[0026]** En algunas formas de realización, el IRES se selecciona de la Tabla 17, o es un fragmento funcional o variante del mismo. En algunas formas de realización, el IRES tiene una secuencia de un IRES del virus del síndrome de Taura, virus Triatoma, virus de la encefalomiелitis de Theiler, virus simio 40, virus Solenopsis invicta 1, virus Rhopalosiphum padi, virus de la reticuloendoteliosis, poliovirus humano 1, virus del intestino Plautia stali, Cachemira. virus de las abejas, rinovirus humano 2, virus Homalodisca coagulata-1, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, virus Homalodisca coagulata-1, virus Himetobi P, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis GB, virus de la fiebre aftosa, enterovirus humano 71, virus de la rinitis equina, virus similar a Ectropis obliqua picorna, virus de la encefalomiocarditis, virus de Drosophila C, virus coxsackie humano B3, tobamovirus Crucifer, virus de la parálisis del grillo, virus de la diarrea viral bovina 1, virus de la célula reina negra, virus de la parálisis letal del pulgón, virus de la encefalomiелitis aviar, virus de la parálisis aguda de las abejas, virus de la mancha anular clorótica del hibisco, virus de la peste porcina clásica, FGF2 humano, SFTPA1 humano, AML1/RUNX1 humano, antenapedia de Drosophila, AQP4 humano, AT1R humano, BAG-1 humano, BCL2 humano, BiP humano, c-IAPI humano, c-myc humano, eIF4G humano, NDST4L de ratón, LEF1 humano, HIF1 alfa de ratón, n.myc humano, Gtx de ratón, p27kipl humano, PDGF2/c-sis humano, p53 humano, Pim-1 humano, Rbm3 de ratón, Reaper de Drosophila, Canino Scamper, Drosophila Ubx, Human UNR,
- 55
- 60
- 65

Mouse UtrA, Human VEGF-A, Human XIAP, Drosophila sin pelo, S. cerevisiae TFIIID, S. cerevisiae YAP1, virus del grabado del tabaco, virus de la arruga del nabo, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCVCf, EMCV pEC9, Picobimavirus, HCV QC64, Cosavirus humano E/D, Cosavirus humano F, Cosavirus humano JMY, Rinovirus NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, Salivirus A SH1, Salivirus FHB, Salivirus NG-J1, Parechovirus humano 1, Crohivirus B, Yc-3, Rosavirus M-7, Shanbavirus A, Pasivirus A, Pasivirus A 2, Echovirus E14, Parechovirus humano 5, Virus Aichi, Virus de la hepatitis A HA16, Phopivirus, CVA10, Enterovirus C, Enterovirus D, Enterovirus J, Pegivirus humano 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, Pegivirus A 1220, Pasivirus A 3, Sapelovirus, Rosavirus B, Virus Bakunsa, Tremovirus A, Pasivirus porcino 1, PLV-CHN, Pasivirus A, Sicinivirus, Hepacivirus K, Hepacivirus A, BVDV1, Virus de la enfermedad fronteriza, BVDV2, CSFV-PK15C, Dicistrovirus SF573, Virus tipo picorna de Hubei, CRPV, Picornavirus Apodemus Agrarius, Kobuvirus caprino, Parabovirus, Salivirus A BN5, Salivirus A BN2, Salivirus A 02394, Salivirus A GUT, Salivirus A CH, Salivirus A SZ1, Salivirus FHB, CVB3, CVB1, Echovirus 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 o un aptámero de eIF4G.

[0027] En algunas formas de realización, la primera y segunda secuencias poliA tienen cada una una longitud de aproximadamente 15-50 nt. En algunas formas de realización, la primera y segunda secuencia poliA tienen cada una una longitud de aproximadamente 20-25 nt.

[0028] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular contiene al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 99 % de nucleótidos de origen natural. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular consta de nucleótidos de origen natural.

[0029] En algunas formas de realización, la secuencia de expresión está optimizada con codones. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se optimiza para que carezca de al menos un sitio de unión de microARN presente en un polinucleótido preoptimizado equivalente. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular está optimizado para carecer de al menos un sitio de unión de microARN capaz de unirse a un microARN presente en una célula dentro de la cual se expresa el polinucleótido de ARN circular. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se optimiza para que carezca de al menos un sitio susceptible a endonucleasa presente en un polinucleótido preoptimizado equivalente. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se optimiza para que carezca de al menos un sitio susceptible a la endonucleasa capaz de ser escindido por una endonucleasa presente en una célula dentro de la cual se expresa la endonucleasa. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se optimiza para que carezca de al menos un sitio susceptible de edición de ARN presente en un polinucleótido preoptimizado equivalente.

[0030] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular tiene una longitud de aproximadamente 100 nt a aproximadamente 10.000 nt. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular tiene una longitud de aproximadamente 100 nt a aproximadamente 15.000 nt. En algunas formas de realización, el ARN circular es más compacto que un polinucleótido de ARN lineal de referencia que tiene la misma secuencia de expresión que el polinucleótido de ARN circular.

[0031] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica tiene una duración del efecto terapéutico en una célula humana mayor o igual a la de una composición que comprende un polinucleótido de ARN lineal de referencia que tiene la misma secuencia de expresión que el polinucleótido de ARN circular. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN lineal de referencia es un ARNm lineal, no modificado o modificado con nucleósidos, completamente procesado que comprende una estructura cap1 y una cola poliA de al menos 80 nt de longitud.

[0032] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica tiene una duración del efecto terapéutico *in vivo* en humanos mayor que la de una composición que comprende un polinucleótido de ARN lineal de referencia que tiene la misma secuencia de expresión que el polinucleótido de ARN circular. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica tiene una duración del efecto terapéutico *in vivo* en humanos de al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90 o al menos aproximadamente 100 horas.

[0033] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica tiene una vida media funcional en una célula humana mayor o igual a la de un valor umbral predeterminado. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica tiene una vida media funcional *in vivo* en humanos mayor que la de un valor umbral predeterminado. En algunas formas de realización, la vida media funcional se determina mediante un ensayo de proteína funcional. En algunas formas de realización, el ensayo de proteína funcional es un ensayo de luciferasa *in vitro*. En algunas formas de realización, el ensayo de proteína funcional comprende medir niveles de proteína codificada por la secuencia de expresión del polinucleótido de ARN circular en una muestra de suero o tejido de un paciente. En algunas formas de realización, el valor umbral predeterminado es la vida media funcional de un polinucleótido de ARN lineal de referencia que comprende la misma secuencia de expresión que el polinucleótido de ARN circular. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica tiene una vida media funcional de al menos aproximadamente 20 horas.

[0034] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un lípido estructural y un lípido modificado con PEG. En algunas formas de realización, el lípido estructural se une a C1q y/o promueve la unión del vehículo de transferencia que comprende dicho lípido a C1q en comparación con un vehículo de transferencia de control que carece del lípido estructural y/o aumenta la absorción del vehículo de transferencia unido a C1q en una célula inmune. en comparación con un vehículo de transferencia de control que carece del lípido estructural. En algunas formas de realización, la célula inmunitaria es una célula T, una célula NK, una célula NKT, un macrófago o un neutrófilo.

[0035] En algunas formas de realización, el lípido estructural es colesterol. En algunas formas de realización, el lípido estructural es betasitosterol. En algunas formas de realización, el lípido estructural no es beta-sitosterol.

[0036] En algunas formas de realización, el lípido modificado con PEG es DSPE-PEG, DMG-PEG o PEG-1. En algunas formas de realización, el lípido modificado con PEG es DSPE-PEG(2000).

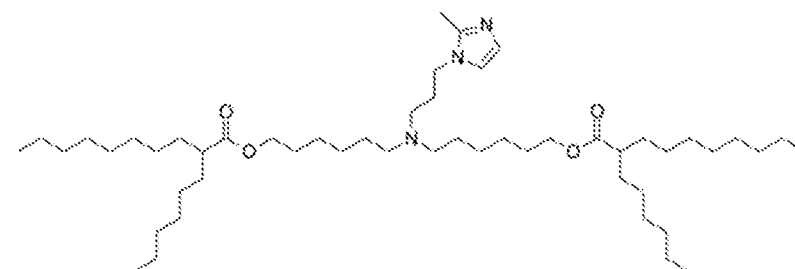
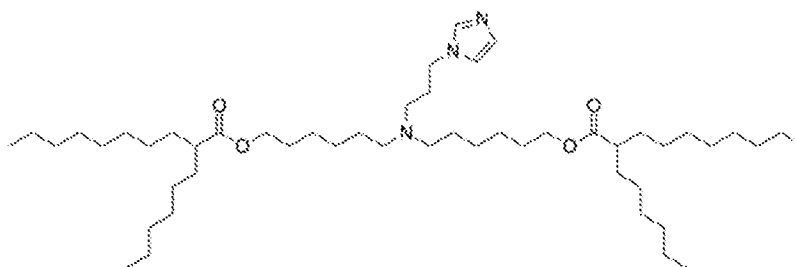
[0037] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además un lípido auxiliar. En algunas formas de realización, el lípido auxiliar es DSPC o DOPE.

[0038] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende DOPE, colesterol y DSPE-PEG.

[0039] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia comprende aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 4 % de lípidos modificados con PEG por proporción molar. En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia comprende aproximadamente 1 % a aproximadamente 2 % de lípidos modificados con PEG por proporción molar.

[0040] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia comprende

a. un lípido ionizable está representado por

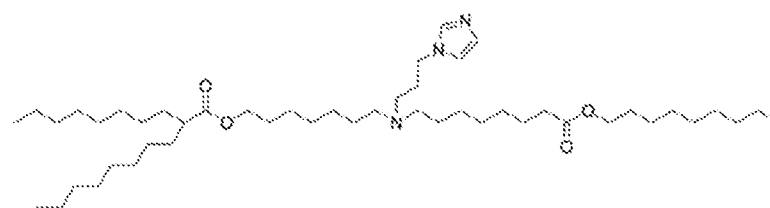
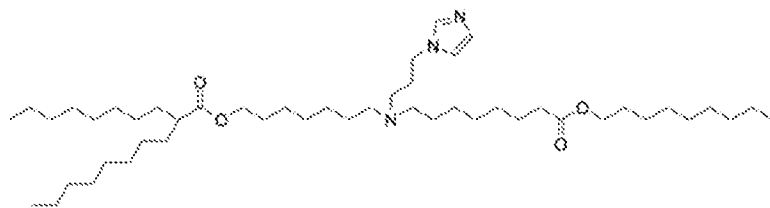


b. DOPE,
c. colesterol y
d. DSPE-PEG (2000).

[0041] En formas de realización, la proporción molar de lípido ionizable: DSPC:colesterol:DSPE-PEG(2000) es 62:4:33:1.

[0042] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia comprende

a. un lípido ionizable está representado por



- b. DOPE,
- c. colesterol y
- d. DSPE-PEG (2000).

[0043] En formas de realización, la proporción molar de lípido ionizable:DSPC:colesterol:DSPE-PEG(2000) es 50:10:38,5:1,5.

[0044] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia tiene una relación nitrógeno:fosfato (N:P) de aproximadamente 3 a aproximadamente 6.

[0045] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia se formula para la liberación endosomal del polinucleótido de ARN circular.

[0046] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia es capaz de unirse a APOE. En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia interactúa con la apolipoproteína E (APOE) menos que un vehículo de transferencia equivalente cargado con un ARN lineal de referencia que tiene la misma secuencia de expresión que el polinucleótido de ARN circular. En algunas formas de realización, la superficie exterior del vehículo de transferencia está sustancialmente libre de sitios de unión de APOE.

[0047] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia tiene un diámetro de menos de aproximadamente 120 nm. En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia no forma agregados con un diámetro superior a 300 nm.

[0048] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia tiene una vida media *in vivo* de menos de aproximadamente 30 horas.

[0049] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia es capaz de absorción dependiente del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) en una célula. En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia es capaz de absorber LDLR independiente en una célula.

[0050] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está sustancialmente libre de ARN lineal.

[0051] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además un resto de dirección conectado operativamente al vehículo de transferencia. En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento se une específicamente a un antígeno de célula inmunitaria o de forma indirecta. En algunas formas de realización, el antígeno de células inmunitarias es un antígeno de células T. En algunas formas de realización, el antígeno de células T se selecciona del grupo que consiste en CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD4, integrina beta7, integrina beta2 y C1q.

[0052] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además una molécula adaptadora que comprende un resto de unión al vehículo de transferencia y un resto de unión a células, en donde el resto de direccionamiento se une específicamente al resto de unión al vehículo de transferencia y el resto de unión a células se une específicamente a un antígeno de célula diana. En algunas formas de realización, el antígeno de la célula diana es un antígeno de célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el antígeno de célula inmunitaria es un antígeno de célula T, una célula NK, una célula NKT, un macrófago o un neutrófilo. En algunas formas de realización, el antígeno de células T se selecciona del grupo que consiste en CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD4, integrina beta7, integrina beta2, CD25, CD39, CD73, receptor A2a, receptor A2b y C1q. En algunas formas de realización, el antígeno de células inmunitarias es un antígeno de macrófago. En algunas formas de realización, el antígeno de macrófago se selecciona del grupo que consiste en receptor de manosa, CD206 y C1q.

[0053] En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento es una molécula pequeña. En algunas formas de realización, la molécula pequeña se une a una ectoenzima en una célula inmune, en donde la ectoenzima se selecciona del grupo que consiste en CD38, CD73, receptor de adenosina 2a y receptor de adenosina 2b. En algunas formas de realización, la molécula pequeña es manosa, una lectina, acivicina, biotina o digoxigenina.

[0054] En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento es un fragmento Fv (scFv) de cadena única, nanocuerpo, péptido, macrociclo basado en péptido, minicuerpo, ligando de molécula pequeña tal como folato, ácido arginilglicilaspártico (RGD) o péptido modulina alfa 1 soluble en fenol. (PSMA1), región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera o fragmento de la misma.

[0055] En algunas formas de realización, el lípido ionizable tiene una vida media en una membrana celular de menos de aproximadamente 2 semanas. En algunas formas de realización, el lípido ionizable tiene una vida media en una membrana celular de menos de aproximadamente 1 semana. En algunas formas de realización, el lípido ionizable tiene una vida media en una membrana celular inferior a aproximadamente 30 horas. En algunas formas de realización, el lípido ionizable tiene una vida media en una membrana celular menor que la vida media funcional del polinucleótido de ARN circular.

[0056] En otro aspecto, la presente solicitud se puede usar en un método para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o afección. Esto comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas formas de realización, la enfermedad, trastorno o afección está asociada con expresión, actividad o localización aberrante de un polipéptido seleccionado de las Tablas 27 o 28. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular codifica una proteína terapéutica. En algunas formas de realización, la expresión de proteínas terapéuticas en el bazo es mayor que la expresión de proteínas terapéuticas en el hígado. En algunas formas de realización, la expresión de proteínas terapéuticas en el bazo es al menos aproximadamente 2,9 veces la expresión de proteínas terapéuticas en el hígado. En algunas formas de realización, la proteína terapéutica no se expresa a niveles funcionales en el hígado. En algunas formas de realización, la proteína terapéutica no se expresa a niveles detectables en el hígado. En algunas formas de realización, la expresión de proteínas terapéuticas en el bazo es al menos aproximadamente el 63 % de la expresión de proteínas terapéuticas total.

[0057] El polinucleótido de ARN lineal puede comprender, de 5' a 3', un fragmento de intrón del grupo I en 3', un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), una secuencia de expresión y un fragmento de intrón del grupo I en 5', que comprende además un primer espaciador 5' al fragmento de intrón del grupo I en 3' y/o un segundo espaciador 3' al fragmento de intrón del grupo I en 5'.

[0058] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN lineal comprende un primer espaciador en 5' con respecto al fragmento de intrón del grupo I en 3' en 5' con respecto al fragmento de intrón del grupo I en 3'. En algunas formas de realización, el primer espaciador tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos, opcionalmente de 10 a 20 nucleótidos, además opcionalmente aproximadamente 15 nucleótidos. En algunas formas de realización, el primer espaciador comprende una secuencia polIA.

[0059] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN lineal comprende un segundo espaciador 3' al fragmento de intrón del grupo I en 5'. En algunas formas de realización, el segundo espaciador tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos, opcionalmente de 10 a 20 nucleótidos, además opcionalmente aproximadamente 15 nucleótidos. En algunas formas de realización, el segundo espaciador comprende una secuencia polIA.

[0060] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN lineal comprende además un tercer espaciador entre el fragmento de intrón del grupo I en 3' e IRES. En algunas formas de realización, el tercer espaciador tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN lineal comprende además una primera y una segunda regiones formadoras de dúplex capaces de formar un dúplex. En algunas formas de realización, la primera y segunda regiones formadoras de dúplex tienen cada una una longitud de aproximadamente 9 a 19 nucleótidos. En algunas formas de realización, la primera y segunda regiones formadoras de dúplex tienen cada una una longitud de aproximadamente 30 nucleótidos.

[0061] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN lineal tiene expresión mejorada, eficiencia de circularización, estabilidad funcional y/o estabilidad en comparación con un polinucleótido de ARN lineal de referencia, en donde el polinucleótido de ARN lineal de referencia comprende, de 5' a 3', una primera secuencia poliA, un espaciador externo 5', un fragmento de intrón del grupo I en 3', un espaciador interno 5' que comprende una región formadora de dúplex interno 5', un IRES, una secuencia de expresión, un condón de parada, un espaciador interno 3' que comprende una región formadora de dúplex interna en 3', un fragmento de intrón del grupo I en 5', un espaciador externo en 3' y una segunda secuencia poliA.

[0062] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN lineal tiene expresión mejorada, eficiencia de circularización, estabilidad funcional y/o estabilidad en comparación con un polinucleótido de ARN lineal de referencia, en donde el polinucleótido de ARN lineal de referencia comprende, de 5' a 3', un fragmento de intrón del grupo I de referencia 3', un IRES de referencia, una secuencia de expresión de referencia, y un fragmento de intrón del grupo I en 5' de referencia, y no comprende un espaciador en 5' con respecto al fragmento de intrón del grupo I en 3' ni un espaciador en 3' con respecto al fragmento de intrón del grupo I en 5'. En algunas formas de realización, la secuencia de expresión y la secuencia de expresión de referencia tienen la misma secuencia. En algunas formas de realización, el IRES y el IRES de referencia tienen la misma secuencia.

[0063] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN lineal comprende un fragmento de intrón del grupo I de anabaena 3' y un fragmento de intrón del grupo I de anabaena 5'. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN de referencia comprende un fragmento de intrón del grupo I de anabaena 3' de referencia y un fragmento de intrón del grupo I de anabaena 5' de referencia. En algunas formas de realización, el fragmento de intrón del grupo I de anabaena 3' de referencia y el fragmento de intrón del grupo I de anabaena 5' de referencia se generaron utilizando el sitio de permutación L6-5. En algunas formas de realización, el fragmento de intrón del grupo I de anabaena 3' y el fragmento de intrón del grupo I de anabaena 5' no se generaron usando el sitio de permutación L6-5. En algunas formas de realización, el fragmento del intrón del grupo I de anabaena 3' comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 112-123 y 125-150. En algunas formas de realización, el fragmento del intrón del grupo I de 5' anabaena comprende una secuencia correspondiente seleccionada de SEQ ID NO: 73-84 y 86-111. En algunas formas de realización, el fragmento del intrón del grupo I de 5' anabaena comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 73-84 y 86-111. En algunas formas de realización, el fragmento del intrón del grupo I de 3' anabaena comprende o consiste en una secuencia correspondiente seleccionada de SEQ ID NO: 112-124 y 125-150.

[0064] En algunas formas de realización, el IRES comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 348-351. En algunas formas de realización, el IRES de referencia es CVB3. En algunas formas de realización, el IRES no es CVB3. En algunas formas de realización, el IRES comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-64 y 66-72.

[0065] El polinucleótido de ARN circular producido a partir del ARN lineal descrito en el presente documento.

[0066] En otro aspecto, la presente solicitud divulga un ARN circular que comprende, de 5' a 3', un fragmento de intrón del grupo I en 3', un IRES, una secuencia de expresión y un fragmento de intrón del grupo I en 5', en el que el IRES comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 348-351.

[0067] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular comprende además un espaciador entre el fragmento de intrón del grupo I en 3' y el IRES.

[0068] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular comprende además una primera y una segunda regiones formadoras de dúplex capaces de formar un dúplex. En algunas formas de realización, la primera y segunda regiones formadoras de dúplex tienen cada una una longitud de aproximadamente 9 a 19 nucleótidos. En algunas formas de realización, la primera y segunda regiones formadoras de dúplex tienen cada una una longitud de aproximadamente 30 nucleótidos.

[0069] En algunas formas de realización, la secuencia de expresión tiene un tamaño de al menos aproximadamente 1000 nt, al menos aproximadamente 2000 nt, al menos aproximadamente 3000 nt, al menos aproximadamente 4000 nt o al menos aproximadamente 5000 nt.

[0070] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN comprende nucleótidos naturales. En algunas formas de realización, la secuencia de expresión está optimizada con codones. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN comprende además un casete de terminación de la traducción que comprende al menos un codón de parada en cada marco de lectura. En algunas formas de realización, el casete de terminación de la traducción comprende al menos dos codones de parada en el marco de lectura de la secuencia de expresión. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN se optimiza para que carezca de al menos un sitio de unión de microARN presente en un polinucleótido preoptimizado equivalente. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN se optimiza para que carezca de al menos un sitio susceptible a endonucleasa presente en un polinucleótido preoptimizado equivalente. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN se optimiza para que carezca de al menos un sitio susceptible de edición de ARN presente en un polinucleótido preoptimizado equivalente.

[0071] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN comprende al menos 2 secuencias de expresión. En algunas formas de realización, cada secuencia de expresión codifica una proteína terapéutica diferente.

[0072] En algunas formas de realización, un polinucleótido de ARN circular divulgado en el presente documento tiene una longitud de aproximadamente 100 a 15.000 nucleótidos, opcionalmente aproximadamente de 100 a 12.000 nucleótidos, además opcionalmente aproximadamente 100 a 10.000 nucleótidos de longitud.

[0073] En algunas formas de realización, un polinucleótido de ARN circular divulgado en el presente documento tiene una duración *in vivo* del efecto terapéutico en humanos de al menos aproximadamente 20 horas. En algunas formas de realización, un polinucleótido de ARN circular divulgado en el presente documento tiene una vida media funcional de al menos aproximadamente 20 horas. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular tiene una duración del efecto terapéutico en una célula humana mayor o igual a la de un polinucleótido de ARN lineal equivalente que comprende la misma secuencia de expresión. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular tiene una vida media funcional en una célula humana mayor o igual a la de un polinucleótido de ARN lineal equivalente que comprende la misma secuencia de expresión. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular tiene una duración *in vivo* del efecto terapéutico en humanos mayor que la de un polinucleótido de ARN lineal equivalente que tiene la misma secuencia de expresión. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular tiene una vida media funcional *in vivo* en humanos mayor que la de un polinucleótido de ARN lineal equivalente que tiene la misma secuencia de expresión.

[0074] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un polinucleótido de ARN circular divulgado en el presente documento, una nanopartícula y, opcionalmente, un resto de direccionamiento conectado operativamente a la nanopartícula. En algunas formas de realización, la nanopartícula es una nanopartícula lipídica, una nanopartícula de núcleo-cubierta, una nanopartícula biodegradable, una nanopartícula lipídica biodegradable, una nanopartícula polimérica o una nanopartícula polimérica biodegradable. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un resto de direccionamiento, en el que el resto de direccionamiento media la endocitosis mediada por receptor o fusión directa selectivamente en células de una población celular o tejido seleccionado en ausencia de aislamiento o purificación celular. En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento es un scfv, nanocuerpo, péptido, minicuerpo, aptámero de polinucleótido, región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera o fragmento de la misma. En algunas formas de realización, menos del 1 %, en peso, de los polinucleótidos en la composición son ARN bicatenario, férulas de ADN o ARN trifosforilado. En algunas formas de realización, menos del 1 %, en peso, de los polinucleótidos y proteínas en la composición farmacéutica son ARN bicatenario, férulas de ADN, ARN trifosforilado, proteínas fosfatasa, proteínas ligasas y enzimas de protección.

[0075] En otro aspecto, la presente invención se usa en un método para tratar a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el polinucleótido de ARN circular descrito en el presente documento, una nanopartícula y, opcionalmente, un resto de dirección conectado operativamente a la nanopartícula.

[0076] En otro aspecto, la presente invención se usa en un método para tratar a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento es un scfv, nanocuerpo, péptido, minicuerpo, región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera, un dominio extracelular de un TCR o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, la nanopartícula es una nanopartícula lipídica, una nanopartícula de núcleo-cubierta o una nanopartícula biodegradable. En algunas formas de realización, la nanopartícula comprende uno o más lípidos catiónicos, lípidos ionizables o ésteres de poliβ-amino. En algunas formas de realización, la nanopartícula comprende uno o más lípidos no catiónicos. En algunas formas de realización, la nanopartícula comprende uno o más lípidos modificados con PEG, lípidos de ácido poliglutámico o lípidos de ácido hialurónico. En algunas formas de realización, la nanopartícula comprende colesterol. En algunas formas de realización, la nanopartícula comprende ácido araquidónico o ácido oleico.

[0077] En algunas formas de realización, una composición farmacéutica proporcionada comprende un resto de direccionamiento, en el que el resto de direccionamiento media la endocitosis mediada por receptor selectivamente en células de una población celular seleccionada en ausencia de selección o purificación celular.

[0078] En algunas formas de realización, una nanopartícula proporcionada comprende más de un polinucleótido de ARN circular.

[0079] En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un vector de ADN que codifica el polinucleótido de ARN divulgado en el presente documento. En algunas formas de realización, el vector de ADN comprende además una secuencia reguladora de la transcripción. En algunas formas de realización, la secuencia reguladora de la transcripción comprende un promotor y/o un potenciador. En algunas formas de realización, el promotor comprende un promotor T7. En algunas formas de realización, el vector de ADN comprende un ADN circular. En algunas formas de realización, el vector de ADN comprende un ADN lineal.

[0080] En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una célula procariótica que comprende el vector de ADN divulgado en el presente documento.

[0081] En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una célula eucariota que comprende el polinucleótido de ARN circular descrito en el presente documento. En algunas formas de realización, la célula eucariota es una célula humana.

[0082] En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método para producir un polinucleótido de ARN circular, comprendiendo el método incubar el polinucleótido de ARN lineal descrito en el presente documento en condiciones adecuadas para la circularización. En algunas formas de realización, el método comprende incubar el ADN divulgado en el presente documento en condiciones adecuadas para la transcripción. En algunas formas de realización, el ADN se transcribe *in vitro*. En algunas formas de realización, las condiciones adecuadas comprenden trifosfato de adenosina (ATP), trifosfato de guanina (GTP), trifosfato de citosina (CTP), trifosfato de uridina (UTP) y una ARN polimerasa. En algunas formas de realización, las condiciones adecuadas comprenden además monofosfato de guanina (GMP). En algunas formas de realización, la relación entre la concentración de GMP y la concentración de GTP está dentro del rango de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 15:1, opcionalmente aproximadamente 4:1, 5:1 o 6:1.

[0083] En otro aspecto, la presente solicitud proporciona un método para producir un polinucleótido de ARN circular, comprendiendo el método cultivar la célula procariótica descrita en el presente documento en condiciones adecuadas para transcribir el ADN en la célula. En algunas formas de realización, el método comprende además purificar un polinucleótido de ARN circular. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular se purifica mediante selección negativa usando un oligonucleótido de afinidad que se hibrida con el primer o segundo espaciador conjugado a una superficie sólida. En algunas formas de realización, el primer o segundo espaciador comprende una secuencia poliA, y en donde el oligonucleótido de afinidad es un oligonucleótido de desoxitimina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0084]

La Figura 1 representa la luminiscencia en sobrenadantes de células HEK293 (Figuras 1A, 1D y 1E), HepG2 (Figura 1B) o 1C1C7 (Figura 1C) 24 horas después de la transfección con ARN circular que comprende una secuencia de expresión de luciferasa *Gaussia* y varias secuencias IRES.

La Figura 2 representa la luminiscencia en sobrenadantes de células HEK293 (Figura 2A), HepG2 (Figura 2B) o 1C1C7 (Figura 2C) 24 horas después de la transfección con ARN circular que comprende una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y varias secuencias IRES que tienen diferentes longitudes.

La Figura 3 representa la estabilidad de construcciones IRES seleccionadas en células HepG2 (Figura 3A) o 1C1C7 (Figura 3B) durante 3 días, tal como se ha medido por luminiscencia.

Las Figuras 4A y 4B representan la expresión de proteínas de construcciones IRES seleccionadas en células Jurkat, medida por luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en sobrenadantes de células.

Las Figuras 5A y 5B representan la estabilidad de construcciones IRES seleccionadas en células Jurkat durante 3 días, medida por luminiscencia.

La Figura 6 representa comparaciones de luminiscencia de 24 horas (Figura 6A) o luminiscencia relativa durante 3 días (Figura 6B) de ARN lineal modificado, circular no purificado o circular purificado que codifica la luciferasa de *Gaussia*.

La Figura 7 representa la inducción de la transcripción de IFN γ (Figura 7A), IL-6 (Figura 7B), IL-2 (Figura 7C), RIG-I (Figura 7D), IFN- β 1 (Figura 7E) y TNF α (Figura 7F) después de la electroporación de células Jurkat con ARN lineal modificado, circular no purificado o circular purificado.

La Figura 8 representa una comparación de la luminiscencia de ARN circular y ARN lineal modificado que codifica *Gaussia* luciferasa en monocitos primarios humanos (Figura 8A) y macrófagos (Figura 8B y Figura 8C).

La Figura 9 representa la luminiscencia relativa durante 3 días (Figura 9A) en el sobrenadante de células T primarias después de la transducción con ARN circular que comprende una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y secuencias IRES variables o luminiscencia de 24 horas (Figura 9B).

La Figura 10 representa luminiscencia de 24 horas en sobrenadante de células T primarias (Figura 10A) después de la transducción con ARN circular o ARN lineal modificado que comprende una secuencia de expresión de *Gaussia* luciferasa, o luminiscencia relativa durante 3 días (Figura 10B), y luminiscencia de 24 horas en PBMC (Figura 10C).

La Figura 11 representa cromatogramas de HPLC (Figura 11A) y eficiencias de circularización (Figura 11B) de construcciones de ARN que tienen diferentes sitios de permutación.

La Figura 12 representa cromatogramas de HPLC (Figura 12A) y eficiencias de circularización (Figura 12B) de construcciones de ARN que tienen diferentes intrones y/o sitios de permutación.

La Figura 13 representa cromatogramas de HPLC (Figura 13A) y eficiencias de circularización (Figura 13B) de 3 construcciones de ARN con o sin brazos de homología.

La Figura 14 representa eficiencias de circularización de 3 construcciones de ARN sin brazos de homología o con brazos de homología que tienen diversas longitudes y contenido de GC.

Las Figuras 15A y 15B representan cromatogramas de HPLC que muestran la contribución de fuertes brazos de homología a una eficiencia de empalme mejorada, la relación entre la eficiencia de circularización y melladuras en construcciones seleccionadas, y combinaciones de sitios de permutaciones y brazos de homología que se

supone que demuestran una eficiencia de circularización mejorada.

La Figura 16 muestra imágenes fluorescentes de células T simuladas electroporadas (izquierda) o electroporadas con ARN circular que codifica un CAR (derecha) y cocultivadas con células Raji que expresan GFP y luciferasa de luciérnaga.

La Figura 17 muestra imágenes de campo brillante (izquierda), fluorescentes (centro) y superpuestas (derecha) de células T simuladas electroporadas (arriba) o electroporadas con ARN circular que codifica un CAR (abajo) y cocultivadas con células Raji que expresan GFP y luciferasa de luciérnaga.

La Figura 18 representa la lisis específica de células diana Raji mediante células T sometidas a electroporación simulada o electroporadas con ARN circular que codifica diferentes secuencias CAR.

La Figura 19 representa la luminiscencia en sobrenadantes de células Jurkat (izquierda) o células T CD3+ humanas primarias en reposo (derecha) 24 horas después de la transducción con ARN lineal o circular que comprende una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y secuencias IRES variables (Figura 19A), y luminiscencia relativa sobre 3 días (Figura 19B).

La Figura 20 representa la inducción de la transcripción de IFN- β 1 (Fig. 20A), RIG-I (Fig. 20B), IL-2 (Fig. 20C), IL-6 (Fig. 20D), IFN γ (Fig. 20E) y TNF α (Fig. 20F) después de la electroporación de células T CD3+ humanas con ARN lineal modificado, circular no purificado o circular purificado.

La Figura 21 representa la lisis específica de células diana Raji por células T CD3+ primarias humanas electroporadas con ARN circular que codifica un CAR según se determina mediante la detección de luminiscencia de luciérnaga (Figura 21A) y la inducción del transcrito de IFN γ 24 horas después de la electroporación con diferentes cantidades de ARN circular o lineal. codifica una secuencia CAR (Figura 21B).

La Figura 22 representa la lisis específica de células diana o no diana mediante células T CD3+ primarias humanas electroporadas con ARN circular o lineal que codifica un CAR en diferentes proporciones E:T (Figura 22A y Figura 22B) según se determina mediante la detección de luminiscencia de luciérnaga.

La Figura 23 representa la lisis específica de células diana mediante células T CD3+ humanas electroporadas con ARN que codifica un CAR 1, 3, 5 y 7 días después de la electroporación.

La Figura 24 representa la lisis específica de células diana mediante células T CD3+ humanas electroporadas con ARN circular que codifica un CAR dirigido a CD19 o BCMA.

La Figura 25 representa el flujo total de órganos extraídos de ratones CD-1 dosificados con ARN circular que codifica FLuc y formulados con 50 % de lípido 15 (Tabla 10b), 10 % de DSPC, 1,5 % de PEG-DMG y 38,5 % de colesterol.

La Figura 26 muestra imágenes que resaltan la luminiscencia de órganos extraídos de ratones CD-1 dosificados con ARN circular que codifica FLuc y formulados con 50 % de lípido 15 (Tabla 10b), 10 % de DSPC, 1,5 % de PEG-DMG y 38,5 % de colesterol.

La Figura 27 representa la caracterización molecular de los Lípidos 26 y 27 de la Tabla 10a. **La Figura 27A** muestra el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón del Lípido 26. **La Figura 27B** muestra el tiempo de retención del Lípido 26 medido mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). **La Figura 27C** muestra el espectro de masas del Lípido 26. **La Figura 27D** muestra el espectro de RMN de protones del Lípido 27. **La Figura 27E** muestra el tiempo de retención del Lípido 27 medido por LC-MS. **La Figura 27F** muestra el espectro de masas del Lípido 27.

La Figura 28 representa la caracterización molecular del lípido 22-S14 y sus intermedios sintéticos. **La Figura 28A** representa el espectro de RMN de 2-(tetradecil)etan-1-ol. **La Figura 28B** representa el espectro de RMN del acrilato de 2-(tetradecil)etil. **La Figura 28C** representa el espectro de RMN de 3,3'-((3-(2-metil-1H-imidazol-1-il)propil)azanediil)dipropionato de bis(2-(tetradecil)etil) (lípido 22-S14).

La Figura 29 representa el espectro de RMN de 3,3'-((3-(1H-imidazol-1-il)propil)azanediil)dipropionato de bis(2-(tetradecil)etil) (Lípido 93-S14).

La Figura 30 representa la caracterización molecular de 8-((3-(2-metil-1H-imidazol-1-il)propil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoato de heptadecan-9-ilo (lípido 54 de Tabla 10a). **La Figura 30A** muestra el espectro de RMN de protones del Lípido 54. **La Figura 30B** muestra el tiempo de retención del Lípido 54 medido por LC-MS. **La Figura 30C** muestra el espectro de masas del Lípido 54.

La Figura 31 representa la caracterización molecular del 8-((3-(1H-imidazol-1-il)propil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoato de heptadecan-9-ilo (lípido 53 de la Tabla 10a). **La Figura 31A** muestra el espectro de RMN de protones del Lípido 53. **La Figura 31B** muestra el tiempo de retención del Lípido 53 medido por LC-MS. **La Figura 31C** muestra el espectro de masas del Lípido 53.

La Figura 32A representa el flujo total de bazo e hígado recolectados de ratones CD-1 dosificados con ARN circular que codifica luciferasa de luciérnaga (FLuc) y formulados con lípido de interés ionizable, DSPC, colesterol y DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en una relación en peso de 16:1:4:1 o 62:4:33:1 relación molar. **La Figura 32B** representa la radiancia promedio para la biodistribución de la expresión de proteínas.

La Figura 33A representa imágenes que resaltan la luminiscencia de órganos extraídos de ratones CD-1 dosificados con ARN circular que codifica FLuc y formulados con lípido ionizable 22-S14, DSPC, colesterol y DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en una proporción en peso. de relación molar 16:1:4:1 o 62:4:33:1. **La Figura 33B** representa imágenes IVIS de cuerpo entero de ratones CD-1 dosificados con ARN circular que codifica FLuc y formulados con Lípido ionizable 22-S14, DSPC, colesterol y DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en una proporción en peso de relación molar 16:1:4:1 o 62:4:33:1.

La Figura 34A representa imágenes que resaltan la luminiscencia de órganos extraídos de ratones CD-1 dosificados con ARN circular que codifica FLuc y formulados con lípido ionizable 93-S14, DSPC, colesterol y DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en una proporción en peso. de relación molar 16:1:4:1 o 62:4:33:1. **La**

Figura 34B representa imágenes IVIS de cuerpo entero de ratones CD-1 dosificados con ARN circular que codifica FLuc y formulados con Lípido ionizable 93-S14, DSPC, colesterol y DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en una proporción en peso de relación molar 16:1:4:1 o 62:4:33:1.

La Figura 35A representa imágenes que resaltan la luminiscencia de órganos extraídos de ratones CD-1 dosificados con ARN circular que codifica FLuc y formulados con Lípido 26 ionizable de la Tabla 10a, DSPC, colesterol y DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en un peso relación molar de 16:1:4:1 o 62:4:33:1. **La Figura 35B** representa imágenes IVIS de cuerpo entero de ratones CD-1 dosificados con ARN circular que codifica FLuc y formulados con Lípido 26 ionizable, DSPC, colesterol y DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en una proporción en peso de 16:1: Relación molar 4:1 o 62:4:33:1.

La Figura 36 representa imágenes que resaltan la luminiscencia de órganos extraídos de ratones c57BL/6J dosificados con ARN circular que codifica FLuc y encapsulados en nanopartículas lipídicas formadas con Lípido 15 de la Tabla 10b (**Figura 36A**), Lípido 53 de la Tabla 10a (**Figura 36B**) o Lípido 54 de la Tabla 10a (**Figura 36C**). Se usó PBS como control (**Figura 36D**).

Las Figuras 37A y 37B representan la luminiscencia relativa en los lisados de PBMC humanas después de una incubación de 24 horas con nanopartículas lipídicas de prueba que contienen ARN circular que codifica la luciferasa de luciémaga.

La Figura 38 muestra la expresión de GFP (**Figura 37A**) y CD19 CAR (**Figura 37B**) en PBMC humanas después de incubarlas con nanopartículas lipídicas de prueba que contienen ARN circular que codifica GFP o CD19 CAR.

La Figura 39 representa la expresión de un CAR CD19 anti-murino en células 1C1C7 lipotransfectadas con ARN circular que comprende una secuencia de expresión de CAR CD19 anti-murino y secuencias IRES variables.

La Figura 40 muestra la citotoxicidad de un CAR anti-CD19 murino para células T murinas. El CD19 CAR está codificado y expresado a partir de un ARN circular, que se electropora en las células T murinas.

La Figura 41 representa los recuentos de células B en sangre periférica (**Figuras 40A y 40B**) o bazo (**Figura 40C**) en ratones C57BL/6J a los que se les inyectaron cada dos días nanopartículas lipídicas de prueba que encapsulan un ARN circular que codifica un CAR CD19 anti-murino.

Las Figuras 42A y 42B comparan el nivel de expresión de un CAR anti-CD19 humano expresado a partir de un ARN circular con el expresado a partir de un ARNm lineal.

Las Figuras 43A y 43B comparan el efecto citotóxico de un CAR anti-CD19 humano expresado a partir de un ARN circular con el expresado a partir de un ARNm lineal.

La Figura 44 representa la citotoxicidad de dos CAR (CAR CD19 antihumano y CAR BCMA antihumano) expresados a partir de un único ARN circular en células T.

La Figura 45A muestra gráficos FACS representativos con frecuencias de expresión de tdTomato en diversos subconjuntos de células inmunes de bazo después del tratamiento con NPL formados con el lípido 27 o 26 de la tabla 10a o el lípido 15 de la tabla 10b. **La Figura 45B** muestra la cuantificación de la proporción de células mieloides, células B y células T que expresan tdTomato (media + desv. estándar, n = 3), equivalente a la proporción de cada población de células transfectadas con éxito con ARN circular Cre. **La Figura 45C** ilustra la proporción de poblaciones de células inmunitarias esplénicas adicionales, incluidas células NK, monocitos clásicos, monocitos no clásicos, neutrófilos y células dendríticas, que expresan tdTomato después del tratamiento con lípidos 27 y 26 (media + desviación estándar, n = 3).

La Figura 46A representa un diseño de construcción de ARN ejemplar con secuencias poliA incorporadas en los intrones. **La Figura 46B** muestra el rastro cromatográfico de ARN circular no purificado. **La Figura 46C** muestra el rastro cromatográfico de ARN circular purificado por afinidad. La Figura 46D muestra la inmunogenicidad de los ARN circulares preparados con diferentes condiciones IVT y métodos de purificación. (Comercial = mezcla IVT comercial; Personalizado = mezcla IVT personalizada; Aff = purificación por afinidad; Enz = purificación enzimática; relación GMP:GTP = 8, 12,5 o 13,75).

La Figura 47A representa un diseño de construcción de ARN ejemplar con una secuencia de unión dedicada como alternativa a poliA para la purificación por hibridación. **La Figura 47B** muestra el rastro cromatográfico de ARN circular no purificado. **La Figura 46C** muestra el rastro cromatográfico de ARN circular purificado por afinidad.

La Figura 48A muestra el rastro cromatográfico de ARN circular no purificado que codifica distrofina. **La Figura 48B** muestra el rastro cromatográfico del ARN circular purificado con enzima que codifica la distrofina.

La Figura 49 compara la expresión (**Figura 49A**) y la estabilidad (**Figura 49B**) de ARNcirc purificados con diferentes espaciadores 5' entre el fragmento de intrón 3'/región dúplex interna 5' y el IRES en células Jurkat. (AC = solo se usaron A y C en la secuencia espaciadora; UC = solo se usaron U y C en la secuencia espaciadora).

La Figura 50 muestra los niveles de expresión de luminiscencia y la estabilidad de la expresión en células T primarias a partir de ARN circulares que contienen los elementos IRES originales o modificados indicados.

La Figura 51 muestra los niveles de expresión de luminiscencia y la estabilidad de la expresión en células HepG2 a partir de ARN circulares que contienen los elementos IRES originales o modificados indicados.

La Figura 52 muestra los niveles de expresión de luminiscencia y la estabilidad de la expresión en células 1C1C7 a partir de ARN circulares que contienen los elementos IRES originales o modificados indicados.

La Figura 53 muestra los niveles de expresión de luminiscencia y la estabilidad de la expresión en células HepG2 a partir de ARN circulares que contienen elementos IRES con regiones no traducidas (UTR) insertadas o elementos IRES híbridos. "Scr" significa Scrambled, que se utilizó como control.

La Figura 54 muestra los niveles de expresión de luminiscencia y la estabilidad de la expresión en células 1C1C7 a partir de ARN circulares que contienen un IRES y casetes de codones de parada variables unidos operativamente a una secuencia codificante de luciferasa de *Gaussia*.

La Figura 55 muestra los niveles de expresión de luminiscencia y la estabilidad de la expresión en células 1C1C7 de ARN circulares que contienen un IRES y regiones variables no traducidas (UTR) insertadas antes del codón de inicio de una secuencia codificante de luciferasa *Gaussiana*.

La Figura 56 muestra niveles de expresión de eritropoyetina humana (hEPO) en células Huh7 a partir de ARN circulares que contienen dos sitios diana miR-122 aguas abajo de la secuencia codificante de hEPO.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0085] En este documento se proporcionan composiciones farmacéuticas y vehículos de transferencia, por ejemplo, nanopartículas lipídicas, que comprenden ARN circular. El ARN circular proporcionado en el presente documento puede administrarse y/o dirigirse a una célula en un vehículo de transferencia, por ejemplo, una nanopartícula o una composición que comprende un vehículo de transferencia. En algunas formas de realización, el ARN circular también se puede administrar a un sujeto en un vehículo de transferencia o una composición que comprende un vehículo de transferencia. En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia es una nanopartícula. En algunas formas de realización, la nanopartícula es una nanopartícula lipídica, una nanopartícula polimérica de núcleo-cubierta o una nanopartícula biodegradable. En algunas formas de realización, la nanopartícula es una nanopartícula lipídica. En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia comprende uno o más lípidos ionizables, lípidos modificados con PEG, lípidos auxiliares y/o lípidos estructurales.

[0086] En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia encapsula ARN circular y comprende un lípido ionizable, un lípido estructural y un lípido modificado con PEG. En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia encapsula ARN circular y comprende un lípido ionizable, un lípido estructural, un lípido modificado con PEG y un lípido auxiliar.

[0087] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia comprende un lípido ionizable descrito en el presente documento. En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia comprende un lípido ionizable que se muestra en cualquiera de las Tablas 1-10, 10a, 10b, 11-15 y 15b. En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia comprende un lípido ionizable que se muestra en la Tabla 10a.

[0088] En algunas formas de realización, el ARN en un vehículo de transferencia es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más ARN circular. En algunas formas de realización, menos del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o 70 % de cargado El ARN está sobre o asociado con una superficie exterior del vehículo de transferencia.

[0089] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia es capaz de unirse a APOE. En algunas formas de realización, la superficie del vehículo de transferencia comprende sitios de unión de APOE. En algunas formas de realización, la superficie del vehículo de transferencia es sustancialmente libre de sitios de unión APOE. En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia interactúa menos con APOE que un vehículo de transferencia equivalente cargado con ARN lineal. En algunas formas de realización, la interacción APOE se puede medir comparando la absorción de nanopartículas en células en suero empobrecido en APO o suero complementario de APO.

[0090] Sin desear limitarse a ninguna teoría, se contempla que los vehículos de transferencia que comprenden sitios de unión de APOE suministran ARN circulares de manera más eficiente al hígado. Por consiguiente, en algunas formas de realización, el vehículo de transferencia que comprende los lípidos ionizables descritos en el presente documento y cargado con ARN circular comprende sustancialmente sitios de unión APOE en la superficie del vehículo de transferencia, entregando así el ARN circular al hígado con una mayor eficiencia en comparación con un vehículo de transferencia que carece sustancialmente de sitios de unión de APOE en la superficie. En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia que comprende los lípidos ionizables descritos en el presente documento y cargado con ARN circular carece sustancialmente de sitios de unión de APOE en la superficie del vehículo de transferencia, por lo que entrega el ARN circular al hígado con una eficiencia menor en comparación con un vehículo de transferencia que comprende sitios de unión de APOE en la superficie.

[0091] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia administra, o es capaz de administrar, ARN circular al bazo. En algunas formas de realización, un ARN circular codifica una proteína terapéutica. En algunas formas de realización, al menos aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de la proteína terapéutica total expresada en el sujeto se expresa en el bazo. En algunas formas de realización, se expresa más proteína terapéutica en el bazo que en el hígado (por ejemplo, 2x, 3x, 4x o 5x más). En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica tiene una relación lípido ionizable:fosfato de 3-7. En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica tiene una relación lípido ionizable:fosfato de 4-6. En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica tiene una relación lípido ionizable:fosfato de 4,5. En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica tiene una relación nitrógeno:fosfato (N:P) de 3-6. En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica tiene una relación N:P de 5-6. En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica tiene una relación N:P de 5,7. En algunas formas de realización, la expresión de una proteína no secretada se puede medir usando un ELISA, normalizándose al peso del tejido.

[0092] Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que los vehículos de transferencia descritos en el presente documento protegen el ARN circular encapsulado de la degradación y proporcionan una administración eficaz de ARN circular a las células diana *in vivo* e *in vitro*.

5 **[0093]** Las formas de realización de la presente divulgación proporcionan composiciones lipídicas descritas según las respectivas relaciones molares de los lípidos componentes en la formulación. En una forma de realización, el % en moles del lípido ionizable puede ser de aproximadamente 10 % en moles a aproximadamente 80 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido ionizable puede ser de aproximadamente 20 % en moles a aproximadamente 70 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido ionizable puede ser de aproximadamente 30 % en moles a aproximadamente 60 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido ionizable puede ser de aproximadamente 35 % en moles a aproximadamente 55 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido ionizable puede ser de aproximadamente 40 % en moles a aproximadamente 50 % en moles. En algunas formas de realización, el % molar de lípidos ionizables del lote de vehículo de transferencia será ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 15 %, ± 10 %, ± 5 % o $\pm 2,5$ % del % molar objetivo. En determinadas formas de realización, la variabilidad entre lotes de vehículos de transferencia será inferior al 15 %, inferior al 10 % o inferior al 5 %.

10 **[0094]** En una forma de realización, el % en moles del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 1 % en moles a aproximadamente 50 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 2 % en moles a aproximadamente 45 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 3 % en moles a aproximadamente 40 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 4 % en moles a aproximadamente 35 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 5 % en moles a aproximadamente 30 % en moles. En una forma de realización, el % molar del lípido auxiliar puede ser de aproximadamente 10 % molar a aproximadamente 20 % molar. En algunas formas de realización, el % molar de lípido auxiliar del lote de vehículo de transferencia será ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 15 %, ± 10 %, ± 5 % o $\pm 2,5$ % del % molar objetivo.

20 **[0095]** En una forma de realización, el % en moles del lípido estructural puede ser de aproximadamente 10 % en moles a aproximadamente 80 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido estructural puede ser de aproximadamente 20 % en moles a aproximadamente 70 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido estructural puede ser de aproximadamente 30 % en moles a aproximadamente 60 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido estructural puede ser de aproximadamente 35 % en moles a aproximadamente 55 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido estructural puede ser de aproximadamente 40 % en moles a aproximadamente 50 % en moles. En algunas formas de realización, el % molar de lípidos estructurales del lote de vehículo de transferencia será ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 15 %, ± 10 %, ± 5 % o $\pm 2,5$ % del % molar objetivo.

30 **[0096]** En una forma de realización, el % en moles del lípido modificado con PEG puede ser de aproximadamente 0,1 % en moles a aproximadamente 10 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido modificado con PEG puede ser de aproximadamente 0,2 % en moles a aproximadamente 5 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido modificado con PEG puede ser de aproximadamente 0,5 % en moles a aproximadamente 3 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido modificado con PEG puede ser de aproximadamente 1 % en moles a aproximadamente 2 % en moles. En una forma de realización, el % en moles del lípido modificado con PEG puede ser de aproximadamente 1,5 % en moles. En algunas formas de realización, el % molar de lípido modificado con PEG del lote de vehículo de transferencia será ± 30 %, ± 25 %, ± 20 %, ± 15 %, ± 10 %, ± 5 % o $\pm 2,5$ % del % molar objetivo.

40 **[0097]** También se contemplan composiciones farmacéuticas, y en particular vehículos de transferencia, que comprenden uno o más de los compuestos descritos en el presente documento. En determinadas formas de realización, dichos vehículos de transferencia comprenden uno o más de lípidos modificados con PEG, un lípido ionizable, un lípido auxiliar y/o un lípido estructural descrito en el presente documento. También se contemplan vehículos de transferencia que comprenden uno o más de los compuestos descritos en el presente documento y que además comprenden uno o más lípidos adicionales. En determinadas formas de realización, dichos vehículos de transferencia se cargan con ARN circular o lo encapsulan de otro modo.

50 **[0098]** Los vehículos de transferencia de la invención encapsulan ARN circular. En determinadas formas de realización, los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales de la invención incluyen ARN que codifica una proteína o enzima (por ejemplo, ARN_{circ} que codifica, por ejemplo, fenilalanina hidroxilasa (HAP)). La presente invención contempla el uso de tales polinucleótidos como un producto terapéutico que es capaz de ser expresado por células diana para facilitar de ese modo la producción (y en ciertos casos, la excreción) de una enzima o proteína funcional como se describe en dichas células diana, por ejemplo, en Solicitud Internacional N° PCT/US2010/058457 y en la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 61/494,881, presentada el 8 de junio de 2011, cuyas enseñanzas se incorporan en este documento como referencia en su totalidad. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, tras la expresión de uno o más polinucleótidos por células diana, la producción de una enzima o proteína funcional en la que un sujeto es deficiente (por ejemplo, una enzima del ciclo de la urea o una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosomal) puede ser observado. Como otro ejemplo, el ARN circular encapsulado por un vehículo de transferencia puede codificar una o ambas cadenas polipeptídicas de una proteína receptora de células T o codificar un receptor de antígeno quimérico (CAR).

[0099] La composición se puede usar en un método para tratar una enfermedad en un sujeto administrando al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende ARN circular que codifica una proteína funcional y un vehículo de transferencia descrito en el presente documento. En algunas formas de realización, el ARN circular está encapsulado dentro del vehículo de transferencia. En determinadas formas de realización, dichos métodos pueden mejorar (por ejemplo, aumentar) la expresión de un polinucleótido y/o aumentar la producción y secreción de un producto polipeptídico funcional en una o más células y tejidos diana (por ejemplo, células inmunitarias o hepatocitos). Generalmente, dichos métodos comprenden poner en contacto las células diana con uno o más compuestos y/o vehículos de transferencia que comprenden o encapsulan de otro modo el ARNcirc.

[0100] En determinadas formas de realización, los vehículos de transferencia (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) se formulan basándose en parte en su capacidad para facilitar la transfección (por ejemplo, de un ARN circular) de una célula diana. En otra forma de realización, los vehículos de transferencia (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) pueden seleccionarse y/o prepararse para optimizar la entrega de ARN circular a una célula, tejido u órgano diana. Por ejemplo, si la célula diana es un hepatocito, o si el órgano diana es el bazo, las propiedades de las composiciones farmacéuticas y/o liposomales (por ejemplo, tamaño, carga y/o pH) pueden optimizarse para administrar eficazmente dicha composición (ej., nanopartículas lipídicas) a la célula u órgano diana, reducen el aclaramiento inmunológico y/o promueven la retención en la célula u órgano diana. Alternativamente, si el tejido diana es el sistema nervioso central, la selección y preparación del vehículo de transferencia debe considerar la penetración y retención dentro de la barrera hematoencefálica y/o el uso de medios alternativos para administrar directamente tales composiciones (por ejemplo, lípidos). nanopartículas) a dicho tejido diana (por ejemplo, mediante administración intracerebrovascular). En determinadas formas de realización, los vehículos de transferencia se pueden combinar con agentes que facilitan la transferencia de materiales encapsulados a través de la barrera hematoencefálica (por ejemplo, agentes que alteran o mejoran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y, por tanto, mejoran la transferencia de ARN circular a las células diana). Si bien los vehículos de transferencia descritos en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) pueden facilitar la introducción de ARNcirc en las células diana, la adición de policationes (por ejemplo, poli L-lisina y protamina) a, por ejemplo, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas en forma de copolímero también pueden facilitar, y en algunos casos mejorar notablemente, la eficacia de transfección de varios tipos de vehículos de transferencia entre 2 y 28 veces en varias líneas celulares tanto in vitro como in vivo (Ver, N. J. Caplen, et al., Gene Ther. 1995; 2: 603; S. Li, et al., Gene Ther. 1997; 4, 891). En algunas formas de realización, una célula diana es una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, una célula diana es una célula T.

[0101] En ciertas formas de realización, los vehículos de transferencia descritos en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) se preparan combinando múltiples componentes lipídicos (por ejemplo, uno o más de los compuestos descritos en el presente documento) con uno o más componentes poliméricos. Por ejemplo, se puede preparar una nanopartícula lipídica usando HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000. Una nanopartícula lipídica puede estar compuesta por combinaciones de lípidos adicionales en diversas proporciones, que incluyen, por ejemplo, HGT4001, DOPE y DMG-PEG2000. La selección de lípidos ionizables, lípidos auxiliares, lípidos estructurales y/o lípidos modificados con PEG que comprenden las nanopartículas lipídicas, así como la relación molar relativa de dichos lípidos entre sí, se basa en las características de los lípidos seleccionados), la naturaleza de las células o tejidos diana previstos y las características de los materiales o polinucleótidos que entregará la nanopartícula lipídica. Consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena alquílica, así como el tamaño, la carga, el pH, el pKa, la fusogenicidad y la toxicidad de los lípidos seleccionados.

[0102] Los vehículos de transferencia descritos en el presente documento pueden permitir que el polinucleótido encapsulado llegue a la célula diana o pueden permitir preferentemente que el polinucleótido encapsulado alcance las células u órganos diana de forma discriminatoria (por ejemplo, los vehículos de transferencia pueden concentrarse en el hígado o el bazo de un sujeto al cual se administran dichos vehículos de transferencia). Alternativamente, los vehículos de transferencia pueden limitar el suministro de polinucleótidos encapsulados a otras células u órganos no diana donde la presencia de los polinucleótidos encapsulados puede ser indeseable o de utilidad limitada.

[0103] Cargar o encapsular un polinucleótido, por ejemplo, ARNcirc, en un vehículo de transferencia puede servir para proteger el polinucleótido de un entorno (por ejemplo, suero) que puede contener enzimas o productos químicos que degradan dichos polinucleótidos y/o sistemas o receptores que causan la excreción rápida de tales polinucleótidos. Por consiguiente, en algunas formas de realización, las composiciones descritas en el presente documento son capaces de mejorar la estabilidad de los polinucleótidos encapsulados, particularmente con respecto a los entornos a los que dichos polinucleótidos estarán expuestos.

[0104] En determinadas formas de realización, en el presente documento se proporciona un vector para producir ARN circular, comprendiendo el vector una región formadora de dúplex 5', un fragmento de intrón del grupo I en 3', opcionalmente un primer espaciador, un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), una secuencia de expresión, opcionalmente un segundo espaciador, un fragmento de intrón del grupo I en 5' y una región formadora de dúplex en 3'. En algunas formas de realización, estos elementos se colocan en el vector en el orden anterior. En algunas formas de realización, el vector comprende además una región interna que forma el dúplex 5' entre el fragmento de intrón del grupo I en 3' y el IRES y una región interna que forma el dúplex 3' entre la secuencia de expresión y el fragmento del intrón del grupo I en 5'. En algunas formas de realización, las regiones internas que forman el dúplex son capaces de formar un

dúplex entre sí pero no con las regiones externas que forman el dúplex. En algunas formas de realización, las regiones internas que forman el dúplex son parte del primer y segundo espaciadores. Formas de realización adicionales incluyen polinucleótidos de ARN circular, incluidos polinucleótidos de ARN circular elaborados usando los vectores proporcionados en el presente documento, composiciones que comprenden dicho ARN circular, células que comprenden dicho ARN circular, métodos de uso y elaboración de dichos vectores, ARN circular, composiciones y células.

[0105] En algunas formas de realización, en el presente documento se proporcionan métodos que comprenden la administración de polinucleótidos de ARN circular proporcionados en el presente documento en células para terapia o producción de proteínas útiles, tales como HAP. En algunas formas de realización, el método es ventajoso al proporcionar la producción de un polipéptido deseado dentro de células eucariotas con una vida media más larga que el ARN lineal, debido a la resistencia del ARN circular a las ribonucleasas.

[0106] Los polinucleótidos de ARN circular carecen de los extremos libres necesarios para la degradación mediada por exonucleasa, lo que hace que sean resistentes a varios mecanismos de degradación del ARN y otorgan vidas medias extendidas en comparación con un ARN lineal equivalente. La circularización puede permitir la estabilización de polinucleótidos de ARN que generalmente tienen vidas medias cortas y puede mejorar la eficacia general del ARNm exógeno en una variedad de aplicaciones. En una forma de realización, la vida media de los polinucleótidos de ARN circular proporcionados en el presente documento en células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero, tales como células humanas) es de al menos 20 horas (por ejemplo, al menos 80 horas).

1. Definiciones

[0107] Como se usa en el presente documento, los términos "ARNcirc" o "polirribonucleótido circular" o "ARN circular" o "ARNc" se usan indistintamente y se refieren a un polirribonucleótido que forma una estructura circular a través de enlaces covalentes.

[0108] Como se usa en el presente documento, el término "fragmento de intrón del grupo I en 3'" se refiere a una secuencia con una similitud del 75 % o superior con el extremo proximal 3' de un intrón del grupo I natural que incluye el dinucleótido del sitio de empalme y opcionalmente un tramo de secuencia de exones naturales.

[0109] Como se usa en el presente documento, el término "fragmento de intrón del grupo I en 5'" se refiere a una secuencia con un 75 % o más de similitud con el extremo proximal 5' de un intrón del grupo I natural que incluye el dinucleótido del sitio de empalme y opcionalmente un tramo de secuencia de exones naturales.

[0110] Como se usa en el presente documento, el término "sitio de permutación" se refiere al sitio en un intrón del grupo I donde se realiza un corte antes de la permutación del intrón. Este corte genera fragmentos de intrones del grupo I en 3' y 5' que se permutan para estar a ambos lados de un tramo de ARN precursor que se circulará.

[0111] Como se usa en el presente documento, el término "sitio de empalme" se refiere a un dinucleótido que está parcial o totalmente incluido en un intrón del grupo I y entre el cual se escinde un enlace fosfodiéster durante la circularización del ARN.

[0112] Como se usa en el presente documento, el término "proteína terapéutica" se refiere a cualquier proteína que, cuando se administra a un sujeto directa o indirectamente en forma de un ácido nucleico traducido, tiene un efecto terapéutico, diagnóstico y/o profiláctico y/o provoca un efecto biológico y/o farmacológico deseado.

[0113] Como se usa en el presente documento, el término "inmunógeno" se refiere a un potencial para inducir una respuesta inmune a una sustancia. Se puede inducir una respuesta inmunitaria cuando el sistema inmunitario de un organismo o un determinado tipo de células inmunitarias se exponen a una sustancia inmunogénica. El término "no inmunogénico" se refiere a la falta o ausencia de una respuesta inmune por encima de un umbral detectable a una sustancia. No se detecta ninguna respuesta inmunitaria cuando el sistema inmunitario de un organismo o un determinado tipo de células inmunitarias se exponen a una sustancia no inmunogénica. En algunas formas de realización, un polirribonucleótido circular no inmunogénico como se proporciona en el presente documento no induce una respuesta inmune por encima de un umbral predeterminado cuando se mide mediante un ensayo de inmunogenicidad. En algunas formas de realización, no se detecta ninguna respuesta inmune innata cuando un sistema inmune de un organismo o un cierto tipo de células inmunes se expone a un polirribonucleótido circular no inmunogénico como se proporciona en el presente documento. En algunas formas de realización, no se detecta ninguna respuesta inmune adaptativa cuando un sistema inmune de un organismo o un cierto tipo de célula inmune se expone a un polirribonucleótido circular no inmunogénico como se proporciona en el presente documento.

[0114] Como se utiliza en el presente documento, el término "eficiencia de circularización" se refiere a una medición del polirribonucleótido circular resultante en comparación con su material de partida lineal.

[0115] Como se usa en el presente documento, el término "eficiencia de traducción" se refiere a una tasa o cantidad de producción de proteína o péptido a partir de un transcrito de ribonucleótido. En algunas formas de realización, la eficiencia

de la traducción se puede expresar como cantidad de proteína o péptido producido por cantidad dada de transcrito que codifica la proteína o péptido.

[0116] El término "nucleótido" se refiere a un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido, una forma modificada del mismo o un análogo del mismo. Los nucleótidos incluyen especies que comprenden purinas, por ejemplo, adenina, hipoxantina, guanina y sus derivados y análogos, así como pirimidinas, por ejemplo, citosina, uracilo, timina y sus derivados y análogos. Los análogos de nucleótidos incluyen nucleótidos que tienen modificaciones en la estructura química de la base, azúcar y/o fosfato, incluyendo, entre otros, modificaciones de pirimidina en la posición 5', modificaciones de purina en la posición 8', modificaciones en aminas exocíclicas de citosina y sustitución de 5-bromouracilo; y modificaciones de azúcar en la posición 2', incluidos, entre otros, ribonucleótidos modificados con azúcar en los que el 2'-OH se reemplaza por un grupo tal como H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, o CN, en donde R es un resto alquilo como se define en el presente documento. También se pretende que los análogos de nucleótidos incluyan nucleótidos con bases tales como inosina, queuosina, xantina; azúcares tales como 2'-metil ribosa; enlaces fosfodiéster no naturales tales como metilfosfonato, fosforotioato y enlaces peptídicos. Los análogos de nucleótidos incluyen 5-metoxiuridina, 1-metilpseudouridina y 6-metiladenosina.

[0117] Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento para describir un polímero de cualquier longitud, por ejemplo, mayor que aproximadamente 2 bases, mayor que aproximadamente 10 bases, mayor que aproximadamente 100 bases, mayor que aproximadamente 500 bases., más de 1000 bases, o hasta aproximadamente 10.000 o más bases, compuestas de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, y pueden producirse enzimática o sintéticamente (por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n° 5.948.902 y las referencias citadas en la misma), que puede hibridarse con ácidos nucleicos naturales de una manera específica de secuencia análoga a la de dos ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, puede participar en interacciones de apareamiento de bases de Watson-Crick. Los ácidos nucleicos naturales se componen de nucleótidos que incluyen guanina, citosina, adenina, timina y uracilo (G, C, A, T y U respectivamente).

[0118] Los términos "ácido ribonucleico" y "ARN", tal como se usan en el presente documento, significan un polímero compuesto de ribonucleótidos.

[0119] Los términos "ácido desoxirribonucleico" y "ADN", tal como se usan en el presente documento, significan un polímero compuesto de desoxirribonucleótidos.

[0120] "Aislado" o "purificado" generalmente se refiere al aislamiento de una sustancia (por ejemplo, en algunas formas de realización, un compuesto, un polinucleótido, una proteína, un polipéptido, una composición de polinucleótidos o una composición de polipéptido) de manera que la sustancia comprende un porcentaje significativo (por ejemplo, más del 1 %, más del 2 %, más del 5 %, más del 10 %, más del 20 %, más del 50 % o más, generalmente hasta aproximadamente 90 %-100 %) de la muestra en la que reside. En determinadas formas de realización, un componente sustancialmente purificado comprende al menos el 50 %, el 80 %-85 % o el 90 %-95 % de la muestra. Las técnicas para purificar polinucleótidos y polipéptidos de interés son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y sedimentación según la densidad. Generalmente, una sustancia se purifica cuando existe en una muestra en una cantidad, en relación con otros componentes de la muestra, que es mayor que la que se encuentra naturalmente.

[0121] Los términos "dúplex", "bicatenario" o "hibridado" como se usan en el presente documento se refieren a ácidos nucleicos formados por hibridación de dos hebras sencillas de ácidos nucleicos que contienen secuencias complementarias. En la mayoría de los casos, el ADN genómico es de doble cadena. Las secuencias pueden ser totalmente complementarias o parcialmente complementarias.

[0122] Como se usa en el presente documento, "no estructurado" con respecto al ARN se refiere a una secuencia de ARN que no es predicha por el software RNAFold o herramientas predictivas similares para formar una estructura (por ejemplo, un bucle de horquilla) consigo misma u otras secuencias en la misma. Molécula de ARN. En algunas formas de realización, el ARN no estructurado se puede caracterizar funcionalmente usando ensayos de protección de nucleasas.

[0123] Como se usa en el presente documento, "estructurado" con respecto al ARN se refiere a una secuencia de ARN que se predice mediante el software RNAFold o herramientas predictivas similares para formar una estructura (por ejemplo, un bucle de horquilla) consigo misma u otras secuencias en la misma molécula de ARN.

[0124] Como se usa en el presente documento, dos "regiones formadoras de dúplex", "brazos de homología" o "regiones de homología" pueden ser dos regiones cualesquiera que estén termodinámicamente favorecidas para formar pares cruzados en una interacción específica de secuencia. En algunas formas de realización, dos regiones formadoras de dúplex, brazos de homología o regiones de homología comparten un nivel suficiente de identidad de secuencia con el complemento inverso de cada uno para actuar como sustratos para una reacción de hibridación. Como se usa en el presente documento, las secuencias de polinucleótidos tienen "homología" cuando son idénticas o comparten identidad de secuencia con un complemento inverso o una secuencia "complementaria". El porcentaje de identidad de secuencia entre una región de homología y el complemento inverso de una región de homología puede ser cualquier porcentaje de identidad de secuencia que permita que se produzca la hibridación. En algunas formas de realización, una

región formadora de dúplex interna de un polinucleótido de la invención es capaz de formar un dúplex con otra región formadora de dúplex interna y no forma un dúplex con una región formadora de dúplex externa.

[0125] Se dice que las moléculas de ácido nucleico lineales tienen un "terminal 5'" (extremo 5') y un "terminal 3'" (extremo 3') porque los enlaces fosfodiéster del ácido nucleico se producen en el carbono 5' y en el carbono 3' de los restos de azúcar de los mononucleótidos sustituyentes. El nucleótido final de un polinucleótido en el que se produciría un nuevo enlace con un carbono 5' es su nucleótido terminal 5'. El nucleótido final de un polinucleótido en el que se produciría un nuevo enlace con un carbono 3' es su nucleótido terminal 3'. Un nucleótido terminal, como se usa en el presente documento, es el nucleótido en la posición final del extremo 3' o 5'.

[0126] "Transcripción" significa la formación o síntesis de una molécula de ARN mediante una ARN polimerasa usando una molécula de ADN como plantilla. La invención no está limitada con respecto a la ARN polimerasa que se usa para la transcripción. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se puede utilizar una ARN polimerasa de tipo T7.

[0127] "Traducción" significa la formación de una molécula polipeptídica mediante un ribosoma basado en un molde de ARN.

[0128] Debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir formas de realización particulares únicamente y no pretende ser limitante. Tal como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye combinaciones de dos o más células, o cultivos completos de células; La referencia a "un polinucleótido" incluye, como cuestión práctica, muchas copias de ese polinucleótido. A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, tal como se utiliza en este documento, se entiende que el término "o" es inclusivo. A menos que se defina aquí y a continuación en el recordatorio de la especificación, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece la invención.

[0129] A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, como se usa en el presente documento, se entiende que el término "aproximadamente" está dentro de un rango de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. "Acerca de" puede entenderse como dentro del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 % o 0,01 % del valor declarado. A menos que se desprenda lo contrario del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en este documento se modifican con el término "acerca de".

[0130] Como se usa en el presente documento, el término "codificar" se refiere ampliamente a cualquier proceso mediante el cual la información en una macromolécula polimérica se usa para dirigir la producción de una segunda molécula que es diferente de la primera. La segunda molécula puede tener una estructura química diferente de la naturaleza química de la primera molécula.

[0131] Por "coadministrar" se entiende la administración de un agente terapéutico proporcionado en el presente documento junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales lo suficientemente cerca en el tiempo de modo que el agente terapéutico proporcionado en el presente documento pueda mejorar el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales o viceversa.

[0132] Los términos "tratar" y "prevenir", así como las palabras que se derivan de ellos, tal como se usan en el presente documento, no implican necesariamente un tratamiento o prevención 100 % o completo. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención que un experto en la técnica reconoce que tiene un beneficio o efecto terapéutico potencial. El tratamiento o prevención proporcionado por el método divulgado en el presente documento puede incluir tratamiento o prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad. Además, para los fines del presente documento, "prevención" puede abarcar retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o afección de la misma.

[0133] Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de expresión" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto, por ejemplo, un péptido o polipéptido, ácido nucleico regulador o ácido nucleico no codificante. Una secuencia de expresión ejemplar que codifica un péptido o polipéptido puede comprender una pluralidad de tríadas de nucleótidos, cada una de las cuales puede codificar un aminoácido y se denomina "codón".

[0134] Como se usa en el presente documento, un "espaciador" se refiere a una región de una secuencia de polinucleótidos que varía desde 1 nucleótido hasta cientos o miles de nucleótidos que separan otros dos elementos a lo largo de una secuencia de polinucleótidos. Las secuencias pueden definirse o pueden ser aleatorias. Un espaciador normalmente no tiene codificación. En algunas formas de realización, los espaciadores incluyen regiones de formación dúplex.

[0135] Como se usa en el presente documento, "sitio de empalme" se refiere al dinucleótido o dinucleótidos entre los cuales se produce la escisión del enlace fosfodiéster durante una reacción de empalme. Un "sitio de empalme 5'" se refiere al dinucleótido 5' natural del intrón, por ejemplo, intrón del grupo I, mientras que un "sitio de empalme 3'" se refiere al dinucleótido 3' natural del intrón.

- 5 **[0136]** Como se usa en el presente documento, un “sitio de entrada al ribosoma interno” o “IRES” se refiere a una secuencia de ARN o elemento estructural que varía en tamaño de 10 nt a 1000 nt o más, capaz de iniciar la traducción de un polipéptido en ausencia de un Estructura típica de la tapa de ARN. Un IRES suele tener una longitud de entre 500 nt y 700 nt.
- [0137]** Como se usa en el presente documento, un “sitio de miARN” se refiere a un tramo de nucleótidos dentro de un polinucleótido que es capaz de formar un dúplex con al menos 8 nucleótidos de una secuencia de miARN natural.
- 10 **[0138]** Como se usa en el presente documento, un “sitio de endonucleasa” se refiere a un tramo de nucleótidos dentro de un polinucleótido que es capaz de ser reconocido y escindido por una proteína endonucleasa.
- 15 **[0139]** Como se usa en el presente documento, “ARN bicistrónico” se refiere a un polinucleótido que incluye dos secuencias de expresión que codifican dos proteínas distintas. Estas secuencias de expresión pueden separarse mediante una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido escindible tal como un sitio de escisión de proteasa. También pueden estar separados por un elemento de salto ribosómico.
- 20 **[0140]** Como se usa en el presente documento, el término “elemento de salto ribosómico” se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia peptídica corta capaz de provocar la generación de dos cadenas peptídicas a partir de la traducción de una molécula de ARN. Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría, se plantea la hipótesis de que los elementos de omisión ribosómica funcionan (1) terminando la traducción de la primera cadena peptídica y reiniciando la traducción de la segunda cadena peptídica; o (2) escisión de un enlace peptídico en la secuencia peptídica codificada por el elemento de salto del ribosoma mediante una actividad proteasa intrínseca del péptido codificado, o mediante otra proteasa en el entorno (por ejemplo, citosol).
- 25 **[0141]** Como se usa en el presente documento, el término “coformular” se refiere a una formulación de nanopartículas que comprende dos o más ácidos nucleicos o un ácido nucleico y otra sustancia farmacológica activa. Normalmente, las proporciones son equimolares o se definen en la cantidad ratiométrica de los dos o más ácidos nucleicos o el ácido nucleico y otra sustancia farmacológica activa.
- 30 **[0142]** Como se usa en el presente documento, “vehículo de transferencia” incluye cualquiera de los vehículos, diluyentes, excipientes y similares farmacéuticos estándar, que generalmente están destinados a su uso en relación con la administración de agentes biológicamente activos, incluidos los ácidos nucleicos.
- 35 **[0143]** Como se usa en el presente documento, la frase “nanopartícula lipídica” se refiere a un vehículo de transferencia que comprende uno o más lípidos (por ejemplo, en algunas formas de realización, lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos modificados con PEG).
- 40 **[0144]** Como se usa en el presente documento, la frase “lípidos ionizables” se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que llevan una carga positiva neta a un pH seleccionado, tal como pH 4 fisiológico y una carga neutra a otros pH tales como pH 7 fisiológico.
- 45 **[0145]** En algunas formas de realización, un lípido, por ejemplo, un lípido ionizable, descrito en el presente documento comprende uno o más grupos escindibles. Los términos “escindir” y “escindible” se usan en el presente documento para significar que uno o más enlaces químicos (por ejemplo, uno o más de enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y/o interacciones iónicas) entre átomos en o adyacentes al grupo funcional en cuestión se rompen (por ejemplo, se hidrolizan) o son capaces de romperse al exponerse a condiciones seleccionadas (por ejemplo, a la exposición a condiciones enzimáticas). En determinadas formas de realización, el grupo escindible es un grupo funcional disulfuro y, en formas de realización particulares, es un grupo disulfuro que es capaz de escindirse tras la exposición a condiciones biológicas seleccionadas (por ejemplo, condiciones intracelulares). En determinadas formas de realización, el grupo escindible es un grupo funcional éster que es capaz de escindirse tras la exposición a condiciones biológicas seleccionadas. Por ejemplo, los grupos disulfuro pueden escindirse enzimáticamente o mediante una reacción de hidrólisis, oxidación o reducción. Tras la escisión de dicho grupo funcional disulfuro, se pueden liberar uno o más restos o grupos funcionales (por ejemplo, uno o más de un grupo de cabeza y/o un grupo de cola) que están unidos a los mismos.
- 50 Los grupos escindibles ejemplares pueden incluir, entre otros, grupos disulfuro, grupos éster, grupos éter y cualquier derivado de los mismos (por ejemplo, ésteres alquílicos y arílicos). En determinadas formas de realización, el grupo escindible no es un grupo éster o un grupo éter. En algunas formas de realización, un grupo escindible está unido (por ejemplo, unido por uno o más enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas y enlaces covalentes) a uno o más restos o grupos funcionales (por ejemplo, al menos un grupo de cabeza y al menos un grupo de cola). En ciertas formas de realización, al menos uno de los restos o grupos funcionales es hidrófilo (por ejemplo, un grupo principal hidrófilo que comprende uno o más de imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, alquilamino opcionalmente sustituido y piridilo).
- 60 **[0146]** Como se usa en el presente documento, el término “hidrófilo” se usa para indicar en términos cualitativos que un grupo funcional prefiere el agua y, típicamente, dichos grupos son solubles en agua. Por ejemplo, en el presente documento se describen compuestos que comprenden un grupo funcional disulfuro (S-S) escindible unido a uno o más
- 65

grupos hidrofílicos (por ejemplo, un grupo principal hidrofílico), en donde dichos grupos hidrofílicos comprenden o se seleccionan del grupo que consiste en imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, un alquilamino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquilamino tal como dimetilamino) y piridilo.

- 5 **[0147]** En determinadas formas de realización, al menos uno de los grupos funcionales de restos que comprenden los compuestos descritos en el presente documento es de naturaleza hidrófoba (por ejemplo, un grupo de cola hidrófobo que comprende un lípido de origen natural como el colesterol). Tal como se utiliza en el presente documento, el término “hidrófobo” se utiliza para indicar en términos cualitativos que un grupo funcional evita el agua y, normalmente, dichos grupos no son solubles en agua. Por ejemplo, en el presente documento se describen compuestos que comprenden un
- 10 grupo funcional escindible (por ejemplo, un grupo disulfuro (S-S)) unido a uno o más grupos hidrofóbicos, en donde dichos grupos hidrofóbicos comprenden uno o más lípidos naturales tales como colesterol, y/o un alquilo C₆-C₂₀ opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y/o un acilo C₆-C₂₀ opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado.
- 15 **[0148]** El compuesto descrito en el presente documento también puede comprender una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, el H puede estar en cualquier forma isotópica, incluidos ¹H, ²H (D o deuterio) y ³H (T o tritio); El C puede estar en cualquier forma isotópica, incluidos ¹²C, ¹³C y ¹⁴C; El O puede estar en cualquier forma isotópica, incluidos ¹⁶O y ¹⁸O; F puede estar en cualquier forma isotópica, incluidos ¹⁸F y ¹⁹F; y similares.
- 20 **[0149]** Al describir la invención, que puede incluir compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y métodos para usar dichos compuestos y composiciones, los siguientes términos, si están presentes, tienen los siguientes significados a menos que se indique lo contrario. También debe entenderse que, cuando se describe en el presente documento, cualquiera de los restos definidos a continuación puede sustituirse con una variedad de sustituyentes, y que las definiciones respectivas pretenden incluir
- 25 dichos restos sustituidos dentro de su alcance como se establece a continuación. A menos que se indique lo contrario, el término “sustituido” se definirá como se establece a continuación. Debe entenderse además que los términos “grupos” y “radicales” pueden considerarse intercambiables cuando se usan en el presente documento.
- 30 **[0150]** Cuando se enumera un rango de valores, se pretende abarcar cada valor y subrango dentro del rango. Por ejemplo, “alquilo C₁₋₆” pretende abarcar alquilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₁₋₆, C₁₋₅, C₁₋₄, C₁₋₃, C₁₋₂, C₂₋₆, C₂₋₅, C₂₋₄, C₂₋₃, C₃₋₆, C₃₋₅, C₃₋₄, C₄₋₆, C₄₋₅ y C₅₋₆.
- 35 **[0151]** En determinadas formas de realización, los compuestos descritos en el presente documento comprenden, por ejemplo, al menos un grupo de cabeza hidrófilo y al menos un grupo de cola hidrófobo, cada uno de ellos unido a al menos un grupo escindible, convirtiendo así dichos compuestos en anfifílicos. Tal como se utiliza en el presente documento para describir un compuesto o composición, el término “anfifílico” significa la capacidad de disolverse en entornos tanto polares (por ejemplo, agua) como no polares (por ejemplo, lípidos). Por ejemplo, en determinadas formas de realización, los compuestos descritos en el presente documento comprenden al menos un grupo de cola lipófilo (por ejemplo, colesterol o un alquilo C₆-C₂₀) y al menos un grupo de cabeza hidrófilo (por ejemplo, imidazol), cada uno unido a un grupo escindible.
- 40 (por ejemplo, disulfuro).
- 45 **[0152]** Cabe señalar que los términos “grupo de cabeza” y “grupo de cola”, tal como se usan para describir los compuestos de la presente invención, y en particular los grupos funcionales que comprenden tales compuestos, se usan para facilitar la referencia para describir la orientación de uno o más grupos funcionales en relación con otros grupos funcionales. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, un grupo de cabeza hidrófilo (por ejemplo, guanidinio) está unido (por ejemplo, mediante uno o más enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas y enlaces covalentes) a un grupo funcional escindible (por ejemplo, un grupo disulfuro), que a su vez está unido a un grupo de cola hidrófobo (por ejemplo, colesterol).
- 50 **[0153]** Como se usa en el presente documento, el término “alquilo” se refiere a hidrocarburos C₁-C₄₀ de cadena lineal y ramificada (por ejemplo, hidrocarburos C₆-C₂₀), e incluye hidrocarburos tanto saturados como insaturados. En ciertas formas de realización, el alquilo puede comprender uno o más alquilos cíclicos y/o uno o más heteroátomos tales como oxígeno, nitrógeno o azufre y puede estar opcionalmente sustituido con sustituyentes (por ejemplo, uno o más de alquilo, halo, alcoxilo, hidroxilo, amino, arilo, éter, éster o amida). En determinadas formas de realización, un alquilo contemplado
- 55 incluye (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien. El uso de designaciones tales como, por ejemplo, “C₆-C₂₀” pretende referirse a un alquilo (por ejemplo, de cadena lineal o ramificada e incluidos alquenos y alquilos) que tiene el intervalo de átomos de carbono mencionado. En algunas formas de realización, un grupo alquilo tiene de 1 a 10 átomos de carbono (“alquilo C₁₋₁₀”). En algunas formas de realización, un grupo alquilo tiene de 1 a 9 átomos de carbono (“alquilo C₁₋₉”). En algunas formas de realización, un grupo alquilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono (“alquilo C₁₋₈”). En algunas formas de realización, un grupo alquilo tiene de 1 a 7 átomos de carbono (“alquilo C₁₋₇”). En algunas formas de realización, un grupo alquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono (“alquilo C₁₋₆”). En algunas formas de realización, un grupo alquilo tiene de 1 a 5 átomos de carbono (“alquilo C₁₋₅”). En algunas formas de realización, un grupo alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono (“alquilo C₁₋₄”). En algunas formas de realización, un grupo alquilo tiene de 1 a 3 átomos de carbono (“alquilo C₁₋₃”). En algunas formas de realización, un grupo alquilo tiene de 1 a 2 átomos de carbono (“alquilo C₁₋₂”). En algunas formas de realización, un
- 60 grupo alquilo tiene 1 átomo de carbono (“alquilo C₁”). Ejemplos de grupos alquilo C₁₋₆ incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo y similares.

[0154] Como se usa en el presente documento, "alquenilo" se refiere a un radical de un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, uno o más dobles enlaces carbono-carbono (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 dobles enlaces carbono-carbono), y opcionalmente uno o más triples enlaces carbono-carbono (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 triples enlaces carbono-carbono) ("alquenilo C₂₋₂₀"). En determinadas formas de realización, el alquenilo no contiene ningún triple enlace. En algunas formas de realización, un grupo alquenilo tiene de 2 a 10 átomos de carbono ("alquenilo C₂₋₁₀"). En algunas formas de realización, un grupo alquenilo tiene de 2 a 9 átomos de carbono ("alquenilo C₂₋₉"). En algunas formas de realización, un grupo alquenilo tiene de 2 a 8 átomos de carbono ("alquenilo C₂₋₈"). En algunas formas de realización, un grupo alquenilo tiene de 2 a 7 átomos de carbono ("alquenilo C₂₋₇"). En algunas formas de realización, un grupo alquenilo tiene de 2 a 6 átomos de carbono ("alquenilo C₂₋₆"). En algunas formas de realización, un grupo alquenilo tiene de 2 a 5 átomos de carbono ("alquenilo C₂₋₅"). En algunas formas de realización, un grupo alquenilo tiene de 2 a 4 átomos de carbono ("alquenilo C₂₋₄"). En algunas formas de realización, un grupo alquenilo tiene de 2 a 3 átomos de carbono ("alquenilo C₂₋₃"). En algunas formas de realización, un grupo alquenilo tiene 2 átomos de carbono ("alquenilo C₂"). El uno o más dobles enlaces carbono-carbono pueden ser internos (como en 2-butenilo) o terminales (como en 1-butenilo). Ejemplos de grupos alquenilo C₂₋₄ incluyen etenilo (C₂), 1-propenilo (C₃), 2-propenilo (C₃), 1-butenilo (C₄), 2-butenilo (C₄), butadienilo (C₄) y similares. Ejemplos de grupos alquenilo C₂₋₆ incluyen los grupos alquenilo C₂₋₄ antes mencionados, así como pentenilo (C₅), pentadienilo (C₅), hexenilo (C₆) y similares. Ejemplos adicionales de alquenilo incluyen heptenilo (C₇), octenilo (C₈), octatrienilo (C₈) y similares.

[0155] Como se usa en el presente documento, "alquinilo" se refiere a un radical de un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, uno o más triples enlaces carbono-carbono (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 triples enlaces carbono-carbono), y opcionalmente uno o más dobles enlaces carbono-carbono (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 dobles enlaces carbono-carbono) ("alquinilo C₂₋₂₀"). En determinadas formas de realización, el alquinilo no contiene ningún doble enlace. En algunas formas de realización, un grupo alquinilo tiene de 2 a 10 átomos de carbono ("alquinilo C₂₋₁₀"). En algunas formas de realización, un grupo alquinilo tiene de 2 a 9 átomos de carbono ("alquinilo C₂₋₉"). En algunas formas de realización, un grupo alquinilo tiene de 2 a 8 átomos de carbono ("alquinilo C₂₋₈"). En algunas formas de realización, un grupo alquinilo tiene de 2 a 7 átomos de carbono ("alquinilo C₂₋₇"). En algunas formas de realización, un grupo alquinilo tiene de 2 a 6 átomos de carbono ("alquinilo C₂₋₆"). En algunas formas de realización, un grupo alquinilo tiene de 2 a 5 átomos de carbono ("alquinilo C₂₋₅"). En algunas formas de realización, un grupo alquinilo tiene de 2 a 4 átomos de carbono ("alquinilo C₂₋₄"). En algunas formas de realización, un grupo alquinilo tiene de 2 a 3 átomos de carbono ("alquinilo C₂₋₃"). En algunas formas de realización, un grupo alquinilo tiene 2 átomos de carbono ("alquinilo C₂"). Uno o más triples enlaces carbono-carbono pueden ser internos (como en 2-butenilo) o terminales (como en 1-butenilo). Ejemplos de grupos alquinilo C₂₋₄ incluyen, sin limitación, etinilo (C₂), 1-propinilo (C₃), 2-propinilo (C₃), 1-butenilo (C₄), 2-butenilo (C₄) y similares. Ejemplos de grupos alquenilo C₂₋₆ incluyen los grupos alquinilo C₂₋₄ antes mencionados, así como pentinilo (C₅), hexinilo (C₆) y similares. Ejemplos adicionales de alquinilo incluyen heptinilo (C₇), octinilo (C₈) y similares.

[0156] Como se usa en el presente documento, "alquileno", "alquenileno" y "alquinileno" se refieren a un radical divalente de un grupo alquilo, alquenilo y alquinilo, respectivamente. Cuando se proporciona un rango o número de carbonos para un grupo "alquileno", "alquenileno" o "alquinileno" particular, se entiende que el rango o número se refiere al rango o número de carbonos en la cadena divalente de carbono lineal. Los grupos "alquileno", "alquenileno" y "alquinileno" pueden estar sustituidos o no sustituidos con uno o más sustituyentes como se describe en el presente documento.

[0157] Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a grupos aromáticos (por ejemplo, estructuras monocíclicas, bicíclicas y tricíclicas) que contienen de seis a diez carbonos en la parte del anillo. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos mediante átomos de carbono disponibles y en ciertas formas de realización pueden incluir uno o más heteroátomos tales como oxígeno, nitrógeno o azufre. En algunas formas de realización, un grupo arilo tiene seis átomos de carbono en el anillo ("arilo C₆"; por ejemplo, fenilo). En algunas formas de realización, un grupo arilo tiene diez átomos de carbono en el anillo ("arilo C₁₀"; por ejemplo, naftilo tal como 1-naftilo y 2-naftilo).

[0158] Como se usa en el presente documento, "heteroarilo" se refiere a un radical de un sistema de anillos aromáticos 4n+2 monocíclico o bicíclico de 5-10 miembros (por ejemplo, que tiene 6 o 10 electrones compartidos en una matriz cíclica) que tiene átomos de carbono en el anillo y 1-4 heteroátomos en el anillo proporcionados en el sistema de anillos aromáticos, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre ("heteroarilo de 5-10 miembros"). En los grupos heteroarilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Los sistemas de anillos heteroarilo bicíclicos pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. "Heteroarilo" incluye sistemas de anillos en los que el anillo heteroarilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos carbocíclico o heterocíclico en los que el punto de unión está en el anillo heteroarilo y, en tales casos, el número de miembros del anillo continúa designando el número de miembros del anillo en el sistema de anillos heteroarilo. "Heteroarilo" también incluye sistemas de anillos en los que el anillo heteroarilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos arilo en los que el punto de unión está en el anillo arilo o heteroarilo, y en tales casos, el número de miembros del anillo designa el número de miembros del anillo en el sistema de anillos fusionados (arilo/heteroarilo). Grupos heteroarilo bicíclicos en los que un anillo no contiene un heteroátomo (por ejemplo, indolilo, quinolinilo, carbazolilo y similares), el punto de unión puede estar en cualquiera de los anillos, es decir, el anillo que lleva un heteroátomo (por ejemplo, 2-indolilo) o el anillo que no contiene un heteroátomo (por ejemplo, 5-indolilo).

[0159] El término "cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo monovalente saturado cíclico, bicíclico o cíclico con puente (por ejemplo, adamantilo) de 3-12, 3-8, 4-8 o 4-6 carbonos, al que se hace referencia en el presente documento. por ejemplo, como "cicloalquilo C₄₋₈", derivado de un cicloalcano. Los grupos cicloalquilo ejemplares incluyen, entre otros, ciclohexanos, ciclopentanos, ciclobutanos y ciclopropanos.

[0160] Como se usa en el presente documento, "heterociclilo" o "heterocíclico" se refiere a un radical de un sistema de anillos no aromático de 3 a 10 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno., oxígeno, azufre, boro, fósforo y silicio ("heterociclilo de 3 a 10 miembros"). En los grupos heterociclilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Un grupo heterociclilo puede ser monocíclico ("heterociclilo monocíclico") o un sistema de anillo condensado, con puente o espiro tal como un sistema bicíclico ("heterociclilo bicíclico"), y puede estar saturado o parcialmente insaturado. Los sistemas de anillos bicíclicos de heterociclilo pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. "Heterociclilo" también incluye sistemas de anillos en los que el anillo de heterociclilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos carbociclilo en los que el punto de unión está en el anillo de carbociclilo o heterociclilo, o sistemas de anillos en los que el anillo de heterociclilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos arilo o heteroarilo, en donde el punto de unión está en el anillo de heterociclilo y, en tales casos, el número de miembros del anillo continúa designando el número de miembros del anillo en el sistema de anillos de heterociclilo. Los términos "heterociclo", "heterociclilo", "anillo de heterociclilo", "grupo heterocíclico", "resto heterocíclico" y "radical heterocíclico" pueden usarse indistintamente.

[0161] Como se usa en el presente documento, "ciano" se refiere a -CN.

[0162] Los términos "halo" y "halógeno" como se usan en el presente documento se refieren a un átomo seleccionado de flúor (fluoro, -F), cloro (cloro, -Cl), bromo (bromo, -Br) y yodo (yodo, -I). En determinadas formas de realización, el grupo halo es fluoro o cloro.

[0163] El término "alcoxi", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo que está unido a otro resto mediante un átomo de oxígeno (-O(alquilo)). Los ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi y butoxi.

[0164] Como se usa en el presente documento, "oxo" se refiere a -C=O.

[0165] En general, el término "sustituido", ya sea precedido por el término "opcionalmente" o no, significa que al menos un hidrógeno presente en un grupo (por ejemplo, un átomo de carbono o nitrógeno) se reemplaza con un sustituyente permitido, por ejemplo, un sustituyente que tras la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo, un compuesto que no sufre transformación espontánea tal como mediante reordenamiento, ciclación, eliminación u otra reacción. A menos que se indique lo contrario, un grupo "sustituido" tiene un sustituyente en una o más posiciones sustituibles del grupo, y cuando se sustituye más de una posición en cualquier estructura dada, el sustituyente es el mismo o diferente en cada posición.

[0166] Como se usa en el presente documento, "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, Berge *et al.*, describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66:1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácidos no tóxicas y farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o usando otros métodos usados en la técnica tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato., hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, sales de fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio y N⁺(alquilo C₁₋₄)₄. Las sales representativas de metales alcalinos o alcalinotérreos incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando sea apropiado, cationes no tóxicos de amonio, amonio cuaternario y amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquilsulfonato inferior y arilsulfonato.

[0167] En formas de realización típicas, la presente invención pretende abarcar los compuestos descritos en el presente documento y las sales farmacéuticamente aceptables, ésteres farmacéuticamente aceptables, formas tautómeras, polimorfos y profármacos de dichos compuestos. En algunas formas de realización, la presente invención incluye una sal

de adición farmacéuticamente aceptable, un éster farmacéuticamente aceptable, un solvato (por ejemplo, hidrato) de una sal de adición, una forma tautomérica, un polimorfo, un enantiómero, una mezcla de enantiómeros, un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros (puros o como mezcla racémica o no racémica) de un compuesto descrito en el presente documento.

[0168] Los compuestos descritos en el presente documento pueden comprender uno o más centros asimétricos y, por tanto, pueden existir en diversas formas isoméricas, por ejemplo, enantiómeros y/o diastereómeros. Por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento pueden estar en forma de un enantiómero, diastereómero o isómero geométrico individual, o pueden estar en forma de una mezcla de estereoisómeros, incluidas mezclas racémicas y mezclas enriquecidas en uno o más estereoisómeros. Los isómeros se pueden aislar a partir de mezclas mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluida la cromatografía líquida quiral de alta presión (HPLC) y la formación y cristalización de sales quirales; o los isómeros preferidos pueden prepararse mediante síntesis asimétricas. Véanse, por ejemplo, Jacques et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, Nueva York, 1981); Wilen et al., *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, Nueva York, 1962); y Wilen, *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (EL Eliel, Ed., Univ. de Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972). La invención abarca adicionalmente compuestos descritos en el presente documento como isómeros individuales sustancialmente libres de otros isómeros y, alternativamente, como mezclas de varios isómeros.

[0169] En ciertas formas de realización, los compuestos y los vehículos de transferencia de los cuales dichos compuestos son un componente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) exhiben una capacidad mejorada (por ejemplo, aumentada) para transfectar una o más células diana. Por consiguiente, también se proporcionan en el presente documento métodos para transfectar una o más células diana. Dichos métodos generalmente comprenden la etapa de poner en contacto una o más células diana con los compuestos y/o composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento de modo que una o más células diana se transfecten con el ARN circular encapsulado en las mismas. Como se usa en el presente documento, los términos "transfectar" o "transfección" se refieren a la introducción intracelular de uno o más materiales encapsulados (por ejemplo, ácidos nucleicos y/o polinucleótidos) en una célula, o preferiblemente en una célula diana. El término "eficiencia de transfección" se refiere a la cantidad relativa de dicho material encapsulado (por ejemplo, polinucleótidos) absorbido, introducido y/o expresado por la célula diana que está sujeta a transfección. En algunas formas de realización, la eficacia de la transfección se puede estimar mediante la cantidad de un producto de polinucleótido informador producido por las células diana después de la transfección. En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia tiene una alta eficiencia de transfección. En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia tiene al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de eficiencia de transfección.

[0170] Como se usa en el presente documento, el término "liposoma" generalmente se refiere a una vesícula compuesta de lípidos (por ejemplo, lípidos anfifílicos) dispuestos en una o más bicapas esféricas. En determinadas formas de realización, el liposoma es una nanopartícula lipídica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica que comprende uno o más de los compuestos lipídicos ionizables descritos en el presente documento). Dichos liposomas pueden ser vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene el ARN circ encapsulado que se administrará a una o más células, tejidos y órganos diana. En determinadas formas de realización, las composiciones descritas en el presente documento comprenden una o más nanopartículas lipídicas. Ejemplos de lípidos adecuados (por ejemplo, lípidos ionizables) que pueden usarse para formar los liposomas y nanopartículas lipídicas contemplados incluyen uno o más de los compuestos descritos en el presente documento (por ejemplo, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y/o HGT4005). Dichos liposomas y nanopartículas lipídicas también pueden comprender lípidos ionizables adicionales tales como C12-200, Dlin-KC2-DMA y/o HGT5001, lípidos auxiliares, lípidos estructurales, lípidos modificados con PEG, MC3, DlinDMA, DlinKC2DMA, cKK-E12, ICE., HGT5000, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, PERROS, DODAP, DODMA, DMDMA, DODAC, DlenDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DlinDAP, DLincarbDAP, DlinCDAP, KLin-K-DMA, Dlin-K-XTC2-DMA, HGT4003 y combinaciones de los mismos.

[0171] Como se usa en el presente documento, las frases "lípidos no catiónicos", "lípidos auxiliares no catiónicos" y "lípidos auxiliares" se usan indistintamente y se refieren a cualquier lípido neutro, zwitteriónico o aniónico.

[0172] Como se usa en el presente documento, la frase "lípidos aniónicos" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que llevan una carga negativa neta a un pH seleccionado, tal como pH fisiológico.

[0173] Como se usa en el presente documento, la frase "lípidos biodegradables" o "lípidos degradables" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que se descomponen en un entorno huésped en el orden de minutos, horas o días, idealmente haciéndolos menos tóxicos y es poco probable que se acumulen en un huésped con el tiempo. Las modificaciones comunes de los lípidos incluyen enlaces éster y enlaces disulfuro, entre otros, para aumentar la biodegradabilidad de un lípido.

[0174] Como se usa en el presente documento, la frase "lípidos de PEG biodegradables" o "lípidos de PEG degradables" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos en las que las moléculas de PEG se escinden del lípido en un entorno huésped en el orden de minutos, horas, o días, idealmente haciéndolos menos inmunogénicos. Las

modificaciones comunes de los lípidos PEG incluyen enlaces éster y enlaces disulfuro, entre otros, para aumentar la biodegradabilidad de un lípido.

[0175] En ciertas formas de realización de la presente invención, los vehículos de transferencia (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) se preparan para encapsular uno o más materiales o agentes terapéuticos (por ejemplo, ARNcirc). El proceso de incorporar un agente terapéutico deseado (por ejemplo, ARNcirc) en un vehículo de transferencia se denomina en el presente documento "cargar" o "encapsular" (Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992). Los materiales cargados o encapsulados en el vehículo de transferencia (por ejemplo, ARNcirc) pueden estar total o parcialmente ubicados en el espacio interior del vehículo de transferencia, dentro de una membrana bicapa del vehículo de transferencia, o asociados con la superficie exterior del vehículo de transferencia.

[0176] Como se usa en el presente documento, el término "lípidos estructurales" se refiere a esteroides y también a lípidos que contienen restos de esteroides.

[0177] Como se define en el presente documento, los "esteroides" son un subgrupo de esteroides que consiste en alcoholes esteroides.

[0178] Como se usa en el presente documento, el término "lípidos estructurales" se refiere a esteroides y también a lípidos que contienen restos de esteroides.

[0179] Como se usa en el presente documento, el término "PEG" significa cualquier polietilenglicol u otro polímero de polialquiléneter.

[0180] Como se define generalmente en el presente documento, un "lípidos PEG-OH" (también denominado en el presente documento "lípidos hidroxil-PEGilados") es un lípidos PEGilado que tiene uno o más grupos hidroxilo (-OH) en el lípidos.

[0181] Como se usa en el presente documento, un "fosfolípidos" es un lípidos que incluye un resto fosfato y una o más cadenas de carbono, tales como cadenas de ácidos grasos insaturados.

[0182] Todas las secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento pueden representar una secuencia de ARN o una secuencia de ADN correspondiente. Se entiende que la desoxitimidina (dT o T) en un ADN se transcribe en una uridina (U) en un ARN. Como tal, "T" y "U" se usan indistintamente en el presente documento en secuencias de nucleótidos.

[0183] Las menciones "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia 50 % idéntica a", como se usa en el presente documento, se refieren a la medida en que las secuencias son idénticas en base a nucleótido por nucleótido o en base a aminoácido por aminoácidos sobre una ventana de comparación. Por lo tanto, se puede calcular un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias óptimamente alineadas durante la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se encuentra la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en el presente documento, típicamente donde la variante polipeptídica mantiene al menos una actividad biológica del polipéptido de referencia.

2. Vectores, ARN precursor y ARN circular

[0184] También se proporcionan en el presente documento ARN circulares, ARN precursores que pueden circularizarse en los ARN circulares y vectores (por ejemplo, vectores de ADN) que pueden transcribirse en los ARN precursores o en los ARN circulares.

[0185] Se han diseñado dos tipos de espaciadores para mejorar la circularización del ARN precursor y/o la expresión génica a partir del ARN circular. El primer tipo de espaciador es el espaciador externo, es decir, presente en un ARN precursor pero eliminado tras la circularización. Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría, se contempla que un espaciador externo puede mejorar la circularización mediada por ribozima manteniendo la estructura de la ribozima misma y evitando que otros elementos de secuencia vecinos interfieran con su plegamiento y función. El segundo tipo de espaciador es el espaciador interno, es decir, presente en un ARN precursor y retenido en un ARN circular resultante. Si bien no se desea limitarse a ninguna teoría, se contempla que un espaciador interno puede mejorar la circularización mediada por ribozima manteniendo la estructura de la ribozima misma y evitando que otros elementos de secuencia vecinos, particularmente el IRES vecino y la región codificante, interfieran con su plegamiento y función. También se contempla que un espaciador interno puede mejorar la expresión de proteínas del IRES evitando que los elementos de

secuencia vecinos, particularmente los elementos intrones, se hibriden con secuencias dentro del IRES e inhibiendo su capacidad para plegarse en su conformación más preferida y activa.

[0186] Para impulsar la expresión de proteínas, el ARN circular comprende un IRES unido operativamente a una secuencia codificante de proteínas. Secuencias IRES ejemplares se proporcionan en la Tabla 17 a continuación. En algunas formas de realización, el ARN circular divulgado en el presente documento comprende una secuencia IRES al menos en un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a una secuencia IRES en la Tabla 17. En algunas formas de realización, el ARN circular divulgado en el presente documento comprende una secuencia IRES en la Tabla 17. En el presente documento se divulgan modificaciones de IRES y secuencias accesorias para aumentar o reducir las actividades de IRES, por ejemplo, truncando el 5' y/o 3' extremos del IRES, agregando un espaciador 5' al IRES, modificando los 6 nucleótidos 5' al sitio de inicio de la traducción (secuencia de Kozak), modificación de sitios de inicio de la traducción alternativos y creando secuencias IRES quiméricas/híbridas. En algunas formas de realización, la secuencia IRES en el ARN circular divulgado en el presente documento comprende una o más de estas modificaciones con respecto a un IRES nativo (por ejemplo, un IRES nativo divulgado en la Tabla 17).

[0187] En ciertos aspectos, se proporcionan en el presente documento polinucleótidos de ARN circular que comprenden un fragmento de intrón del grupo I posterior al empalme en 3', opcionalmente un primer espaciador, un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), una secuencia de expresión, opcionalmente un segundo espaciador, y un fragmento de intrón 5' del grupo I posterior al empalme. En algunas formas de realización, estas regiones están en ese orden. En algunas formas de realización, el ARN circular se elabora mediante un método proporcionado en el presente documento o a partir de un vector proporcionado en el presente documento.

[0188] En ciertas formas de realización, la transcripción de un vector proporcionado en el presente documento (por ejemplo, que comprende una región de homología 5', un fragmento de intrón del grupo I en 3', opcionalmente un primer espaciador, un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), una secuencia de expresión, opcionalmente un segundo espaciador, un fragmento de intrón del grupo I en 5' y una región de homología en 3') da como resultado la formación de un polinucleótido de ARN lineal precursor capaz de circularizarse. En algunas formas de realización, este polinucleótido de ARN lineal precursor se circulariza cuando se incuba en presencia de nucleótido o nucleósido de guanosina (por ejemplo, GTP) y catión divalente (por ejemplo, Mg^{2+}).

[0189] En algunas formas de realización, los vectores y polinucleótidos de ARN precursores proporcionados en el presente documento comprenden una primera región formadora de dúplex (5') y una segunda región formadora de dúplex (3'). En determinadas formas de realización, la primera y segunda regiones de homología pueden formar dúplex perfectos o imperfectos. Así, en determinadas formas de realización al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de los la primera y segunda regiones formadoras de dúplex pueden ser emparejados por bases uno con el otro. En algunas formas de realización, se predice que las regiones formadoras de dúplex tendrán menos del 50 % (por ejemplo, menos del 45 %, menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %) de emparejamiento de bases con secuencias no deseadas en el ARN (por ejemplo, secuencias de regiones que no forman dúplex). En algunas formas de realización, que incluyen dichas regiones formadoras de dúplex en los extremos de la cadena de ARN precursora, y adyacentes o muy cerca del fragmento de intrón del grupo I, acercan los fragmentos de intrón del grupo I muy cerca entre sí, aumentando la eficiencia del empalme. En algunas formas de realización, las regiones formadoras de dúplex tienen de 3 a 100 nucleótidos de longitud (por ejemplo, de 3 a 75 nucleótidos de longitud, de 3 a 50 nucleótidos de longitud, de 20 a 50 nucleótidos de longitud, de 35 a 50 nucleótidos de longitud, de 5 a 25 nucleótidos de longitud). En algunas formas de realización, las regiones formadoras de dúplex son aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, las regiones formadoras de dúplex tienen una longitud de aproximadamente 9 a aproximadamente 50 nucleótidos. En una forma de realización, las regiones formadoras de dúplex tienen una longitud de aproximadamente 9 a aproximadamente 19 nucleótidos. En algunas formas de realización, las regiones formadoras de dúplex tienen una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos. En determinadas formas de realización, las regiones formadoras de dúplex tienen una longitud de aproximadamente 30 nucleótidos.

[0190] En determinadas formas de realización, los vectores, el ARN precursor y el ARN circular proporcionados en el presente documento comprenden un primer (5') y/o un segundo (3') espaciador. En algunas formas de realización, incluir un espaciador entre el fragmento de intrón del grupo I en 3' y el IRES puede conservar estructuras secundarias en esas regiones evitando que interactúen, aumentando así la eficiencia del empalme. En algunas formas de realización, el primer espaciador (entre el fragmento de intrón del grupo I en 3' y el IRES) y el segundo (entre la secuencia de expresión y el fragmento de intrón del grupo I en 5') comprenden regiones de apareamiento de bases adicionales que se predice que se aparearán entre sí y no a la primera y segunda regiones formadoras de dúplex. En algunas formas de realización, dicho emparejamiento de bases espaciadoras acerca los fragmentos de intrones del grupo I entre sí, aumentando aún más la eficiencia del empalme. Además, en algunas formas de realización, la combinación de emparejamiento de bases entre la primera y segunda regiones formadoras de dúplex, y por separado, el emparejamiento de bases entre el primer y segundo espaciadores, promueve la formación de una burbuja de empalme que contiene los fragmentos de intrones del grupo I flanqueados por regiones adyacentes de emparejamiento de bases. Los espaciadores típicos son secuencias contiguas con una o más de las siguientes cualidades: 1) se prevé que eviten interferir con las estructuras proximales, por ejemplo, el IRES, la secuencia de expresión o el intrón; 2) tiene al menos 7 nt de largo y no más de 100 nt; 3) está situado después

y adyacente al fragmento de intrón 3' y/o antes y adyacente al fragmento de intrón 5'; y 4) contiene uno o más de los siguientes: a) una región no estructurada de al menos 5 nt de largo, b) una región de emparejamiento de bases de al menos 5 nt de largo con una secuencia distal, que incluye otro espaciador, y c) una región estructurada en al menos 7 nt de largo limitado en alcance a la secuencia del espaciador. Los espaciadores pueden tener varias regiones, incluyendo una región no estructurada, una región de emparejamiento de bases, una región en horquilla/estructurada y combinaciones de las mismas. En una forma de realización, el espaciador tiene una región estructurada con alto contenido de GC. En una forma de realización, una región dentro de una base espaciadora se empareja con otra región dentro del mismo espaciador. En una forma de realización, una región dentro de una base espaciadora se empareja con una región dentro de otro espaciador. En una forma de realización, un espaciador comprende una o más estructuras de horquilla. En una forma de realización, un espaciador comprende una o más estructuras en horquilla con un tallo de 4 a 12 nucleótidos y un bucle de 2 a 10 nucleótidos. En una forma de realización, hay un espaciador adicional entre el fragmento de intrón del grupo I en 3' y el IRES. En una forma de realización, este espaciador adicional evita que las regiones estructuradas del IRES interfieran con el plegamiento del fragmento del intrón 3' del grupo I o reduce el grado en que esto ocurre. En algunas formas de realización, la secuencia espaciadora 5' tiene al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia espaciadora 5' no tiene más de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, la secuencia espaciadora 5' tiene una longitud de entre 5 y 50, 10 y 50, 20 y 50, 20 y 40 y/o 25 y 35 nucleótidos. En determinadas formas de realización, la secuencia espaciadora 5' es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud. En una forma de realización, la secuencia espaciadora 5' es una secuencia poliA. En otra forma de realización, la secuencia espaciadora 5' es una secuencia poliAC. En una forma de realización, un espaciador comprende aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de contenido de poliAC. En una forma de realización, un espaciador comprende aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de contenido de polipirimidina (C/T o C/U).

[0191] En ciertas formas de realización, un fragmento de intrón del grupo I en 3' es una secuencia contigua al menos 75 % idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico) a un fragmento 3' proximal de un intrón natural del grupo I que incluye el dinucleótido del sitio de empalme 3' y opcionalmente la secuencia del exón adyacente de al menos 1 nt de longitud (*p. ej.*, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 nt de longitud) y como máximo la longitud del exón. Normalmente, un fragmento de intrón del grupo I en 5' es una secuencia contigua al menos 75 % idéntica (por ejemplo, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico) a un fragmento proximal 5' de un intrón natural del grupo I que incluye el dinucleótido del sitio de empalme 5' y opcionalmente la secuencia del exón adyacente de al menos 1 nt de longitud (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 nt de longitud) y como máximo la longitud del exón. Como lo describen Umekage *et al.* (2012), las porciones externas del fragmento de intrón del grupo I en 3' y del fragmento de intrón del grupo I en 5' se eliminan en la circularización, lo que hace que el ARN circular proporcionado en este documento comprenda solo la parte del fragmento de intrón del grupo I en 3' formado por el exón opcional. secuencia de al menos 1 nt de longitud y fragmento de intrón del grupo I en 5' formado por la secuencia de exón opcional de al menos 1 nt de longitud, si dichas secuencias estaban presentes en el ARN precursor no circularizado. La parte del fragmento de intrón del grupo I en 3' que es retenida por un ARN circular se denomina en el presente documento fragmento de intrón del grupo I en 3' posterior al empalme. La parte del fragmento de intrón del grupo I en 5' que es retenida por un ARN circular se denomina en el presente documento fragmento de intrón del grupo I en 5' posterior al empalme.

[0192] En ciertas formas de realización, los vectores, el ARN precursor y el ARN circular proporcionados en el presente documento comprenden un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES). La inclusión de un IRES permite la traducción de uno o más marcos de lectura abiertos a partir de un ARN circular (por ejemplo, marcos de lectura abiertos que forman la secuencia de expresión). El elemento IRES atrae un complejo de iniciación de la traducción ribosomal eucariota y promueve el inicio de la traducción. Véase, por ejemplo, Kaufman *et al.*, *Nuc. Acids Res.* (1991) 19:4485-4490; Gurtu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Com.* (1996) 229:295-298; Rees *et al.*, *BioTechniques* (1996) 20: 102-110; Kobayashi *et al.*, *BioTechniques* (1996) 21:399-402; y Mosser *et al.*, *BioTechniques* 1997 22 150-161).

[0193] Una multitud de secuencias IRES están disponibles e incluyen secuencias derivadas de una amplia variedad de virus, tales como secuencias líderes de picornavirus tales como el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) UTR (Jang *et al.* *J. Virol.* (1989) 63: 1651-1660), la secuencia líder de la polio, el líder del virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis C IRES, el rinovirus humano tipo 2 IRES (Dobrikova *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003) 100(25): 15125-15130), un elemento IRES del virus de la fiebre aftosa (Ramesh *et al.*, *Nucl. Acid Res.* (1996) 24:2697-2700), un giardiavirus IRES (Garlapati *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2004) 279(5):3389-3397), y similares.

[0194] En algunas formas de realización, el IRES es una secuencia IRES del virus del síndrome de Taura, virus Triatoma, virus de la encefalomiocarditis de Theiler, virus de simio 40, virus Solenopsis invicta 1, virus Rhopalosiphum padi, virus de la reticuloendoteliosis, poliovirus humano 1, virus del intestino Plautia stali, Virus de la abeja de Cachemira, Rinovirus humano 2, Virus Homalodisca coagulata-1, Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, Virus Himetobi P, Virus de la hepatitis C, Virus de la hepatitis A, Virus de la hepatitis GB, Virus de la fiebre aftosa, Enterovirus humano 71, Virus de la rinitis equina, virus similar a Ectropis obliqua picorna, virus de la encefalomiocarditis, virus de Drosophila C, virus coxsackie humano B3, tobamovirus Crucifer, virus de la parálisis del grillo, virus de la diarrea viral bovina 1, virus de la célula reina negra, virus de la parálisis letal del pulgón, virus de la encefalomiocarditis aviar, virus de la parálisis aguda de las

abejas, Virus de la mancha anular clorótica del hibisco, Virus de la peste porcina clásica, FGF2 humano, SFTPA1 humano, AML1/RUNX1 humano, Antennapedia de Drosophila, AQP4 humano, AT1R humano, BAG-1 humano, BCL2 humano, BiP humano, c-IAPI humano, c- humano myc, eIF4G humano, NDST4L de ratón, LEF1 humano, HIF1 alfa de ratón, n.myc humano, Gtx de ratón, p27kipl humano, PDGF2/c-sis humano, p53 humano, Pim-1 humano, Rbm3 de ratón, Reaper de Drosophila, Scamper canino, Drosophila Ubx, UNR humano, UtrA de ratón, VEGF-A humano, XIAP humano, Drosophila sin pelo, S. cerevisiae TFIID, S. cerevisiae YAP1, virus del grabado del tabaco, virus del arrugado del nabo, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, Picobimavirus, HCV QC64, Cosavirus humano E/D, Cosavirus humano F, Cosavirus humano JMY, Rhinovirus NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, Salivirus A SH1, Salivirus FHB, Salivirus NG -J1, Parechovirus humano 1, Crohivirus B, Yc-3, Rosavirus M-7, Shanbavirus A, Pasivirus A, Pasivirus A 2, Echovirus E14, Parechovirus humano 5, Virus Aichi, Virus de la hepatitis A HA16, Phopivirus, CVA10, Enterovirus C, Enterovirus D, Enterovirus J, Pegivirus humano 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, Pegivirus A 1220, Pasivirus A 3, Sapelovirus, Rosavirus B, Virus Bakunsa, Tremovirus A, Pasivirus porcino 1, PLV -CHN, Pasivirus A, Sicinivirus, Hepacivirus K, Hepacivirus A, BVDV1, Virus de la enfermedad fronteriza, BVDV2, CSFV-PK15C, Dicistrovirus SF573, Virus tipo picorna de Hubei, CRPV, Salivirus A BN5, Salivirus A BN2, Salivirus A 02394, Salivirus A GUT, Salivirus A CH, Salivirus A SZ1, Salivirus FHB, CVB3, CVB1, Echovirus 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 o un aptámero de eIF4G.

[0195] En algunas formas de realización, los polinucleótidos del presente documento comprenden una secuencia de expresión. En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica una proteína terapéutica.

[0196] En algunas formas de realización, el ARN circular codifica dos o más polipéptidos. En algunas formas de realización, el ARN circular es un ARN bicistrónico. Las secuencias que codifican los dos o más polipéptidos pueden separarse mediante un elemento de salto ribosómico o una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de escisión de proteasa. En determinadas formas de realización, el elemento de omisión de ribosomas codifica el péptido 2A del virus asigna (T2A), el péptido 2A del virus de la fiebre aftosa (P2A), el péptido 2A del virus de la rinitis equina A (E2A), péptido vims 2A de poliedrosis citoplasmática (BmCPV 2A) o vims flacherie del péptido 2A de B. mori (BmIFV 2A).

[0197] En ciertas formas de realización, los vectores proporcionados en el presente documento comprenden una UTR 3'. En algunas formas de realización, la UTR 3' es de beta globina humana, alfa globina humana, xenopus beta globina, xenopus alfa globina, prolactina humana, GAP-43 humana, eEF1a humano, Tau humana, TNF α humano, virus del dengue, ARNm pequeño de hantavirus, ARNm pequeño de bunyavirus, virus del mosaico amarillo del nabo, virus de la hepatitis C, virus de la rubéola, virus del mosaico del tabaco, IL-8 humana, actina humana, GAPDH humana, tubulina humana, virus de la mancha anular clorótica del hibisco, virus de la hepatitis de la marmota, elemento regulado postraduccionalmente, virus sindbis, el virus del nabo arrugado, el virus del grabado del tabaco o el virus de la encefalitis equina venezolana.

[0198] En algunas formas de realización, los vectores proporcionados en el presente documento comprenden una UTR 5'. En algunas formas de realización, la 5' UTR es de beta globina humana, beta globina de Xenopus laevis, alfa globina humana, alfa globina de Xenopus laevis, virus de la rubéola, virus del mosaico del tabaco, Gtx de ratón, virus del dengue, proteína de choque térmico de 70 kDa, proteína 1A, alcohol de tabaco. deshidrogenasa, el virus del grabado del tabaco, el virus del arrugado del nabo o el adenovirus líder tripartito.

[0199] En algunas formas de realización, un vector proporcionado en el presente documento comprende una región poliA externa a los fragmentos de intrón del grupo I en 3' y/o 5'. En algunas formas de realización, la región poliA tiene al menos 15, 30 o 60 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, una o ambas regiones poliA tienen entre 15 y 50 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, una o ambas regiones poliA tienen de 20-25 nucleótidos de longitud. La secuencia poliA se elimina tras la circularización. Por tanto, se puede utilizar un oligonucleótido que se hibrida con la secuencia poliA, tal como un oligonucleótido de desoxitimina (oligo(dT)) conjugado a una superficie sólida (por ejemplo, una resina), para separar el ARN circular de su ARN precursor. También se pueden disponer otras secuencias en 5' con respecto al fragmento de intrón del grupo I en 3' o en 3' con respecto al fragmento de intrón del grupo I en 5' y de manera similar se puede usar una secuencia complementaria para la purificación de ARN circular.

[0200] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ADN (por ejemplo, vector), ARN lineal (por ejemplo, ARN precursor) y/o ARN circular proporcionado en el presente documento está entre 300 y 10000, 400 y 9000, 500 y 8000, 600 y 7000, 700 y 6000, 800 y 5000, 900 y 5000, 1000 y 5000, 1100 y 5000, 1200 y 5000, 1300 y 5000, 1400 y 5000, y/o 1500 y 5000 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, el polinucleótido tiene al menos 300 nt, 400 nt, 500 nt, 600 nt, 700 nt, 800 nt, 900 nt, 1000 nt, 1100 nt, 1200 nt, 1300 nt, 1400 nt, 1500 nt, 2000 nt., 2500 nt, 3000 nt, 3500 nt, 4000 nt, 4500 nt o 5000 nt de longitud. En algunas formas de realización, el polinucleótido no tiene más de 3000 nt, 3500 nt, 4000 nt, 4500 nt, 5000 nt, 6000 nt, 7000 nt, 8000 nt, 9000 nt o 10000 nt de longitud. En algunas formas de realización, la longitud de un polinucleótido de ADN, ARN lineal y/o ARN circular proporcionado en el presente documento es aproximadamente 300 nt, 400 nt, 500 nt, 600 nt, 700 nt, 800 nt, 900 nt, 1000 nt, 1100 nt, 1200 nt, 1300 nt, 1400 nt, 1500 nt, 2000 nt, 2500 nt, 3000 nt, 3500 nt, 4000 nt, 4500 nt, 5000 nt, 6000 nt, 7000 nt, 8000 nt, 9000 nt, o 10000 nt.

[0201] En algunas formas de realización, en el presente documento se proporciona un vector. En ciertas formas de realización, el vector comprende, en el siguiente orden, a) una región de homología 5', b) un fragmento de intrón del grupo I en 3', c) opcionalmente, una primera secuencia espaciadora, d) un IRES, e) una secuencia de expresión, f) opcionalmente, una segunda secuencia espaciadora, g) un fragmento de intrón del grupo I en 5', y h) una región de

homología en 3'. En algunas formas de realización, el vector comprende un promotor transcripcional aguas arriba de la región de homología 5'. En ciertas formas de realización, el ARN precursor comprende, en el siguiente orden, a) una secuencia poliA, b) un espaciador externo, c) un fragmento de intrón del grupo I en 3', d) una región formadora de dúplex, e) un espaciador interno, f) un IRES, g) una secuencia de expresión, h) un casete de codón de parada, i) opcionalmente, un espaciador interno, j) una región formadora de dúplex capaz de formar un dúplex con la región formadora de dúplex de d, k) un fragmento de intrón de grupo I en 5', l) un espaciador externo, y m) una secuencia poliA.

[0202] En algunas formas de realización, en el presente documento se proporciona un ARN precursor. En determinadas formas de realización, el ARN precursor es un ARN lineal producido mediante transcripción *in vitro* de un vector proporcionado en el presente documento. En algunas formas de realización, el ARN precursor comprende, en el siguiente orden, a) una región de homología 5', b) un fragmento de intrón del grupo I en 3', c) opcionalmente, una primera secuencia espaciadora, d) un IRES, e) una expresión secuencia, f) opcionalmente, una segunda secuencia espaciadora, g) un fragmento de intrón del grupo I en 5', y h) una región de homología en 3'. El ARN precursor puede estar sin modificar, parcialmente modificado o completamente modificado.

[0203] En determinadas formas de realización, en el presente documento se proporciona un ARN circular. En determinadas formas de realización, el ARN circular es un ARN circular producido por un vector proporcionado en el presente documento. En algunas formas de realización, el ARN circular es un ARN circular producido mediante la circularización de un ARN precursor proporcionado en el presente documento. En algunas formas de realización, el ARN circular comprende, en la siguiente secuencia, a) una primera secuencia espaciadora, b) un IRES, c) una secuencia de expresión y d) una segunda secuencia espaciadora. En algunas formas de realización, el ARN circular comprende además la parte del fragmento de intrón del grupo I en 3' que está en 3' del sitio de empalme 3'. En algunas formas de realización, el ARN circular comprende además la parte del fragmento de intrón del grupo I en 5' que está en 5' del sitio de empalme 5'. En algunas formas de realización, el ARN circular tiene un tamaño de al menos 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 o 4500 nucleótidos. El ARN circular puede estar sin modificar, parcialmente modificado o completamente modificado.

[0204] En algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento tiene una mayor estabilidad funcional que el ARNm que comprende la misma secuencia de expresión. En algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento tiene una mayor estabilidad funcional que el ARNm que comprende la misma secuencia de expresión, modificaciones de 5 molU, una UTR optimizada, una tapa y/o una cola poliA.

[0205] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular proporcionado en el presente documento tiene una vida media funcional de al menos 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 30 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas u 80 horas. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular proporcionado en el presente documento tiene una vida media funcional de 5-80, 10-70, 15-60 y/o 20-50 horas. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular proporcionado en el presente documento tiene una vida media funcional mayor que (por ejemplo, al menos 1,5 veces mayor que, al menos 2 veces mayor que) la de un polinucleótido de ARN lineal equivalente que codifica la misma proteína. En algunas formas de realización, la vida media funcional se puede evaluar mediante la detección de la síntesis de proteínas funcionales.

[0206] En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular proporcionado en el presente documento tiene una vida media de al menos 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 30 horas, 40 horas, 50 horas, 60 horas, 70 horas u 80 horas. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular proporcionado en el presente documento tiene una vida media de 5-80, 10-70, 15-60 y/o 20-50 horas. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular proporcionado en el presente documento tiene una vida media mayor que (por ejemplo, al menos 1,5 veces mayor que, al menos 2 veces mayor que) la de un polinucleótido de ARN lineal equivalente que codifica la misma proteína. En algunas formas de realización, el polinucleótido de ARN circular, o su composición farmacéutica, tiene una vida media funcional en una célula humana mayor o igual a la de un valor umbral predeterminado. En algunas formas de realización, la vida media funcional se determina mediante un ensayo de proteína funcional. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la vida media funcional se determina mediante un ensayo de luciferasa *in vitro*, en el que la actividad de la luciferasa de *Gaussia* (GLuc) se mide en el medio de células humanas (por ejemplo, HepG2) que expresan el polinucleótido de ARN circular cada 1, 2, 6, 12 o 24 horas durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 14 días. En otras formas de realización, la vida media funcional se determina mediante un ensayo *in vivo*, en el que los niveles de una proteína codificada por la secuencia de expresión del polinucleótido de ARN circular se miden en muestras de suero o tejido del paciente cada 1, 2, 6, 12 o 24 horas durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 14 días. En algunas formas de realización, el valor umbral predeterminado es la vida media funcional de un polinucleótido de ARN lineal de referencia que comprende la misma secuencia de expresión que el polinucleótido de ARN circular.

[0207] En algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento puede tener una mayor magnitud de expresión que el ARNm lineal equivalente, por ejemplo, una mayor magnitud de expresión 24 horas después de la administración de ARN a las células. En algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento tiene una magnitud de expresión mayor que el ARNm que comprende la misma secuencia de expresión, modificaciones de 5 molU, una UTR optimizada, una tapa y/o una cola poliA.

[0208] En algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento puede ser menos inmunogénico que un ARNm equivalente cuando se expone a un sistema inmunitario de un organismo o a un determinado tipo de célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento está asociado con la producción modulada de citocinas cuando se expone a un sistema inmunológico de un organismo o a un determinado tipo de célula inmunitaria. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento se asocia con una producción reducida de IFN-β1, RIG-I, IL-2, IL-6, IFNγ y/o TNFα cuando se expone a un sistema inmunológico de un organismo o un cierto tipo de célula inmune en comparación con el ARNm que comprende la misma secuencia de expresión. En algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento se asocia con menos inducción de transcripción de IFN-β1, RIG-I, IL-2, IL-6, IFNγ y/o TNFα cuando se expone a un sistema inmunológico de un organismo o un cierto tipo de célula inmune en comparación con el ARNm que comprende la misma secuencia de expresión. En algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento es menos inmunogénico que el ARNm que comprende la misma secuencia de expresión. En algunas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento es menos inmunogénico que el ARNm que comprende la misma secuencia de expresión, modificaciones de 5 molU, una UTR optimizada, una tapa y/o una cola polIA.

[0209] En ciertas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento puede transfectarse en una célula tal cual, o puede transfectarse en forma de vector de ADN y transcribirse en la célula. La transcripción de ARN circular a partir de un vector de ADN transfectado puede realizarse mediante polimerasas añadidas o polimerasas codificadas por ácidos nucleicos transfectados en la célula, o preferiblemente mediante polimerasas endógenas.

[0210] En ciertas formas de realización, un polinucleótido de ARN circular proporcionado en el presente documento comprende nucleótidos de ARN modificados y/o nucleósidos modificados. En algunas formas de realización, el nucleósido modificado es m⁵C (5-metilcitidina). En otra forma de realización, el nucleósido modificado es m⁵U (5-metiluridina). En otra forma de realización, el nucleósido modificado es m⁶A (N⁶-metiladenosina). En otra forma de realización, el nucleósido modificado es s²U (2-tiouridina). En otra forma de realización, el nucleósido modificado es Ψ (pseudouridina). En otra forma de realización, el nucleósido modificado es Um (2'-O-metiluridina). En otras formas de realización, el nucleósido modificado es m¹A (1-metiladenosina); m²A (2-metiladenosina); Am (2'-O-metiladenosina); ms² m⁶A (2-metil-N⁶-metiladenosina); i⁶A (N⁶-isopenteniladenosina); ms²i⁶A (2-metil-N⁶-isopenteniladenosina); io⁶A (N⁶-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); ms²io⁶A (2-metil-N⁶-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina); g⁶A (N⁶-glicinilcarbamoiladenosina); t⁶A (N⁶-treonilcarbamoiladenosina); ms²t⁶A (2-metil-N⁶-treonil carbamoiladenosina); m⁶t⁶A (N⁶-metil-N⁶-treonilcarbamoiladenosina); hn⁶A (N⁶-hidroxinorvalilcarbamoiladenosina); ms²hn⁶A (2-metil-N⁶-hidroxinorvalil carbamoiladenosina); Ar(p) (2'-O-ribosiladenosina (fosfato)); I (inosina); m¹I (1-metilinosina); m¹Im (1,2'-O-dimetilinosina); m³C (3-metilcitidina); Cm (2'-O-metilcitidina); s²C (2-tiocitidina); ac⁴C (N⁴-acetilcitidina); f⁵C (5-formilcitidina); m⁵Cm (5,2'-O-dimetilcitidina); ac⁴Cm (N⁴-acetil-2'-O-metilcitidina); k²C (lisidina); m¹G (1-metilguanosa); m²G (N²-metilguanosa); m⁷G (7-metilguanosa); Gm (2'-O-metilguanosa); m² 2G (N²,N²-dimetilguanosa); m²Gm (N²,2'-O-dimetilguanosa); m² 2Gm (N²,N²,2'-O-trimetilguanosa); Gr(p) (2'-O-ribosilguanosa (fosfato)); yW (wybutosina); ozyW (peroxywybutosina); OHyW (hidroxiwybutosina); OHyW* (hidroxiwybutosina submodificada); imG (wyosina); mimG (metilwyosina); Q (queuosina); oQ (epoxiqueuosina); galQ (galactosil-queuosina); manQ (manosil-queuosina); preQ₀ (7-ciano-7-desazaguanosina); preQ₁ (7-aminometil-7-desazaguanosina); G⁺ (arqueosina); D (dihidrouridina); m⁵Um (5,2'-O-dimetiluridina); s⁴U (4-tiouridina); m⁵s²U (5-metil-2-tiouridina); s²Um (2-tio-2'-O-metiluridina); acp³U (3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina); hoSU (5-hidroxiuridina); mo⁵U (5-metoxiuridina); cmo⁵U (ácido uridina 5-oxiacético); mcmo⁵U (éster metílico del ácido uridina 5-oxiacético); chm⁵U (5-(carboxihidroximetil)uridina); mchm⁵U (éster metílico de 5-(carboxihidroximetil)uridina); mcm⁵U (5-metoxycarbonilmetiluridina); mcm⁵Um (5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metiluridina); mcm⁵s²U (5-metoxycarbonilmetil-2-tiouridina); nm⁵S²U (5-aminometil-2-tiouridina); mnm⁵U (5-metilaminometiluridina); mnm⁵S²U (5-metilaminometil-2-tiouridina); mnm⁵se²U (5-metilaminometil-2-selenouridina); ncm⁵U (5-carbamoilmetiluridina); ncm⁵Um (5-carbamoilmetil-2'-O-metiluridina); cmnm⁵U (5-carboximetilaminometiluridina); cmnm⁵Um (5-carboximetilaminometil-2'-O-metiluridina); cmnm⁵S²U (5-carboximetilaminometil-2-tiouridina); m⁶ 2A (N⁶,N⁶-dimetiladenosina); Im (2'-O-metilinosina); m⁴C (N⁴-metilcitidina); m⁴Cm (N⁴,2'-O-dimetilcitidina); hm⁵C (5-hidroximetilcitidina); m³U (3-metiluridina); cm⁵U (5-carboximetiluridina); m⁶Am (N⁶,2'-O-dimetiladenosina); m⁶ 2Am (N⁶,N⁶,O-2'-trimetiladenosina); m²,7G (N²,7-dimetilguanosa); m²,2,7G (N²,N²,7-trimetilguanosa); m³Um (3,2'-O-dimetiluridina); m⁵D (5-metildihidrouridina); f⁵Cm (5-formil-2'-O-metilcitidina); m¹Gm (1,2'-O-dimetilguanosa); m¹Am (1,2'-O-dimetiladenosina); rm⁵U (5-aurinometiluridina); rm⁵s²U (5-aurinometil-2-tiouridina); imG-14 (4-desmetilwyosina); imG2 (isowyosina); o ac⁶A (N⁶-acetiladenosina).

[0211] En algunas formas de realización, el nucleósido modificado puede incluir un compuesto seleccionado del grupo de: piridin-4-ona ribonucleósido, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-aurinometiluridina, 1-aurinometil-pseudouridina, 5-aurinometil-2-tio-uridina, 1-aurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tiouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N⁴-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N⁴-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-

citidina, 2 -metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina, 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N⁶ -metiladenosina, N⁶-isopenteniladenosina, N⁶-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metiltio-N⁶-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N⁶-glicinilcarbamoiladenosina, N⁶-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N⁶-treonil carbamoiladenosina, N⁶,N⁶-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltioadenina, 2-metoxi-adenina, 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-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-tioguanosina. En otra forma de realización, las modificaciones se seleccionan independientemente del grupo que consiste en 5-metilcitosina, pseudouridina y 1-metilpseudouridina.

[0212] En algunas formas de realización, los ribonucleósidos modificados incluyen 5-metilcitidina, 5-metoxiuridina, 1-metilpseudouridina, N⁶-metiladenosina y/o pseudouridina. En algunas formas de realización, dichos nucleósidos modificados proporcionan estabilidad y resistencia adicionales a la activación inmune.

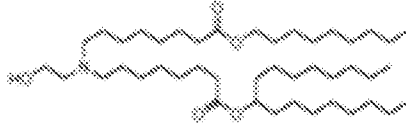
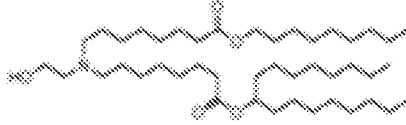
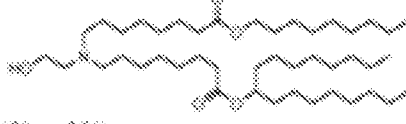
[0213] En formas de realización particulares, los polinucleótidos pueden optimizarse con codones. Una secuencia optimizada con codones puede ser aquella en la que los codones de un polinucleótido que codifica un polipéptido se han sustituido para aumentar la expresión, estabilidad y/o actividad del polipéptido. Los factores que influyen en la optimización de codones incluyen, entre otros, uno o más de: (i) variación de los sesgos de codones entre dos o más organismos o genes o tablas de sesgos construidas sintéticamente, (ii) variación en el grado de sesgo de codones dentro de un organismo, gen o conjunto de genes, (iii) variación sistemática de codones, incluido el contexto, (iv) variación de codones según sus ARNt decodificadores, (v) variación de codones según % de GC, ya sea en general o en una posición del triplete, (vi) variación en el grado de similitud con una secuencia de referencia, por ejemplo, una secuencia natural, (vii) variación en el corte de frecuencia de codones, (viii) propiedades estructurales de los ARNm transcritos a partir de la secuencia de ADN, (ix) conocimiento previo sobre la función de las secuencias de ADN en las que se basará el diseño del conjunto de sustitución de codones, y/o (x) variación sistemática de conjuntos de codones para cada aminoácido. En algunas formas de realización, un polinucleótido con codones optimizados puede minimizar las colisiones de ribozimas y/o limitar la interferencia estructural entre la secuencia de expresión y el IRES.

[0214] En ciertas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento se produce dentro de una célula. En algunas formas de realización, el ARN precursor se transcribe usando una plantilla de ADN (por ejemplo, en algunas formas de realización, usando un vector proporcionado en el presente documento) en el citoplasma mediante una ARN polimerasa de bacteriófago, o en el núcleo mediante la ARN polimerasa II del huésped y, a continuación, se circulariza.

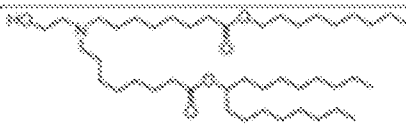
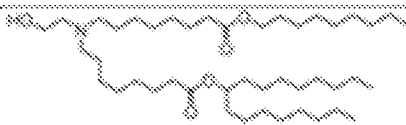
[0215] En ciertas formas de realización, el ARN circular proporcionado en el presente documento se inyecta en un animal (por ejemplo, un ser humano), de manera que un polipéptido codificado por la molécula de ARN circular se expresa dentro del animal.

3. Carga útil

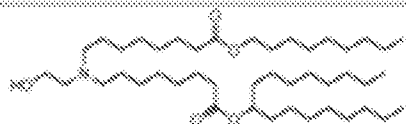
[0216] En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica una proteína terapéutica. En algunas formas de realización, la proteína terapéutica se selecciona de las proteínas enumeradas en la siguiente tabla.

Carga útil	Secuencia	Célula/órgano diana	Formulación de administración preferida
CD19 CAR	Cualquiera de las secuencias 309-314	Células T	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Beta-sitosterol (28.5% mol %) Colesterol (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
BCMA CAR	MALPVTALLPLALLHAARPDIV LTQSPASLAVSLGERATINCRASES VSVIGAHILHWWYQOKPGQPTKLLI YLASNLETGVPARFSGSGSGTDFT LTISSLOAEDAAPFYCLQSRIFPRIF GQGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGST KGQVQLVQSGSELKPKGASVKVS CKASGYTFDYSINWYRQAPGQG LEWMGWINTETREPAYAYDFRGR PVTSLDTSVSTAYLQHSLLKAEDTA VYYCARDYSYAMDYWGQGTLLV VSSAAATTPAPRPPTPAPTASQPL SLRPEACRPAAAGGAVHTRGLDFAC DIYTWAPLAGTGGVLLLSLVHLYC KRGKKLLYIFKQPFMRPVOTTOE EDGCSGRFEEEEGGCELRVKPSRS ADAPAYQGGQNGLYNELNLGRRE EYDVLDRGRDRPEMGCKPRKKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	Células T	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Beta-sitosterol (28.5% mol %) Colesterol (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
MAGE-A4 TCR	Cadena alfa TCR: KNQVEQSPQSLHLEGKNCITLQCNV TVSPFENLRWYKQDTGRGPVSLTI MTFSENTKSNGRYTATLDADTKQS SLHITASQLSDSASYICVYNHSGGS YIPTFGRGTSILVHPYIQKPPAPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV SQSKDSIVYITDKTVLDMRSMDIF KNSAVAWSNKSDAFACANAFNNSI IPEDTFYFSPSSS Cadena beta TCR: DVKVTQSSRYLVKRTGKVFLECV QDMDHENMPWYRQDPGLGLRLIY PSYDVKMKCEKGDPEGYVSREKK ERFSLILESASTNQTSMYLCASSFL MTSGDPYEQYFGPGTRLTYTEDLK NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFPYDHYELSWWVNGKEY HSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPKNHPRCQVQF YGLSENDEWTDRAKPVTVVSAE AWGRAD	Células T	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Beta-sitosterol (28.5% mol %) Colesterol (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
NY-ESO TCR	Secuencia extracelular alfa TCR MQEVTQIPAAALSVPEGENLVNCS FTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSL LIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSGRS TLVIAASQPGDSATYLCVAPRPTSG GSYIPTFGRGTSILVHPY	Células T	 (50 mol %)

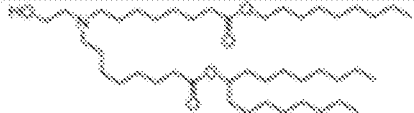
(continuación)

5	Secuencia extracelular beta TCR MGVTQTTPKFOVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDFGMGLRLI HYSVGAGITDQCEVPNGYNVSRST TEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSY VGNTGELFFGEGSRLTVL		DSPC (10 mol %) Beta-sitosterol (28.5% mol %) Colesterol (10 mol %) PEG-DMG (1.5 mol %)
10	EPO APPRLICDSRVLEHYLLEAKEAENI TTGCAEHCSLNENITVPDTKYNFY AWKRMEVGGQAVEVWQGLALLS EAVLRGQALLVNSSQFWFLQLH YDKAVSGLRLSLTTLRALGAQKEA ISPPDAASAAPLRTTADITRKLFR VYSNPLSGKLLKLYTGEACRTGER	Riñón or médula ósea	
15	PAH MSTAVLENPGLGRKLSDFGQETS IEDNCNQNGAISLIPSLKEEVGALA KVLRLFEENDVNLTHIESRPSRLAK DEYEFFTHLDKRSPLALTNIHILRH DIGATVHEL5RDKKKDTVPWFPR IQELDRFANQILSYGAELDADHPGF KDPVYRARRKQFADIAYNRYRHQ PIPRVEYMEEKKKTWGTVPKTLKS LYKTHIACYEYNHIFLLEKYCGFH EDNIPQLEDVSGFLQTCCTGFRLRPV AGLLSSRDFLGGLAFRVTHICTQYI RHGSKPMTYTPEDICHELLGHVPL FSRPSFAQFSQHEGLASLGAPDEYI EKLATIYWFVTEFGLCKQGDSEKA YGAGLLSSFGELQYCLSEKPKLLPL ELEKTAQNYTVTEFQPLYYVAESF NDAKEKYRNFAATIPRPFVRYDP YTQRIEVLONTQQLKILADSENSEI GILCSALQKIK	Células hepáticas	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Colesterol (28.5% mol %) PEG-DMG (1.5%) ○ MC3 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Colesterol (28.5% mol %) PEG-DMG (1.5%)
20			
25			
30			
35			
40	CPSI LSVKAQTABRYLEDGTKMKGYSF GHPSSVAGEVVFNTGLGGYPEAIT DPAYKGOILTMANPHGNGGAPDT TALDELGLSKYLESNGIKVSGLLV LDYSKDYNHNLATKSLGQWLQEE KVPATYGVDTYRMLTKHREDGTM GKIEFEGQPVDFVDPNQNIAEVS TKDVKYVGKGNPTKVVAVDCGK NNVIRLLVKRGAEVHLVPWNHDF TKMEYDGLIAGGPGNPALAEPLIQ NVRKILESDRKEPLFGISTGNLITGL AAGAKTYKMSMANRQGNQPVVNI TNKQAFITAQNHHGYALDNTLPAG WKPLFVNVNDQTNEGIMHIESKPF AVQFHPEVTPGPIDEYLFDSFSLJ KKGKATTTISVLPKPALVASRVEV SKVLILGSGGLSIGQAGEFDYSGSQ AVKAMKEENVKTVLMNPNIASVQ TNEVGLKQADTVYFLPITPQFVTE VIKAFQPDGLILGMGGQYALNCGV ELFKRGVLKEYGVKVLGTSVESIM ATEDRQLFSOKLNEINEKIAPSFAY ESIEDALKAADTIGYPVMIRSAYAL GGLGSGICPNRETLMDLSTKAFAM TNQILVEKSVTGWKEIEYEVVRDA DDNCVTVCNMENV DAMGVHTGD SVVYAPAQTLSNAEFOSLRRTSIN	Células hepáticas	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Colesterol (28.5% mol %) PEG-DMG (1.5%) ○ MC3 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Colesterol (28.5% mol %) PEG-DMG (1.5%)
45			
50			
55			
60			

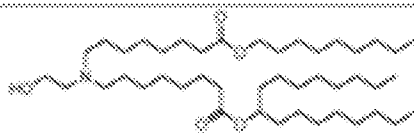
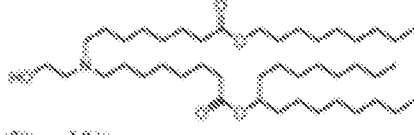
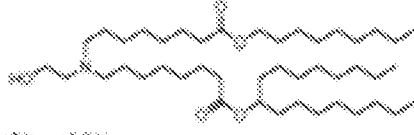
(continuación)

5	VVRHLGVGECNRQFALHPYSMEY CHEVNARLSRSSALASKATGYPLA FLAAKIALGHPLEIKNVVSGKTSAC FEPSLDYMVTKIPRWDLDRFHGTS SRIGSSMKSVGEVMAIGRTFEESFQ KALRMCHPSIEGFTTLPRLPMNKEWP SNLDLRKELSEPSSTRYIAIAKAIDQ 10 NMSLDIEKLTYIDKWFLYKMRDI LNMEKTLKGLNSESMTEETLKRA KEIGPSDKQISKCLGLTEAQTRER LKKNIHPWVKQIDTLAAEYPSVTN YL.YVTYNGQEHDVNFDDHGMIV 15 LGCGPYHIGSSVEFDWCAVSSIRTL RQKGGKTVVVCNPNPETVSTDFDEC DKLYFEELSLEHLDIYHQEACGGC HSVGGQHPNNLAVPLYKNGVKIMG TSPLQIDRAEDRSIFSAYLDELKVA 20 QAPWKAVENTLNEALEFAKSVDP CLLRPSYVLSGSAMNVVTSEDEMK KFLLEATRVSQEHPVVLTKFVEGA REVEMDAVGGKDGREVISHAISEHVE DAGVHSGDATLMLPTQTISQGAIE 25 KVEDATRKIAKAFASOPFNVQFL VKGNDVLVIECNLRASRSFPFVSK TLGVDFIDVATKVMIGENVDEKJHL PTLDHPIPADYVAIKAPMSWPRL RDADPILRCEMASTGEVACFGEGH 30 HTAFLKAMLSYGFKIPQKGLIGQ QSFPFRLQVAEQHINEGKLFAT EATSDWLNANNVPATPVAWTSQE GQNPSSLIRKLRDGSIDLVINLPN NNTKPVHDNYVIRRTAYDSGIPLL 35 TNFQVTKLFAEAVQKSRKVDSKSL FHYRQYSAGKAA		
40	Can9 MKRNYILGLDGHYSVGYGHIDYET RDVIDAGVRLFKEANVENNEGRBS KRGARRLKRRRRHRHQVYKLLFD YNLLTDHSELSCINPYEARVEGLS QKLSEETPSAALLHLAKRRGVHNV NEVEEDTGNELSTKEQSRNSKALE EKYVAELQLERLKKDGEVRGSINR FKTSDYVKEAKQLKVKQAYHQ 45 DQSFIDTYHDLLETNRITYYEGPGEQ SPFGWKDIKEWYEMLMQHCITYP EELRSVKYAYNADLYNALNDLNN LVTRDENEKLEYEKFQHEENVFK QKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYR VTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITAR KEHENAELLIDQIAKILTYQSSEDIQ EELTNLNSSELQEEIEQISNLKGYT GTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQ 50 IAFNBLKLVPKKVDLSCQKEPTT LVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIK KYGLPNDHIELAREKNSKDAQKMI NEMQKRNROTNERIEEIRTTGKEN AKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEA IPLEDLLNPPNYEVDHHPRSVSFO 55 NSFNNKVLVKQEENSKGNRTPTQ YLSSEDSKISVETFKKHILNLAKCK GRISKTKKEFYLLERDNRFSVOKD	Células inmunes	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Beta-sitosterol (28.5% mol %) Cholesterol (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)

(continuación)

5	FINRNLVDTRYATRGGLMNLRSYF RVNNLDVKVKSINGGFTSFLERKW KPKKERNKGYKHHAEADALHANAD FIFKEWKLDKAKKVMENQMFEE KQAESMPETEETEQEYKEFTTHQIK HIKDFKDYKYSHRYVDKKPNRELIN 10DTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLY DKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHH DPQTYOKLKLIMEQYGDENPLY KYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIK KIKYYGNKLNHLDDTDYFNSRN 15KVKLSLEPYRFDVYLDNGVYKF VTVKNLDVIKKENYVEVNSKCYE EAKKLKKSINQAEFIASFYNNDLIK INGELYRVIGVNNDLNRHEVNMID ITYREYLENMDKRPPIRIKTIASK 20TOSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHP QIKKG		
25	ADAMTS 13AAGGILHLELLVAVGPDVFGAHOE DTERYVLTNLNIGAELLRDPSLGA QFRVHLVKMVLTEPEGAPNITAN LTSSLLSVEGWSQTINPEDDITDPG HADLVLVITRFDLELPDGNRQVRG VTQLGGACSPWTSLITEDTGFDL GYTIAHEHGHSGLEHHDGAPGSGC GPSGHYMASDGAAPRAGLAWSPC 30SRBQLLSLSAGRARCVDWPPRPQ PGSAGHPDIAQPGGLYYSANEKCRV AFGPKAVACTFAREHLDMCQALS CHTDPLDQSSCSRLLVPLLDGTEC GVEKWCSSKGRCSLVELTPAAVH GRWSSWGPSPCSRSCGGGVYTR RRQCNNPRPAFGGRACVGDLOA EMCNTQACEKTOLEFMSQXCART DQGPLRSSPGIASFYHWGAAPPH 40SQGDALCRHMCRAIGESFIMERGQ SFLDGTRCMPGPRDGTLSLCVS GSCRTFGCTDGRMDSQVWDRCO VCGGDNSTCSPPKGSFTAGRAREY VTFLTVPNLTSVYIANHRPLFTHL AVRIGGRYVYAGKMSISPNTTYP 45LLEDGRVEYRVALTEDRELPRLEER IWGPLQEDADIQVYRRYGEEYGNL TRPDITFTYFQPKPRQAWVWAAV RGPCSVSCGAGLRWYNYSCLDQA RKELVETVQCQGSQOPPAWPEAC 50VLEPCPFYWAVGDFGPCSASCGGG LRERPVRCVEAQGSLLKTLPPARC RAGAQQPAVALETCPNPPPCPARW EVSEPSSCTSAAGAGLALNETCV PGADGLEAPVTEGPGSVDEKLPAP EPCVGMSCPPGFWGHLDATSAGEK 55APSPWGSIRTGAAAHVWTPAAG SCSVSCGRGLMELRFLCMDSALRV PVQEEELCGLASKPGSRREVCQAVP CPARWQYKLAACSYSQGGVVR ILYCARAHGEDDGEILLDTQCQG 60LPRPEPQEAACSLPCPPRWKVMSE GPCSASCGLGTARRSVACVQLDQ QOOVEVDEAACAALVRPEASVPC	Células hepáticas	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Cholesterol (38.9% mol %) PEG-DMG (1.5%) ○ MC3 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Cholesterol (38.9% mol %) PEG-DMG (1.5%)

(continuación)

5		LJADCTYRWHVGTWMECSVSCGD GQRRRDTCLGPAQAQAPVPADFQ HLPLCPVTVRGCWAGPCVGGGTPS LVPHEEAAAAPGRTTATPAGASLEW SQARGLLFSPAPQPRLLPGPQENS VQSSACGRQHLEPTGTIDMRGPGQ ADCAVAIGRPLGEVVTLRVLESSL NCSAGDMLLLWGRLTWRKMCRK LLDMTFSSKTNLTVVRQRCGRPGG GVLLRYGSQLAPETPYRECDMQLP GPWGEIVSPSLSPATSNAGCRLFI NVAPHARIAHALATNMGAGTEG ANASYILIKDTHSLRTTAFHQQQVL YWESESSQAEMEFSEGFLKAQASL RGQYWTLQSWVPENQDPQSWEG KEGT		
20	FOXP3	MPNPRPGKPSAPSLALGPSGASPS WRAAPKASDLLGAHGPGGTFQGR DLRGGAHASSSSLNPMPPSQQLP TLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALL QDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLUQ VHPLESPAMISLTPTTATGVFSLK ARPGLPQGINVASLEWVSREPALL CTFPNPSAPRKDSTLSAVPOSSYPL LANGVCKWPGCEKVFEEDFLK HCQADHLLDEKGRACQLQREMV QSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAG KMALTKASSVASSDKGCCIVAAG SQGPVVPFVWSGPPEAPDSLFAYRR HLWGSHGNSYFPEFLHNMIDYFKF HNMRPPTYATLIRWAILEAPEKQ RTLNEIYHWFTRMFAFFRNIPATW KNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAV WTYDELEFRKKRSORPSRCNPTP GP	Células inmunes	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Beta-sitosterol (28.5% mol %) Colesterol (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
40	IL-10	SPGQGTQSENSCTHFGNLPNMLR DLRDAFSEVKTYFQMKDQLDNLL LKESSLDFKGYLGQALSEMHOV YLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSL GENLKTLLRLRLRCHIFLPCENKS KAVEQVKNAFNKLQEKGYKAMS EFDIFINYIEAYMTMKIRN	Células inmunes	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Beta-sitosterol (28.5% mol %) Colesterol (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)
50	IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQML NGINNYKNPKLTRMLTFKPYMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVNL AQSKNFHLRPROLISNINIVLELK GSETTFMCEYADETATVEFLNRW ITFCQSIISTLT	Células inmunes	 (50 mol %) DSPC (10 mol %) Beta-sitosterol (28.5% mol %) Colesterol (10 mol %) PEG DMG (1.5 mol %)

60 **[0217]** En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica una proteína terapéutica. En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica una citocina, por ejemplo, IL-12p70, IL-15, IL-2, IL-18, IL-21, IFN- α , IFN- β , IL-10, TGF- β , IL-4, o IL-35, o un fragmento funcional de la misma. En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica un inhibidor del punto de control inmunológico. En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica un agonista (por ejemplo, un miembro de la familia TNFR tal como CD137L, OX40L, ICOSL, LIGHT o CD70). En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica un receptor de antígeno quimérico. En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica un agonista del receptor inhibidor (por ejemplo, PDL1,

PDL2, Galectina-9, VISTA, B7H4 o MHCII) o un receptor inhibidor (por ejemplo, PD1, CTLA4, TIGIT, LAG3 o TIM3). En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica un antagonista del receptor inhibidor. En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica una o más cadenas de TCR (cadenas alfa y beta o cadenas gamma y delta). En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica una célula T secretada o un acoplador de células inmunitarias (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico tal como BiTE, dirigido, por ejemplo, a CD3, CD137 o CD28 y una proteína expresada en tumor, por ejemplo, CD19, CD20, o BCMA, etc.). En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica un factor de transcripción (por ejemplo, *FOXP3*, *HELIOS*, *TOX1* o *TOX2*). En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica una enzima inmunosupresora (por ejemplo, IDO o CD39/CD73). En algunas formas de realización, la secuencia de expresión codifica una GvHD (por ejemplo, CAR-Tregs anti-HLA-A2).

[0218] En algunas formas de realización, un polinucleótido codifica una proteína que está formada por subunidades que están codificadas por más de un gen. Por ejemplo, la proteína puede ser un heterodímero, en el que cada cadena o subunidad de la proteína está codificada por un gen independiente. Es posible que se entregue más de una molécula de ARNcirc en el vehículo de transferencia y que cada ARNcirc codifique una subunidad separada de la proteína. Alternativamente, se puede diseñar un solo ARNcirc para codificar una subunidad. En determinadas formas de realización, se pueden administrar moléculas de ARNcirc separadas que codifican las subunidades individuales en vehículos de transferencia separados.

3.1 Citoquinas

[0219] Las descripciones y/o secuencias de aminoácidos de IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-27beta, IFNgamma y/o TGFbeta1 se proporcionan en el presente documento y en la base de datos www.uniprot.org con los números de acceso: P0568 (IL-2), P29459 (IL-12A), P29460 (IL-12B), P13232 (IL-7), P22301 (IL-10), P40933 (IL-15), Q14116 (IL-18), Q14213 (IL-27beta), P01579 (IFNgamma) y/o P01137 (TGFbeta1).

3.2 Antagonistas de PD-1 y PD-L1

[0220] En algunas formas de realización, un inhibidor de PD-1 es pembrolizumab, pidilizumab o nivolumab. En algunas formas de realización, Nivolumab se describe en el documento WO2006/121168. En algunas formas de realización, pembrolizumab se describe en el documento WO2009/114335. En algunas formas de realización, Pidilizumab se describe en el documento WO2009/101611. Se describen anticuerpos anti-PD1 adicionales en las patentes estadounidenses n° 8.609.089, US 2010028330, US 20120114649, WO2010/027827 y WO2011/066342.

[0221] En algunas formas de realización, un inhibidor de PD-L1 es atezolizumab, avelumab, durvalumab, BMS-936559 o CK-301.

[0222] Las descripciones y/o secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras de PD-1, y/o anticuerpos PD-L1 se proporcionan en el presente documento y en la base de datos www.drugbank.ca con los números de acceso: DB09037 (Pembrolizumab), DB09035 (Nivolumab), DB15383 (Pidilizumab), DB11595 (Atezolizumab), DB11945 (Avelumab) y DB11714 (Durvalumab).

3.3 Receptores de células T

[0223] Los TCR se describen utilizando la nomenclatura de TCR de International Immunogenetics (IMGT) y enlaces a la base de datos pública IMGT de secuencias de TCR. Los TCR heterodiméricos alfa-beta nativos tienen una cadena alfa y una cadena beta. En términos generales, cada cadena puede comprender regiones variables, de unión y constantes, y la cadena beta también suele contener una corta región de diversidad entre las regiones variable y de unión, pero esta región de diversidad a menudo se considera parte de la región de unión. Cada región variable puede comprender tres CDR (regiones determinantes de complementariedad) integradas en una secuencia marco, siendo una de ellas la región hipervariable denominada CDR3. Hay varios tipos de regiones variables de cadena alfa ($V\alpha$) y varios tipos de regiones variables de cadena beta ($V\beta$) que se distinguen por su estructura, secuencias CDR1 y CDR2, y por una secuencia CDR3 parcialmente definida. Los tipos $V\alpha$ se denominan en la nomenclatura IMGT mediante un número TRAV único. Así, "TRAV21" define una región $V\alpha$ de TCR que tiene una estructura única y secuencias CDR1 y CDR2, y una secuencia CDR3 que está definida en parte por una secuencia de aminoácidos que se conserva de TCR a TCR pero que también incluye una secuencia de aminoácidos que varía de TCR a TCR. De la misma manera, "TRBV5-1" define una región TCR $V\beta$ que tiene una estructura única y secuencias CDR1 y CDR2, pero con sólo una secuencia CDR3 parcialmente definida.

[0224] Las regiones de unión del TCR están definidas de manera similar por la nomenclatura única IMGT TRAJ y TRBJ, y las regiones constantes por la nomenclatura IMGT TRAC y TRBC.

[0225] La región de diversidad de cadena beta se denomina en la nomenclatura IMGT con la abreviatura TRBD y, como se mencionó, las regiones TRBD/TRBJ concatenadas a menudo se consideran juntas como la región de unión.

[0226] Las secuencias únicas definidas por la nomenclatura IMGT son ampliamente conocidas y accesibles para quienes trabajan en el campo de TCR. Por ejemplo, se pueden encontrar en la base de datos pública IMGT. El "T cell Receptor Factsbook", (2001) LeFranc y LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8 también describe secuencias

definidas por la nomenclatura IMGT, pero debido a su fecha de publicación y el consiguiente desfase temporal, la información contenida en ellas a veces necesita ser confirmada mediante referencia a la base de datos IMGT.

[0227] Los TCR nativos existen en formas heterodiméricas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Sin embargo, se ha demostrado previamente que los TCR recombinantes que consisten en homodímeros $\alpha\alpha$ o $\beta\beta$ se unen a moléculas peptídicas del MHC. Por lo tanto, el TCR de la invención puede ser un TCR $\alpha\beta$ heterodimérico o puede ser un TCR homodimérico $\alpha\alpha$ o $\beta\beta$.

[0228] Para su uso en terapia adoptiva, un TCR heterodimérico $\alpha\beta$ puede, por ejemplo, transfectarse como cadenas de longitud completa que tienen dominios tanto citoplasmáticos como transmembrana. En ciertas formas de realización, los TCR de la invención pueden tener un enlace disulfuro introducido entre residuos de los respectivos dominios constantes, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2006/000830.

[0229] Los TCR de la invención, particularmente los TCR heterodiméricos alfa-beta, pueden comprender una secuencia de dominio constante TRAC de cadena alfa y/o una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 de cadena beta. Las secuencias de los dominios constantes de las cadenas alfa y beta pueden modificarse mediante truncamiento o sustitución para eliminar el enlace disulfuro nativo entre Cys4 del exón 2 de TRAC y Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2. La(s) secuencia(s) del dominio constante de la cadena alfa y/o beta también pueden modificarse mediante sustitución de residuos de cisteína por Thr 48 de TRAC y Ser 57 de TRBC1 o TRBC2, formando dichas cisteínas un enlace disulfuro entre los dominios constantes alfa y beta del TCR.

[0230] La afinidad de unión (inversamente proporcional a la constante de equilibrio K_D) y la vida media de unión (expresada como $T_{1/2}$) se pueden determinar mediante cualquier método apropiado. Se apreciará que duplicar la afinidad de un TCR da como resultado reducir a la mitad el K_D . $T_{1/2}$ se calcula como $\ln 2$ dividido por la tasa de descuento (koff). Entonces, duplicar $T_{1/2}$ da como resultado una reducción a la mitad de koff. Los valores de K_D y koff para los TCR se miden habitualmente para las formas solubles del TCR, es decir, aquellas formas que se truncan para eliminar los residuos del dominio citoplasmático y transmembrana. Por lo tanto, debe entenderse que un TCR determinado tiene una afinidad de unión mejorada y/o una vida media de unión para el TCR parental si una forma soluble de ese TCR tiene dichas características. Preferiblemente, la afinidad de unión o la vida media de unión de un TCR determinado se mide varias veces, por ejemplo 3 o más veces, usando el mismo protocolo de ensayo, y se toma un promedio de los resultados.

[0231] La terapia adoptiva, la invención incluye una célula no natural y/o purificada y/o diseñada, especialmente una célula T, que presenta un TCR de la invención. Existen varios métodos adecuados para la transfección de células T con ácido nucleico (tal como ADN, ADNc o ARN) que codifica los TCR de la invención (véase, por ejemplo, Robbins et al., (2008) J Immunol. 180: 6116- 6131). Las células T que expresan los TCR de la invención serán adecuadas para su uso en el tratamiento basado en terapia adoptiva de cánceres tales como los de páncreas e hígado. Como sabrán los expertos en la técnica, existen varios métodos adecuados mediante los cuales se puede llevar a cabo la terapia adoptiva (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., (2008) Nat Rev Cancer 8(4): 299-308).

[0232] Como es bien conocido en la técnica, los TCR de la invención pueden estar sujetos a modificaciones postraduccionales cuando se expresan mediante células transfectadas. La glicosilación es una de esas modificaciones, que puede comprender la unión covalente de restos de oligosacáridos a aminoácidos definidos en la cadena de TCR. Por ejemplo, los residuos de asparagina o los residuos de serina/treonina son ubicaciones bien conocidas para la unión de oligosacáridos. El estado de glicosilación de una proteína particular depende de varios factores, incluida la secuencia de la proteína, la conformación de la proteína y la disponibilidad de ciertas enzimas. Además, el estado de glicosilación (es decir, tipo de oligosacárido, enlace covalente y número total de uniones) puede influir en la función de la proteína. Por lo tanto, cuando se producen proteínas recombinantes, a menudo es deseable controlar la glicosilación. La glicosilación de TCR transfectados puede controlarse mediante mutaciones del gen transfectado (Kuball J et al. (2009), J Exp Med 206(2):463-475). Tales mutaciones también están abarcadas en esta invención.

[0233] Un TCR puede ser específico para un antígeno en el grupo MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-A13, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (AGE-B4), tirosinasa, glucógeno fosforilasa cerebral, Melan-A, MAGE-C1, MAGE-C2, NY-ESO-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1, CT-7, alfaactinina-4, proteína de fusión Bcr-Abl, Casp-8, beta-catenina, cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, proteína de fusión dek-can, EF2, proteína de fusión ETV6-AML1, LDLR- Proteína de fusión fucosiltransferasaAS, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-2 y 3, neo-PAP, miosina clase I, OS-9, proteína de fusión pml-RARa, PTPRK, K-ras, N-ras, isómeros de trifosfato, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, Mage-C2, NA-88, Lage-2, SP17 y TRP2-Int2, (MART-I), gp100 (Pmel 17), TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, p15(58), CEA, NY-ESO (LAGE), SCP-1, Hom/Mel-40, p53, H-Ras, HER-2 /neu, BCR-ABL, E2APRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH), TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, beta.-Catenin, CDK4, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, PSCA, CT7, telomerasa, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, α -fetoproteína (AFP), 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29/BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB170K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2/proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

3.4 Factores de transcripción

[0234] Las células T reguladoras (Treg) son importantes para mantener la homeostasis, controlar la magnitud y duración de la respuesta inflamatoria y en la prevención de respuestas autoinmunes y alérgicas.

[0235] En general, se cree que las Treg participan principalmente en la supresión de las respuestas inmunitarias, funcionando en parte como un "autocontrol" del sistema inmunitario para prevenir reacciones excesivas. En particular, las Treg participan en el mantenimiento de la tolerancia a los autoantígenos, agentes inofensivos como el polen o los alimentos, y en la anulación de enfermedades autoinmunes.

[0236] Las Treg se encuentran en todo el cuerpo, incluidos, entre otros, el intestino, la piel, los pulmones y el hígado. Además, las células Treg también se pueden encontrar en ciertos compartimentos del cuerpo que no están directamente expuestos al ambiente externo, como el bazo, los ganglios linfáticos e incluso el tejido adiposo. Se sabe o se sospecha que cada una de estas poblaciones de células Treg tiene una o más características únicas y se puede encontrar información adicional en Lehtimäki y Laheesmaa, Las células T reguladoras controlan las respuestas inmunes a través de sus características específicas de tejido no redundantes, 2013, FRONTIERS IN IMMUNOL. 4(294): 1-10, cuya divulgación se incorpora aquí en su totalidad.

[0237] Normalmente, se sabe que las Treg requieren TGF- β e IL-2 para su activación y desarrollo adecuados. Las Treg, que expresan abundantes cantidades del receptor de IL-2 (IL-2R), dependen de la IL-2 producida por las células T activadas. Se sabe que las Treg producen tanto IL-10 como TGF- β , ambas citocinas inmunosupresoras potentes. Además, se sabe que las Treg inhiben la capacidad de las células presentadoras de antígenos (APC) para estimular las células T. Un mecanismo propuesto para la inhibición de APC es a través de CTLA-4, que se expresa por Foxp3⁺ Treg. Se cree que CTLA-4 puede unirse a las moléculas de B7 en las APC y bloquear estas moléculas o eliminarlas provocando una internalización que resulta en una disponibilidad reducida de B7 y una incapacidad para proporcionar una coestimulación adecuada para las respuestas inmunes. Se puede encontrar una discusión adicional sobre el origen, la diferenciación y la función de Treg en Dhamne et al., Células T reguladoras Peripheral and thymic Foxp3⁺ en busca de origen, distinción y función, 2013, Frontiers in Immunol., 4 (253): 1-11, cuya divulgación se incorpora por la presente en su totalidad.

[0238] Las descripciones y/o secuencias de aminoácidos de FOXP3, STAT5B y/o HELIOS se proporcionan en el presente documento y en la base de datos www.uniprot.org con los números de acceso: Q9BZS1 (FOXP3), P51692 (STAT5b) y/o Q9UKS7 (HELIOS).

Foxp3

[0239] En algunas formas de realización, un factor de transcripción es el factor de transcripción P3 de la caja Forkhead (Foxp3). Se ha demostrado que Foxp3 es un regulador clave en la diferenciación y actividad de Treg. De hecho, se ha demostrado que las mutaciones de pérdida de función en el gen Foxp3 conducen al letal síndrome IPEX (desregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía, ligada al cromosoma X). Los pacientes con IPEX sufren de respuestas autoinmunes graves, eccema persistente y colitis. Las células T reguladoras (Treg) que expresan Foxp3 desempeñan un papel clave en la limitación de las respuestas inflamatorias en el intestino (Josefowicz, SZ et al. Nature, 2012, 482, 395-U1510). STAT

[0240] Los miembros de la familia de proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT) son factores de transcripción intracelular que median en muchos aspectos de la inmunidad celular, la proliferación, la apoptosis y la diferenciación. Son activados principalmente por Janus quinasas asociadas a receptores de membrana (JAK). La desregulación de esta vía se observa con frecuencia en tumores primarios y conduce a un aumento de la angiogénesis, una mayor supervivencia de los tumores y una inmunosupresión. Los estudios de eliminación genética han proporcionado evidencia de que las proteínas STAT están involucradas en el desarrollo y la función del sistema inmunológico y desempeñan un papel en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la vigilancia tumoral.

[0241] Hay siete miembros de la familia STAT de mamíferos que se han identificado: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 (incluidos STAT5A y STAT5B) y STAT6.

[0242] La unión extracelular de citocinas o factores de crecimiento induce la activación de Janus quinasas asociadas a receptores, que fosforilan un residuo de tirosina específico dentro de la proteína STAT promoviendo la dimerización a través de sus dominios SH2. A continuación, el dímero fosforilado se transporta activamente al núcleo a través de un complejo ternario importina α/β . Originalmente, las proteínas STAT se describieron como factores de transcripción citoplasmáticos latentes, ya que se pensaba que la fosforilación era necesaria para la retención nuclear. Sin embargo, las proteínas STAT no fosforiladas también se desplazan entre el citosol y el núcleo y desempeñan un papel en la expresión genética. Una vez que STAT llega al núcleo, se une a un motivo de consenso de reconocimiento de ADN llamado sitios activados gamma (GAS) en la región promotora de genes inducibles por citoquinas y activa la transcripción. La proteína STAT puede ser desfosforilada por fosfatasa nucleares, lo que conduce a la inactivación de STAT y su posterior transporte fuera del núcleo mediante un complejo exportina-RanGTP.

[0243] En algunas formas de realización, una proteína STAT de la presente divulgación puede ser una proteína STAT que comprende una modificación que modula su nivel de expresión o actividad. En algunas formas de realización, tales modificaciones incluyen, entre otras cosas, mutaciones que afectan la dimerización de STAT, la unión de la proteína STAT a parejas de señalización, la localización de la proteína STAT o la degradación de la proteína STAT. En algunas formas de realización, una proteína STAT de la presente divulgación es constitutivamente activa. En algunas formas de realización, una proteína STAT de la presente divulgación es constitutivamente activa debido a la dimerización constitutiva. En algunas formas de realización, una proteína STAT de la presente divulgación es constitutivamente activa debido a la fosforilación constitutiva como se describe en Onishi, M. et al., Mol. Cell. Biol. Julio de 1998 vol. 18 núm. 7 3871-3879, cuya totalidad se incorpora aquí como referencia.

3.5 Receptores de antígenos quiméricos

[0244] Los receptores de antígenos quiméricos (CAR o CAR-T) son receptores diseñados genéticamente. Estos receptores diseñados pueden insertarse y expresarse en células inmunitarias, incluidas las células T, a través de ARN circular como se describe en el presente documento. Con un CAR, se puede programar un solo receptor para reconocer un antígeno específico y, cuando se une a ese antígeno, activar la célula inmune para atacar y destruir la célula que porta ese antígeno. Cuando estos antígenos existen en las células tumorales, una célula inmunitaria que expresa el CAR puede atacar y destruir la célula tumoral. En algunas formas de realización, el CAR codificado por el polinucleótido comprende (i) una molécula de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno diana, (ii) un dominio bisagra, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, y (iii) un dominio activador.

[0245] En algunas formas de realización, una orientación de los CAR de acuerdo con la divulgación comprende un dominio de unión a antígeno (tal como un scFv) en conjunto con un dominio coestimulador y un dominio activador. El dominio coestimulador puede comprender uno o más de una parte extracelular, una parte transmembrana y una parte intracelular. En otras formas de realización, se pueden utilizar múltiples dominios coestimuladores en conjunto.

Dominio de unión a antígeno

[0246] Los CAR pueden diseñarse para unirse a un antígeno (tal como un antígeno de superficie celular) incorporando una molécula de unión a antígeno que interactúa con ese antígeno objetivo. En algunas formas de realización, la molécula de unión al antígeno es un fragmento de anticuerpo de la misma, por ejemplo, uno o más fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv). Un scFv es un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla que tiene las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo unidas entre sí. Véanse las patentes de EE. UU. N^{os} 7.741.465 y 6.319.494 así como Eshhar et al., Cancer Immunol Immunotherapy (1997) 45: 131-136. Un scFv conserva la capacidad del anticuerpo original para interactuar específicamente con el antígeno diana. Los scFv son útiles en receptores de antígenos quiméricos porque pueden diseñarse para expresarse como parte de una cadena única junto con los otros componentes del CAR. *Identificación.* Véase también Krause et al., J. Exp. Med., Volumen 188, N^o 4, 1998 (619-626); Finney et al., Journal of Immunology, 1998, 161: 2791-2797. Se apreciará que la molécula de unión al antígeno normalmente está contenida dentro de la parte extracelular del CAR de manera que sea capaz de reconocer y unirse al antígeno de interés. Los CAR biespecíficos y multispecíficos se contemplan dentro del alcance de la invención, con especificidad para más de un objetivo de interés.

[0247] En algunas formas de realización, la molécula de unión a antígeno comprende una cadena única, en la que la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están conectadas por un conector. En algunas formas de realización, el VH está ubicado en el extremo N del conector y el VL está ubicado en el extremo C del conector. En otras formas de realización, la VL está ubicada en el extremo N del conector y la VH está ubicada en el extremo C del conector. En algunas formas de realización, el conector comprende al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 13, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 18, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90 o al menos aproximadamente 100 aminoácidos.

[0248] En algunas formas de realización, la molécula de unión a antígeno comprende un nanocuerpo. En algunas formas de realización, la molécula de unión a antígeno comprende una DARPIn. En algunas formas de realización, la molécula de unión a antígeno comprende una anticлина u otra proteína sintética capaz de unirse específicamente a la proteína diana.

[0249] En algunas formas de realización, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno seleccionado del grupo CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, molécula-1 similar a lectina de tipo C, CD33, crecimiento epidérmico, variante del receptor del factor III (EGFRvIII), gangliósido G2 (GD2), gangliósido GD3, maduración de células B del miembro de la familia del receptor de TNF (BCMA), antígeno Tn (Tn Ag) o (GalNAca-Ser/Thr), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), tirosina quinasa 3 similar a Fms (FLT3), glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), CD38, CD44v6, antígeno carcinoembrionario (CEA), molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM), B7H3 (CD276), KIT (CD117), subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13, mesotelina, receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra), antígeno de células madre de próstata (PSCA),

proteasa serina 21, factor de crecimiento endotelial vascular receptor 2 (VEGFR2), antígeno de Lewis (Y), CD24, receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta), antígeno embrionario 4 específico de la etapa (SSEA-4), CD20, receptor alfa de folato, HER2, HER3, Mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), molécula de adhesión de células neurales (NCAM), prostasa, fosfatasa ácida prostática (PAP), factor de elongación 2 mutado (ELF2M), efrina B2, proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP), receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (receptor IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX), subunidad del proteasoma (prosome, macropaina), tipo beta, 9 (LMP2), glicoproteína 100 (gp100), proteína de fusión de oncogén que consta de una región de grupo de punto de ruptura (BCR) y un homólogo 1 del oncogén viral de la leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl), tirosinasa, receptor 2 de efrina tipo A (EphA2), fucosil GM1, molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe), gangliósido GM3, transglutaminasa 5 (TGSS), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2), receptor de folato beta, marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248), marcador endotelial tumoral 7 relacionado (TEM7R), claudina 6 (CLDN6), receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR), receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPCSD), marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61), CD97, CD179a, linfoma quinasas anaplásico (ALK), ácido polisialico, específico de placenta 1 (PLAC1), parte hexasacárido de glicoceramida globoH (GloboH), antígeno de diferenciación de glándula mamaria (NY-BR-1), uroplaquina 2 (UPK2), receptor celular de virus de hepatitis A 1 (HAVCR1), adrenoceptor beta 3 (ADRB3), panexina 3 (PANX3), receptor acoplado a proteína G 20 (GPR20), complejo de antígeno linfocitario 6, locus K 9 (LY6K), receptor olfativo 51E2 (OR51E2), Proteína del marco de lectura alternativo TCR gamma (TARP), proteína del tumor de Wilms (WT1), antígeno 1 de cáncer/testículo (NY-ESO-1), antígeno 2 de cáncer/testículo (LAGE-1a), miembros de la familia MAGE (incluido MAGE-A1, MAGE-A3 y MAGE-A4), gen variante de translocación 6 de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML), proteína de esperma 17 (SPA17), familia de antígenos X, miembro 1A (XAGE1), receptor 2 de superficie celular de unión a angiopoyetina (Empate 2), antígeno 1 del cáncer de melanoma testicular (MAD-CT-1), antígeno 2 del cáncer de melanoma testicular (MAD-CT-2), antígeno 1 relacionado con Fos, proteína tumoral p53 (p53), mutante p53, proteina, sobreviviente, telomerasa, antígeno 1 del tumor del carcinoma de próstata, antígeno de melanoma reconocido por las células T 1, mutante del sarcoma de rata (Ras), transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), puntos de interrupción de la translocación del sarcoma, inhibidor de la apoptosis del melanoma (MLIAP), ERG (transmembrana) proteasa, serina 2 (TMPRSS2) gen de fusión ETS, N-acetil glucosaminil-transferasa V (NA17), proteína de caja emparejada Pax-3 (PAX3), receptor de andrógenos, ciclina B1, homólogo derivado de neuroblastoma del oncogén viral de mielocitomatosis aviar v-myc (MYCN), miembro C de la familia homóloga de Ras (RhoC), proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2), citocromo P450 1B 1 (CYP1B1), antígeno de carcinoma de células escamosas similar al factor de unión a CCCTC (proteína de dedos de zinc) reconocido por células T 3 (SART3), proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5), proteína de unión a proacrosina sp32 (OYTES1), proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK), proteína de anclaje de quinasa A 4 (AKAP-4), sarcoma sinovial, punto de ruptura X 2 (SSX2), receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE-1), renal ubicuo 1 (RU1), renal ubicuo 2 (RU2), leguminosa, virus del papiloma humano E6 (VPH E6), virus del papiloma humano E7 (VPH E7), carboxil esterasa intestinal, proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2), CD79a, CD79b, CD72, receptor tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos 1 (LAIR1), fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89), inmunoglobulina leucocitaria- miembro 2 de la subfamilia A del receptor similar (LILRA2), miembro f de la familia similar a la molécula CD300 (CD300LF), miembro A de la familia 12 del dominio de lectina tipo C (CLEC12A), antígeno 2 de células estromales de la médula ósea (BST2), que contiene módulo similar a EGF receptor de hormona similar a mucina tipo 2 (EMR2), antígeno de linfocitos 75 (LY75), glipican-3 (GPC3), receptor de Fc tipo 5 (FCRL5), MUC16, ST4, 8H9, integrina $\alpha v \beta 8$, integrina $\alpha v \beta 6$, alfafetoproteína (AFP), B7-H6, ca-125, CA9, CD44, CD44v7/8, CD52, E-cadherina, EMA (antígeno de membrana epitelial), glicoproteína epitelial-2 (EGP-2), glicoproteína epitelial-40 (EGP -40), ErbB4, antígeno de tumor epitelial (ETA), proteína de unión a folato (FBP), receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR), cadena ligera k, molécula de adhesión de células L1, MUC18, NKG2D, antígeno oncofetal (h5T4), tumor/ antígeno testicular 1B, GAGE, GAGE-1, BAGE, SCP-1, CTZ9, SAGE, CAGE, CT10, MART-1, polipéptido similar a lambda de inmunoglobulina 1 (IGLL1), proteína de unión al antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), viral antígeno de la cápside (VCA), antígeno temprano (EA), antígeno nuclear de EBV (EBNA), antígeno temprano de HHV-6 p41, antígeno latente de HHV-6B U94, antígeno tardío de HHV-6B p98, antígeno de citomegalovirus (CMV), antígeno T grande, Antígeno T pequeño, antígeno de adenovirus, antígeno del virus respiratorio sincitial (VRS), hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), antígeno de parainfluenza tipo 1, antígeno de parainfluenza tipo 2, antígeno de parainfluenza tipo 3, antígeno de parainfluenza tipo 4, metapneumovirus humano (HMPV) antígeno, antígeno central del virus de la hepatitis C (VHC), antígeno p24 del VIH, antígeno del virus linfotrófico de células T humanas (HTLV-1), antígeno T pequeño del virus del polio de células de Merkel, antígeno T grande del virus del polio de células de Merkel, virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) antígeno nuclear lítico y antígeno nuclear latente de KSHV. En algunas formas de realización, un dominio de unión a antígeno comprende SEQ ID NO: 321 y/o 322.

Dominio de bisagra/espaciador

[0250] En algunas formas de realización, un CAR de la presente divulgación comprende un dominio de bisagra o espaciador. En algunas formas de realización, el dominio bisagra/espaciador puede comprender un dominio bisagra/espaciador (THD) truncado; el dominio THD es una versión truncada de un dominio bisagra/espaciador completo ("CHD"). En algunas formas de realización, un dominio extracelular es o deriva de (por ejemplo, comprende todo o un fragmento de) ErbB2, glicoforina A (GpA), CD2, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD4, CD7, CD8a, CD8[T CDI la (IT GAL), CDI lb (IT GAM), CDI lc (ITGAX), CDI ld (IT GAD), CD18 (ITGB2), CD19 (B4), CD27 (TNFRSF7), CD28, CD28T, CD29 (ITGB1), CD30 (TNFRSF8), CD40 (TNFRSF5), CD48 (SLAMF2), CD49a (ITGA1), CD49d (ITGA4), CD49f (ITGA6), CD66a (CEACAM1), CD66b (CEACAM8), CD66c (CEACAM6), CD66d (CEACAM3), CD66e (CEACAM5), CD69 (CLEC2),

CD79A (cadena alfa asociada al complejo del receptor de antígeno de células B), CD79B (cadena beta asociada al complejo del receptor de antígeno de células B), CD84 (SLAMF5), CD96 (táctil), CD100 (SEMA4D), CD103 (ITGAE), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD158A (KIR2DL1), CD158B1 (KIR2DL2), CD158B2 (KIR2DL3), CD158C (KIR3DP1), CD158D (KIRDL4), CD158F1 (KIR2DL5A), CD158F2 (KIR2DL5B), CD158K (KIR3DL2), CD160 (BY55), CD162 (SELPLG), CD226 (DNAM1), CD229 (SLAMF3), CD244 (SLAMF4), CD247 (CD3-zeta), CD258 (LUZ), CD268 (BAFFR), CD270 (TNFSF14), CD272 (BTLA), CD276 (B7-H3), CD279 (PD-1), CD314 (NKG2D), CD319 (SLAMF7), CD335 (NK-p46), CD336 (NK-p44), CD337 (NK-p30), CD352 (SLAMF6), CD353 (SLAMF8), CD355 (CRT AM), CD357 (TNFRSF18), coestimulador de células T inducible (ICOS), LFA-1 (CD11a /CD18), NKG2C, DAP-10, ICAM-1, NKp80 (KLRF1), IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, LFA-1, SLAMF9, LAT, GADS (GrpL), SLP-76 (LCP2), PAG1/CBP, un ligando CD83, receptor Fc gamma, molécula MHC clase 1, molécula MHC clase 2, una proteína receptora de TNF, una proteína inmunoglobulina, un receptor de citoquinas, una integrina, que activa los receptores de células NK, un receptor de ligando Toll, y fragmentos o combinaciones de los mismos. Un dominio bisagra o espaciador puede derivarse de una fuente natural o sintética.

[0251] En algunas formas de realización, un dominio bisagra o espaciador se coloca entre una molécula de unión a antígeno (por ejemplo, un scFv) y un dominio transmembrana. En esta orientación, el dominio bisagra/espaciador proporciona distancia entre la molécula de unión al antígeno y la superficie de una membrana celular en la que se expresa el CAR. En algunas formas de realización, un dominio bisagra o espaciador proviene de una inmunoglobulina o deriva de ella. En algunas formas de realización, un dominio bisagra o espaciador se selecciona de las regiones bisagra/espaciador de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM o un fragmento de los mismos. En algunas formas de realización, un dominio bisagra o espaciador comprende, es de o se deriva de la región bisagra/espaciador de CD8 alfa. En algunas formas de realización, un dominio bisagra o espaciador comprende, es de o se deriva de la región bisagra/espaciador de CD28. En algunas formas de realización, un dominio bisagra o espaciador comprende un fragmento de la región bisagra/espaciador de CD8 alfa o un fragmento de la región bisagra/espaciador de CD28, en donde el fragmento es cualquier cosa menos que toda la región bisagra/espaciador. En algunas formas de realización, el fragmento de la región bisagra/espaciador CD8 alfa o el fragmento de la región bisagra/espaciador CD28 comprende una secuencia de aminoácidos que excluye al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos en el extremo N o extremo C, o ambos, de la región bisagra/espaciador alfa de CD8, o de la región espaciadora/bisagra de CD28.

Dominio transmembrana

[0252] CAR de la presente divulgación puede comprender además un dominio transmembrana y/o un dominio de señalización intracelular. El dominio transmembrana puede diseñarse para fusionarse con el dominio extracelular del CAR. De manera similar, puede fusionarse con el dominio intracelular del CAR. En algunas formas de realización, se usa el dominio transmembrana que está asociado naturalmente con uno de los dominios en un CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse (por ejemplo, mediante una sustitución de aminoácidos) para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las mismas o diferentes proteínas de membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor. El dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína transmembrana o unida a membrana.

[0253] Las regiones de transmembrana pueden derivarse de (es decir, comprender) un receptor tirosina quinasa (por ejemplo, ErbB2), glicoforina A (GpA), 4-1BB/CD137, receptores activadores de células NK, una proteína de inmunoglobulina, B7-H3, BAFFR, BFAME (SEAMF8), BTEA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 delta, CD3 epsilon, CD3 gamma, CD30, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD7, CD84, CD8alpha, CD8beta, CD96 (táctil), CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDS, CEACAM1, CRT AM, receptor de citoquinas, DAP-10, DNAM1 (CD226), receptor Fc gamma, GADS, GITR, HVEM (EIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, Ig alfa (CD79a), IE-2R beta, IE-2R gamma, IE-7R alfa, coestimulador inducible de células T (ICOS), integrinas, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAE, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, EAT, LFA-1, LFA-1, a ligando que se une específicamente con CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1; CD11a/CD18), molécula MHC clase 1, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, muerte programada-1 (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Lyl08), SLAMF7, SLP-76, proteínas receptoras de TNF, TNFR2, TNFSF14, un receptor de ligando Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 o VLA-6, o un fragmento, truncamiento o una combinación de los mismos.

[0254] En algunas formas de realización, el dominio de señalización intracelular adecuado incluye, entre otros, la activación de receptores de macrófagos/células mieloides CSFR1, MYD88, CD14, TIE2, TLR4, CR3, CD64, TREM2, DAP10, DAP12, CD169, Dectin1, CD206, CD47, CD163, CD36, MARCO, TIM4, MERTK, F4/80, CD91, C1QR, LOX-1, CD68, SRA, BAI-1, ABCA7, CD36, CD31, Lactoferrina, o un fragmento, truncamiento o combinación de los mismos.

[0255] En algunas formas de realización, un receptor tirosina quinasa puede derivarse de (por ejemplo, comprender) receptor de insulina (InsR), receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF1R), receptor relacionado con el receptor de insulina (IRR), receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRa), receptor beta del

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR β). Tirosina quinasa del receptor del protooncogén KIT (Kit), receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSFR), tirosina quinasa 3 relacionada con fms (FLT3), tirosina quinasa 1 relacionada con fms (VEGFR-1), receptor de dominio de inserción de quinasa (VEGFR-2), tirosina quinasa 4 relacionada con fms (VEGFR-3), receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1), receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2), receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), receptor 4 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR4), proteína tirosina quinasa 7 (CCK4), receptor neurotrófico tirosina quinasa 1 (trkA), receptor neurotrófico tirosina quinasa 2 (trkB), receptor neurotrófico tirosina quinasa 3 (trkC), receptor tirosina quinasa similar al receptor huérfano 1 (ROR1), receptor tirosina quinasa similar al receptor huérfano 2 (ROR2), receptor tirosina quinasa asociado al músculo (MuSK), protooncogén MET, receptor tirosina quinasa (MET), receptor estimulante de macrófagos 1 (Ron), receptor tirosina quinasa AXL (Axl), proteína tirosina quinasa TYR03 (Tyr03), protooncogén MER, tirosina quinasa (Mer), tirosina quinasa con dominios 1 similares a inmunoglobulina y similar a EGF (TIE1), tirosina quinasa del receptor TEK (TIE2), receptor A1 de EPH (EphA1), receptor A2 de EPH (EphA2), (receptor A3 de EPH) EphA3, receptor de EPH A4 (EphA4), receptor de EPH A5 (EphA5), receptor de EPH A6 (EphA6), receptor de EPH A7 (EphA7), receptor de EPH A8 (EphA8), receptor de EPH A10 (EphA10), receptor de EPH B1 (EphB1), receptor B2 de EPH (EphB2), receptor B3 de EPH (EphB3), receptor B4 de EPH (EphB4), receptor EPH B6 (EphB6), protooncogén ret (Ret), tirosina quinasa similar al receptor (RYK), receptor tirosina quinasa 1 del dominio discoidina (DDR1), receptor tirosina quinasa 2 del dominio discoidina (DDR2), oncogén c-ros 1, receptor tirosina quinasa (ROS), tirosina quinasa asociada a apoptosis (Lmr1), tirosina quinasa 2 de lémur (Lmr2), tirosina quinasa 3 de lémur (Lmr3), tirosina quinasa receptora de leucocitos (LTK), tirosina quinasa receptora de ALK (ALK) o serina/treonina/ tirosina quinasa 1 (STYK1).

Dominio coestimulador

[0256] En ciertas formas de realización, el CAR comprende un dominio coestimulador. En algunas formas de realización, el dominio coestimulador comprende 4-1BB (CD137), CD28 o ambos, y/o un dominio de señalización de células T intracelulares. En una forma de realización preferida, el dominio coestimulador es CD28 humano, 4-1BB humano o ambos, y el dominio de señalización de células T intracelular es CD3 zeta (ζ) humano. 4-1BB, CD28, CD3 zeta pueden comprender menos que el 4-1BB, CD28 o CD3 zeta completo, respectivamente. Los receptores de antígenos quiméricos pueden incorporar dominios coestimuladores (señalizadores) para aumentar su potencia. Véanse las patentes estadounidenses números 7.741.465 y 6.319.494, así como Krause *et al.* y Finney *et al.* (*supra*), Song *et al.*, Blood 119:696-706 (2012); Kalos *et al.*, Sci Transl. Med. 3:95 (2011); Porter *et al.*, N. Engl. J. Med. 365:725-33 (2011), y Gross *et al.*, Amur. Rev. Farmacol. Toxicol. 56:59-83 (2016).

[0257] En algunas formas de realización, un dominio coestimulador comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 318 o 320.

Dominio de señalización intracelular

[0258] El dominio intracelular (señalización) de las células T diseñadas descritas en el presente documento puede proporcionar señalización a un dominio activador, que luego activa al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o una actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas.

[0259] En algunas formas de realización, el dominio de señalización intracelular adecuado incluye (por ejemplo, comprensión), pero no se limitan a 4-1BB/CD137, activando receptores de células NK, una proteína de inmunoglobulina, B7-H3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD 19a, CD2, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD30, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD7, CD84, CD8alfa, CD8beta, CD96 (táctil), CD1 la, CD1 lb, CD1 lc, CD1 ld, CDS, CEACAM1, CRT AM, receptor de citoquinas, DAP-10, DNAM1 (CD226), receptor Fc gamma, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, Ig alfa (CD79a), IL-2R beta, IL-2R gamma, IL-7R alfa, coestimulador de células T inducible (ICOS), integrinas, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, ligando que se une específicamente con CD83, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), Ly108, Antígeno asociado a la función de los linfocitos-1 (LFA-1; CD11a/CD18), molécula MHC clase 1, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, muerte programada. 1 (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A), SLAMF7, SLP-76, proteínas receptoras de TNF, TNFR2, TNFSF14, un receptor de ligando Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 o VLA-6, o un fragmento, truncamiento o una combinación de los mismos.

[0260] CD3 es un elemento del receptor de células T en células T nativas, y se ha demostrado que es un elemento activador intracelular importante en los CAR. En algunas formas de realización, el CD3 es CD3 zeta. En algunas formas de realización, el dominio activador comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntico a la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 319.

3.6 Proteínas de unión a antígenos triespecíficas y proteínas de unión a antígenos biespecíficas

[0261] En este documento se describen polipéptidos de ARN circular que codifican proteínas de unión a antígeno triespecíficas (TRITE), proteínas de unión a antígeno biespecíficas (BITE), fragmentos funcionales de las mismas y composiciones farmacéuticas de las mismas. También se proporcionan en el presente documento vectores de expresión recombinantes útiles para producir ARN circular que codifica proteínas de unión a antígeno triespecíficas o proteínas de unión a antígeno biespecíficas, y células que comprenden el ARN circular de la invención. También se proporcionan métodos para usar las proteínas de unión a antígeno triespecíficas o las proteínas de unión a antígeno biespecíficas descritas en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos hepáticos. Las proteínas de unión a antígeno triespecíficas son capaces de unirse específicamente a un antígeno diana, por ejemplo, un antígeno canceroso, así como a CD3, TCR, CD16A o NKp46, y un dominio de retención en el hígado o un dominio de extensión de vida media, tal como un dominio de unión a la albúmina sérica humana (HSA). En algunas formas de realización, TRITE o BITE se crea dentro del hígado de un paciente después de la administración de una composición que comprende los polipéptidos de ARN circular de la invención a un paciente que los necesita.

[0262] En un aspecto, las proteínas de unión a antígeno triespecíficas comprenden un dominio (A) que se une específicamente a CD3, TCR, CD16A o NKp46, un dominio (B) que se une específicamente a una molécula de extensión de vida media o una proteína de retención hepática, molécula, y un dominio (C) que se une específicamente a un antígeno diana, por ejemplo, un antígeno de célula cancerosa. Los tres dominios de las proteínas de unión a antígenos triespecíficas pueden disponerse en cualquier orden. Por lo tanto, se contempla que el orden de dominio de las proteínas de unión a antígeno triespecíficas sea cualquiera de los siguientes órdenes: (A)-(B)-(C), (A)-(C)-(B), (B)-(A)-(C), (B)-(C)-(A), (C)-(B)-(A), o (C)-(A)-(B).

[0263] En algunas formas de realización, las proteínas de unión a antígeno triespecíficas tienen un orden de dominio de (A)-(B)-(C). En algunas formas de realización, las proteínas de unión a antígeno triespecíficas tienen un orden de dominio de (A)-(C)-(B). En algunas formas de realización, las proteínas de unión a antígeno triespecíficas tienen un orden de dominio de (B)-(A)-(C). En algunas formas de realización, las proteínas de unión a antígeno triespecíficas tienen un orden de dominio de (B)-(C)-(A). En algunas formas de realización, las proteínas de unión a antígeno triespecíficas tienen un orden de dominio de (C)-(B)-(A). En algunas formas de realización, las proteínas de unión a antígeno triespecíficas tienen un orden de dominio de (C)-(A)-(B).

[0264] En una forma de realización, una proteína de unión a antígeno biespecífica comprende un dominio (A) que se une específicamente a CD3, TCR, CD16A o NKp46, y un dominio (B) que se une específicamente a un antígeno diana. Los dos dominios de una proteína de unión a antígeno biespecífica están dispuestos en cualquier orden. Por tanto, se contempla que el orden de los dominios de las proteínas de unión a antígeno biespecíficas puede ser: (A)-(B) o (B)-(A).

[0265] Las proteínas de unión a antígeno triespecíficas o las proteínas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento están diseñadas para permitir el direccionamiento específico de células que expresan un antígeno diana mediante el reclutamiento de células T citotóxicas o células NK. Esto mejora la eficacia en comparación con la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos), que utiliza anticuerpos de longitud completa dirigidos a un único antígeno y no es capaz de reclutar directamente células T citotóxicas. Por el contrario, al involucrar moléculas CD3 expresadas específicamente en estas células, las proteínas de unión a antígeno triespecíficas o las proteínas de unión a antígeno biespecíficas pueden entrecruzar células T citotóxicas o células NK con células que expresan un antígeno diana de una manera altamente específica, dirigiendo así el potencial citotóxico de la célula T o célula NK reclutada hacia la célula diana. Las proteínas de unión a antígeno triespecíficas o las proteínas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento interactúan con las células T citotóxicas mediante la unión a las proteínas CD3 expresadas en la superficie, que forman parte del TCR, o CD16A o NKp46, que activa las células NK. La unión simultánea de varias proteínas de unión a antígeno triespecíficas o proteínas de unión a antígeno biespecíficas a CD3 y a un antígeno diana expresado en la superficie de células particulares provoca la activación de células T y media la lisis posterior de la célula que expresa el antígeno diana particular. Por lo tanto, se contempla que las proteínas de unión a antígeno triespecíficas o biespecíficas de unión a antígeno muestren una destrucción de células diana fuerte, específica y eficiente. En algunas formas de realización, las proteínas de unión a antígeno triespecíficas o las proteínas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento estimulan la destrucción de células diana mediante células T citotóxicas para eliminar células patógenas (por ejemplo, células tumorales, células infectadas por virus o bacterias, células T autorreactivas, etc.). En algunas formas de realización, las células se eliminan selectivamente, reduciendo así el potencial de efectos secundarios tóxicos. En algunas formas de realización, se utilizan dominios de unión anti-41bb o CD137 como acopladores de células T.

Dominio de unión a células inmunes

[0266] La especificidad de la respuesta de las células T está mediada por el reconocimiento del antígeno (mostrado en el contexto de un complejo principal de histocompatibilidad, MHC) por el TCR. Como parte del TCR, CD3 es un complejo proteico que incluye una cadena CD3 γ (gamma), una cadena CD3 δ (delta) y dos cadenas CD3 ϵ (épsilon) que están presentes en la superficie celular. CD3 se asocia con las cadenas α (alfa) y β (beta) del TCR, así como con CD3 ζ (zeta) en conjunto para formar el TCR completo. La agrupación de CD3 en células T, como por ejemplo mediante anticuerpos

anti-CD3 inmovilizados, conduce a una activación de células T similar a la participación del receptor de células T pero independiente de su especificidad típica del clon.

[0267] En un aspecto, las proteínas biespecíficas y trispecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio que se une específicamente a CD3. En un aspecto, las proteínas trispecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio que se une específicamente a CD3 humano. En algunas formas de realización, las proteínas trispecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio que se une específicamente a CD3 γ . En algunas formas de realización, las proteínas trispecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio que se une específicamente a CD3 δ . En algunas formas de realización, las proteínas trispecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio que se une específicamente a CD3 ϵ .

[0268] En formas de realización adicionales, las proteínas trispecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio que se une específicamente al TCR. En ciertos casos, las proteínas trispecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio que se une específicamente a la cadena α del TCR. En ciertos casos, las proteínas trispecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio que se une específicamente a la cadena β del TCR.

[0269] En algunas formas de realización, una proteína de unión a antígeno trispecífica o una proteína de unión a antígeno biespecífica comprende un aglutinante específico de NKp46. En algunas formas de realización, una proteína de unión a antígeno trispecífica o una proteína de unión a antígeno biespecífica comprende un aglutinante específico de CD16A.

[0270] En algunas formas de realización, el dominio de unión a CD3, TCR, NKp46 o CD16A de la proteína de unión a antígeno puede ser cualquier dominio que se una a CD3, TCR, NKp46 o CD16A, incluidos, entre otros, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado. En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a CD3, TCR, NKp46 o CD16A derive de la misma especie en la que finalmente se usará la proteína de unión a antígeno trispecífica. Por ejemplo, para su uso en humanos, puede ser beneficioso para que el dominio de unión a CD3, TCR, NKp46 o CD16A de la proteína de unión a antígeno trispecífica comprenda residuos humanos o humanizados del dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

[0271] Así, en un aspecto, el dominio de unión a antígeno comprende un anticuerpo humanizado o humano o un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo murino o fragmento de anticuerpo. En una forma de realización, el dominio de unión anti-CD3, TCR, NKp46 o CD16A humanizado o humano comprende una o más (por ejemplo, las tres) regiones determinantes complementarias de cadena ligera 1 (LC CDR1), región determinante complementaria de cadena ligera 2 (LC CDR2), y región determinante complementaria de cadena ligera 3 (LC CDR3) de un dominio de unión anti-CD3, TCR, NKp46 o CD16A humanizado o humano descrito en el presente documento, y/o una o más (por ejemplo, las tres) regiones determinantes complementarias de cadena pesada 1 (HC CDR1), región determinante complementaria de cadena pesada 2 (HC CDR2) y región determinante complementaria de cadena pesada 3 (HC CDR3) de un dominio de unión anti-CD3, TCR, NKp46 o CD16A humanizado o humano descrito en el presente documento, por ejemplo, un dominio de unión anti-CD3, TCR, NKp46 o CD16A humanizado o humano que comprende una o más, por ejemplo, las tres, CDR de LC y una o más, por ejemplo, las tres, CDR de HC.

[0272] En algunas formas de realización, el dominio de unión anti-CD3, TCR, NKp46 o CD16A humanizado o humano comprende una región variable de cadena pesada humanizada o humana específica de CD3, TCR, NKp46 o CD16A donde la región variable de cadena pesada específica de CD3, TCR, NKp46 o CD16A comprenden CDR de cadena pesada humana o no humana en una región estructural de cadena pesada humana.

[0273] En ciertos casos, las regiones determinantes complementarias de la cadena pesada y/o la cadena ligera se derivan de anticuerpos anti-CD3 conocidos, tales como, por ejemplo, muromonab-CD3 (OKT3), oteixizumab (TRX4), teplizumab (MGA031), visilizumab (Nuvion), SP34, TR-66 o X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCHT-1 y WT-31.

[0274] En algunas formas de realización, un dominio de unión anti-NKp46 comprende un anticuerpo o fragmento del mismo descrito en la solicitud de patente estadounidense 16/451051. En algunas formas de realización, un dominio de unión anti-NKp46 comprende los anticuerpos BAB281, 9E2, 195314 o un fragmento de los mismos.

[0275] En una forma de realización, el dominio de unión anti-CD3, TCR, NKp46 o CD16A es un fragmento variable de cadena única (scFv) que comprende una cadena ligera y una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos proporcionada en el presente documento. En una forma de realización, el dominio de unión anti-CD3, TCR, NKp46 o CD16A comprende: una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera proporcionada en el presente documento, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos proporcionada en el presente documento; y/o una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

una, dos o tres modificaciones (por ejemplo, sustituciones) pero no más de 30, 20 o 10 modificaciones (por ejemplo, sustituciones) de una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada. región variable de cadena proporcionada en el presente documento, o una secuencia con 95-99 % de identidad con una secuencia de aminoácidos proporcionada en el presente documento. En una forma de realización, el dominio de unión anti-CD3 humanizado o humano es un scFv, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, se une a una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento, a través de un enlazador de scFv. La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un scFv pueden estar, por ejemplo, en cualquiera de las siguientes orientaciones: región variable de cadena ligera-enlazador de scFv-región variable de cadena pesada o región variable de cadena pesada-enlazador de scFv-región variable de cadena ligera.

[0276] En algunas formas de realización, el dominio de unión de CD3, TCR, NKP46 o CD16A de la proteína de unión a antígeno trispecífico tiene una afinidad a CD3, TCR, NKP46 o CD16A en células que expresan CD3, TCR, NKP46 o CD16A de la proteína de unión a antígeno trispecífica tiene afinidad por CD3, TCR, NKP46 o CD16A en células que expresan CD3, TCR, NKP46 o CD16A con una K_D de 1000 nM o menos, 500 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 80 nM o menos, 50 nM o menos, 20 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM o menos, o 0,5 nM o menos. En algunas formas de realización, el dominio de unión a CD3 de la proteína de unión a antígeno trispecífica de MSLN tiene una afinidad por CD3 ϵ , y o δ con una K_D de 1000 nM o menos, 500 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 80 nM o menos, 50 nM o menos, 20 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM o menos, o 0,5 nM o menos. En formas de realización adicionales, el dominio de unión a CD3, TCR, NKP46 o CD16A de la proteína de unión a antígeno trispecífica tiene baja afinidad por CD3, TCR, NKP46 o CD16A, es decir, aproximadamente 100 nM o más.

[0277] La afinidad para unirse a CD3, TCR, NKP46 o CD16A se puede determinar, por ejemplo, mediante la capacidad de la propia proteína de unión a antígeno trispecífica o su dominio de unión a CD3, TCR, NKP46 o CD16A para unirse a CD3, TCR, NKP46 o CD16A recubiertos sobre una placa de ensayo; exhibido en una superficie celular microbiana; en solución; etc. La actividad de unión de la propia proteína de unión a antígeno trispecífica o su dominio de unión a CD3, TCR, NKP46 o CD16A de la presente divulgación a CD3, TCR, NKP46 o CD16A se puede analizar inmovilizando el ligando (por ejemplo, CD3, TCR, NKP46 o CD16A) o la propia proteína de unión a antígeno trispecífica o su dominio de unión CD3, TCR, NKP46 o CD16A, a una perla, sustrato, célula, etc. Los agentes se pueden agregar en un tampón apropiado y las parejas de unión incubado durante un período de tiempo a una temperatura determinada. Después de los lavados para eliminar el material no unido, la proteína unida puede liberarse con, por ejemplo, SDS, tampones con un pH alto y similares y analizarse, por ejemplo, mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR).

[0278] En algunas formas de realización, una proteína de unión a antígeno biespecífica o una proteína de unión a antígeno biespecífica comprende un dominio de unión a TCR. En algunas formas de realización, un dominio de unión a TCR es un antígeno viral o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, un antígeno viral es de las familias: Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, como VIH-LP; Picomaviridae (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); Calciviridae (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviviridae (p. ej., virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus del Ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la influenza); Bunyaviridae (por ejemplo, virus Hantaan, virus bunya, flebovirus y virus Nairo); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Bornaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes; Poxviridae (virus variola, virus vaccinia, virus de la viruela); e Iridoviridae (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), la hepatitis C; Norwalk y virus relacionados, y astrovirus).

Enlazadores

[0279] En las proteínas trispecíficas descritas en el presente documento, los dominios están unidos mediante conectores internos L1 y L2, donde L1 une el primer y segundo dominio de las proteínas trispecíficas y L2 une el segundo y tercer dominios de las proteínas trispecíficas. En algunas formas de realización, los conectores L1 y L2 tienen una longitud y/o composición de aminoácidos optimizada. En algunas formas de realización, los conectores L1 y L2 tienen la misma longitud y composición de aminoácidos. En otras formas de realización, L1 y L2 son diferentes. En determinadas formas de realización, los conectores internos L1 y/o L2 constan de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de aminoácidos. Así, en ciertos casos, los conectores internos constan de aproximadamente 12 o menos residuos de aminoácidos. En el caso de 0 residuos de aminoácidos, el conector interno es un enlace peptídico. En determinadas formas de realización, los conectores internos L1 y/o L2 constan de 15, 20 o 25 residuos de aminoácidos. En algunas formas de realización, estos conectores internos constan de aproximadamente 3 a aproximadamente 15, por ejemplo 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos contiguos. En cuanto a la composición de aminoácidos de los conectores internos L1 y L2, se seleccionan péptidos con propiedades que confieren flexibilidad a las proteínas trispecíficas, no interfieren con los dominios de unión y resisten la escisión de las proteasas. Por ejemplo, los residuos de glicina y serina generalmente

proporcionan resistencia a las proteasas. Ejemplos de conectores internos adecuados para unir los dominios en las proteínas trispecíficas incluyen, entre otros, (GS)_n, (GGS)_n, (GGGS)_n, (GGSG)_n, (GGSGG)_n, (GGGGS)_n, (GGGGG)_n, o (GGG)_n, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una forma de realización, el conector interno L1 y/o L2 es (GGGGS)₄ o (GGGGS)₃.

Dominio de extensión de vida media

[0280] En el presente documento se contemplan dominios que extienden la vida media de un dominio de unión a antígeno. Se contempla que dichos dominios incluyan, entre otros, dominios de unión a albúmina, dominios Fc, moléculas pequeñas y otros dominios de extensión de vida media conocidos en la técnica.

[0281] La albúmina humana (ALB) es la proteína más abundante en el plasma, está presente en aproximadamente 50 mg/ml y tiene una vida media de aproximadamente 20 días en humanos. ALB sirve para mantener el pH plasmático, contribuye a la presión arterial coloidal, funciona como transportador de muchos metabolitos y ácidos grasos y actúa como una importante proteína transportadora de fármacos en el plasma.

[0282] La asociación no covalente con albúmina prolonga el tiempo medio de eliminación de proteínas de vida corta.

[0283] En un aspecto, las proteínas trispecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio de extensión de vida media, por ejemplo un dominio que se une específicamente a ALB. En algunas formas de realización, el dominio de unión a ALB de una proteína de unión a antígeno trispecífica puede ser cualquier dominio que se une a ALB, incluidos, entre otros, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado. En algunas formas de realización, el dominio de unión a ALB es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo de dominio único tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de camélido. anticuerpo, péptido, ligando o entidad de molécula pequeña de dominio único derivado específico para HSA. En determinadas formas de realización, el dominio de unión a ALB es un anticuerpo de dominio único. En otras formas de realización, el dominio de unión a HSA es un péptido. En formas de realización adicionales, el dominio de unión a HSA es una molécula pequeña. Se contempla que el dominio de unión a HSA de la proteína de unión a antígeno trispecífica de MSLN es bastante pequeño y no más de 25 kD, no más de 20 kD, no más de 15 kD o no más de 10 kD en algunas formas de realización. En ciertos casos, la unión de ALB es de 5 kD o menos si se trata de una entidad peptídica o de molécula pequeña.

[0284] El dominio de extensión de la vida media de una proteína de unión a antígeno trispecífica proporciona farmacodinámica alterada y farmacocinética de la trispecífica proteína de unión a antígeno en sí. Como se indicó anteriormente, el dominio de extensión de la vida media extiende el tiempo medio de eliminación. El dominio de extensión de la vida media también altera las propiedades farmacodinámicas, incluida la alteración de la distribución tisular, la penetración y la difusión de la proteína trispecífica de unión al antígeno. En algunas formas de realización, el dominio de extensión de la vida media proporciona una mejor dirección al tejido (incluido el tumor), distribución en el tejido, penetración en el tejido, difusión dentro del tejido y eficacia mejorada en comparación con una proteína sin un dominio de extensión de la vida media. En una forma de realización, los métodos terapéuticos utilizan eficaz y eficientemente una cantidad reducida de la proteína de unión a antígeno trispecífica, lo que da como resultado efectos secundarios reducidos, tales como citotoxicidad reducida de células no tumorales.

[0285] Además, la afinidad de unión del dominio de extensión de la vida media se puede seleccionar para apuntar a una vida media de eliminación específica en una proteína de unión a antígeno trispecífica particular. Por tanto, en algunas formas de realización, el dominio de extensión de la vida media tiene una alta afinidad vinculante. En otras formas de realización, el dominio de extensión de la vida media tiene una afinidad de unión media. Aún en otras formas de realización, el dominio de extensión de la vida media tiene una afinidad de unión baja o marginal. Las afinidades de unión ejemplares incluyen concentraciones de K_D a 10 nM o menos (alta), entre 10 nM y 100 nM (media) y superiores a 100 nM (baja). Como anteriormente, las afinidades de unión a ALB se determinan mediante métodos conocidos tales como resonancia de plasmón superficial (SPR).

Dominio de retención del hígado

[0286] En el presente documento se contemplan dominios que permiten y promueven una mayor retención de la proteína trispecífica de unión a antígeno dentro del hígado. El dominio de retención hepática de la proteína trispecífica de unión a antígeno está dirigido a un resto de células hepáticas. En una forma de realización, una célula hepática incluye, entre otros, un hepatocito, una célula estrellada hepática o una célula endotelial sinusoidal.

[0287] En una forma de realización, una célula hepática contiene un receptor que se une a un resto dirigido al hígado. En una forma de realización, el resto dirigido al hígado incluye, entre otros, lactosa, cloruro cianúrico, celobiosa, poliisina, poliarginina, manosa-6-fosfato, PDGF, albúmina sérica humana, galactósido, galactosamina, ácido linoleico, apolioproteína A-1, acetil CKNEKKNIERNKQPP-amida, glicirricina, ácido lactobiónico, manosa-BSA, BSA, poli-ACO-HAS, péptido KLGR, ácido hialurónico, IFN-alfa, péptido cRGD, 6-fosfato-HSA, retinol, lactobiotina, galactósido, pululano, soja esteroglucósido, asialoorosomucoide, ácido glicirretínico/glicirricina, ácido linoleico, AMD3100, ácido hialurónico escindible-ácido glicirretínico, lipoproteína derivada pre-S 1 del virus de la hepatitis B, Apo-A1 o LDL. En una

forma de realización, el receptor de células hepáticas incluye, entre otros, receptor de galactosa, receptor de manosa, receptor depurador, receptor de lipoproteínas de baja densidad, HARE, CD44, receptor de IFN α , receptor de colágeno tipo VI, receptor tipo 2 de factor de crecimiento 6-fosfato/insulina, receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor RBP, receptor de integrina $\alpha\beta 3$, receptor ASGP, receptor de ácido glicirretínico/glicirricina, PPAR, receptor de glicosaminoglicano sulfato de heparán, receptor de tipo 4 CXC, receptor de ácido glicirretínico, receptor HBVP, receptor de HDL, receptor depurador de clase B, miembro 1, receptor de LDL o combinación de los mismos.

Dominio de unión al antígeno diana

[0288] Las proteínas de unión a antígeno triespecíficas y las proteínas de unión a antígeno biespecíficas descritas en el presente documento comprenden un dominio que se une a un antígeno diana. Un antígeno diana está implicado y/o asociado con una enfermedad, trastorno o afección, por ejemplo, cáncer. En algunas formas de realización, un antígeno diana es un antígeno tumoral. En algunas formas de realización, el antígeno diana es NY-ESO-1, SSX-2, Sp 17, AFP, Glypican-3, Gpa33, Anexina-A2, WT1, PSMA, Midkine, PRAME, Survivin, MUC-1. P53, CEA, RAS, Hsp70, Hsp27, antígeno de carcinoma de células escamosas (SCCA), GP73, TAG-72 o una proteína de la familia MAGE.

[0289] En algunas formas de realización, un antígeno diana es uno que se encuentra en una célula tumoral no hepática que ha hecho metástasis en el hígado. En algunas formas de realización, una proteína de unión a antígeno biespecífica o una proteína de unión a antígeno triespecífica comprende un dominio de unión a antígeno diana específico para el grupo CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, molécula-1 similar a lectina de tipo C, CD33, variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII), gangliósido G2 (GD2), gangliósido GD3, maduración de células B del miembro de la familia del receptor de TNF (BCMA), antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAc-Ser/Thr)), específico de la próstata antígeno de membrana (PSMA), receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), tirosina quinasa 3 similar a Fms (FLT3), glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), CD38, CD44v6, antígeno carcinoembrionario (CEA), molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM), B7H3 (CD276), KIT (CD117), subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13, mesotelina, receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra), antígeno de células madre de próstata (PSCA), proteasa serina 21, factor de crecimiento endotelial vascular receptor 2 (VEGFR2), antígeno de Lewis (Y), CD24, receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta), antígeno embrionario 4 específico de la etapa (SSEA-4), CD20, receptor alfa de folato, HER2, HER3, Mucina 1, (MUC1) asociada a la superficie celular, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), molécula de adhesión de células neurales (NCAM), prostasa, fosfatasa ácida prostática (PAP), factor de elongación 2 mutado (ELF2M), efrina B2, proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP), receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (receptor IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX), subunidad del proteasoma (prosome, macropaina), tipo beta, 9 (LMP2), glicoproteína 100 (gp100), proteína de fusión de oncogén que consta de una región de grupo de punto de ruptura (BCR) y un homólogo 1 del oncogén viral de la leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl), tirosinasa, receptor 2 de efrina tipo A (EphA2), fucosil GM1, molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe), gangliósido GM3, transglutaminasa 5 (TGSS), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMVMAA), gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2), receptor beta de folato, marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/CD248), marcador endotelial tumoral 7 relacionado (TEM7R), claudina 6 (CLDN6), claudina 18.2 (CLDN18.2), receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR), receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRCSD), marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61), CD97, o CD179a. En algunas formas de realización, un antígeno diana es un antígeno asociado con una enfermedad viral, por ejemplo, un antígeno viral. En algunas formas de realización, un antígeno diana es un antígeno de hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D o hepatitis E.

[0290] El diseño de las proteínas de unión a antígeno triespecíficas descritas en el presente documento permite que el dominio de unión a un antígeno diana hepático sea flexible en el sentido de que el dominio de unión a un antígeno diana hepático puede ser cualquier tipo de dominio de unión, incluyendo, entre otros, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado. En algunas formas de realización, el dominio de unión a un antígeno diana hepático es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo de dominio único tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de anticuerpo de dominio único derivado de camélido. En otras formas de realización, el dominio de unión a un antígeno diana hepático es un dominio de unión que no es de Ig, es decir, mimético de anticuerpo, tal como anticálidas, aflinas, moléculas de aficuerpos, afimeros, afitinas, alfacuerpos, avimeros, DARPs, finomeros, péptidos de dominio kunitz y monocuerpos. En formas de realización adicionales, el dominio de unión a un antígeno diana hepático es un ligando o péptido que se une o se asocia con un antígeno diana.

3.7 HAP

[0291] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos y composiciones para administrar ARNcirc que codifica HAP a un sujeto para el tratamiento de la fenilcetonuria (PKU). Un ARNcirc de HAP adecuado codifica cualquier longitud completa, fragmento o parte de una proteína de HAP que puede sustituir la actividad de la proteína de HAP de origen natural y/o reducir la intensidad, gravedad y/o frecuencia de uno o más síntomas asociados con PKU.

[0292] En algunas formas de realización, una secuencia de ARN adecuada para la presente invención comprende una secuencia de ARN circular que codifica la proteína HAP humana.

[0293] En algunas formas de realización, una secuencia de ARN adecuada puede ser una secuencia de ARN que codifica un homólogo o un análogo de la HAP humana. Como se usa en el presente documento, un homólogo o un análogo de la proteína HAP humana puede ser una proteína HAP humana modificada que contiene una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con una proteína HAP humana de tipo salvaje o de origen natural mientras conserva actividad sustancial de la proteína HAP.

[0294] La presente invención se puede usar para tratar a un sujeto que padece o es susceptible a la fenilcetonuria (PKU). La PKU es un trastorno genético metabólico autosómico recesivo caracterizado por una mutación en el gen de la enzima hepática fenilalanina hidroxilasa (HAP), lo que la vuelve no funcional. La HAP es necesaria para metabolizar el aminoácido fenilalanina (Phe) al aminoácido tirosina (Tyr). Cuando se reduce la actividad de los HAP, la fenilalanina se acumula y se convierte en fenilpiruvato (también conocido como fenilcetona), que puede detectarse en la orina.

[0295] La fenilalanina es un aminoácido neutro grande (LNAA). Los LNAA compiten por el transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE) a través del gran transportador de aminoácidos neutros (LNAAT). El exceso de Phe en la sangre satura el transportador y tiende a disminuir los niveles de otros LNAA en el cerebro. Debido a que varios de estos otros aminoácidos son necesarios para la síntesis de proteínas y neurotransmisores, la acumulación de Phe dificulta el desarrollo del cerebro y puede causar retraso mental.

[0296] Además del desarrollo cerebral obstaculizado, la enfermedad puede presentarse clínicamente con una variedad de síntomas que incluyen convulsiones, albinismo, hiperactividad, retraso en el crecimiento, erupciones cutáneas (eccema), microcefalia y/o un olor a "moho" en el sudor del bebé y orina, debido al fenilacetato, una de las cetonas producidas. Los niños que no reciben tratamiento suelen ser normales al nacer, pero tienen retrasos en sus habilidades mentales y sociales, tienen un tamaño de cabeza significativamente inferior al normal y, a menudo, demuestran un deterioro progresivo de la función cerebral. A medida que el niño crece y se desarrolla, tienden a desarrollarse síntomas adicionales que incluyen hiperactividad, movimientos bruscos de brazos o piernas, anomalías en el EEG, erupciones cutáneas, temblores, convulsiones y problemas graves de aprendizaje. Sin embargo, la PKU se incluye comúnmente en el panel de detección sistemática de recién nacidos de la mayoría de los países, que generalmente se realiza entre 2 y 7 días después del nacimiento.

[0297] Si la PKU se diagnostica lo suficientemente temprano, un recién nacido afectado puede crecer con un desarrollo cerebral relativamente normal, pero solo manejando y controlando los niveles de Phe a través de la dieta, o una combinación de dieta y medicación. Todos los pacientes con PKU deben seguir una dieta especial baja en Phe para un desarrollo cerebral óptimo. La dieta requiere restringir o eliminar severamente los alimentos ricos en Phe, como la carne, el pollo, el pescado, los huevos, los frutos secos, el queso, las legumbres, la leche y otros productos lácteos. Se deben controlar los alimentos con almidón, como las patatas, el pan, la pasta y el maíz. Los bebés aún pueden ser amamantados para proporcionar todos los beneficios de la leche materna, pero también se debe controlar la cantidad y se necesitarán suplementos para los nutrientes faltantes. También se debe evitar el edulcorante aspartamo, presente en muchos alimentos dietéticos y refrescos, ya que el aspartamo contiene fenilalanina.

[0298] A lo largo de la vida, los pacientes pueden utilizar fórmulas infantiles suplementarias, píldoras o alimentos especialmente formulados para adquirir aminoácidos y otros nutrientes necesarios que de otro modo serían deficientes en una dieta baja en fenilalanina. Se requiere algo de Phe para la síntesis de muchas proteínas y para un crecimiento apropiado, pero sus niveles deben controlarse estrictamente en pacientes con PKU. Además, los pacientes con PKU deben tomar suplementos de tirosina, que normalmente se deriva de la fenilalanina. Otros suplementos pueden incluir aceite de pescado, para reemplazar los ácidos grasos de cadena larga que faltan en una dieta estándar libre de Phe y mejorar el desarrollo neurológico, y hierro o carnitina. Otra posible terapia para la PKU es la tetrahidrobiopterina (BH4), un cofactor de oxidación de Phe que puede reducir los niveles sanguíneos de Phe en ciertos pacientes. Los pacientes que responden a la terapia con BH4 también pueden aumentar la cantidad de proteína natural que pueden consumir.

[0299] En algunas formas de realización, la expresión de la proteína HAP es detectable en hígado, riñón, corazón, bazo, suero, cerebro, músculo esquelético, ganglios linfáticos, piel y/o líquido cefalorraquídeo.

[0300] En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada da como resultado la expresión de un nivel de proteína HAP en o por encima de unos 100 ng/mg, aproximadamente 200 ng/mg, aproximadamente 300 ng/mg, aproximadamente 400 ng/mg, aproximadamente 500 ng/mg, aproximadamente 600 ng/mg, aproximadamente 700 ng/mg, aproximadamente 800 ng/mg, aproximadamente 900 ng/mg, aproximadamente 1000 ng/mg, aproximadamente 1200 ng/mg o aproximadamente 1400 ng/mg de proteína total en el hígado.

[0301] En algunas formas de realización, la expresión de la proteína HAP es detectable de 1 a 96 horas después de la administración. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la expresión de la proteína HAP es detectable de 1 a 84 horas, de 1 a 72 horas, de 1 a 60 horas, de 1 a 48 horas, de 1 a 36 horas, de 1 a 24 horas, de 1 a 12 horas, de 1 a 10 horas, 1 a 8 horas, 1 a 6 horas, 1 a 4 horas, 1 a 2 horas, 2 a 96 horas, 2 a 84 horas, 2 a 72 horas, 2 a 60 horas, 2 a 48 horas, 2 a 36 horas, 2 a 24 horas, 2 a 12 horas, 2 a 10 horas, 2 a 8 horas, 2 a 6 horas, 2 a 4 horas, 4 a 96 horas, 4 a 84 horas, 4 a 72 horas, 4 a 60 horas, 4 a 48 horas, 4 a 36 horas, 4 a 24 horas, 4 a 12 horas, 4 a 10 horas, 4 a 8 horas, 4 a 6 horas, 6 a 96 horas, 6 a 84 horas, 6 a 72 horas, 6 a 60 horas, 6 a 48 horas, 6 a 36 horas, 6 a 24 horas, 6 a 12 horas, 6 a 10 horas, 8 a 96 horas, 8 a 84 horas, 8 a 72 horas, 8 a 60 horas, 8 a 48 horas, 8 a 36 horas, 8 a 24 horas, 8

a 12 horas, 8 a 10 horas, 10 a 96 horas, 10 a 84 horas, 10 a 72 horas, 10 a 60 horas, 10 a 48 horas, 10 a 36 horas, 10 a 24 horas, 10 a 12 horas, 12 a 96 horas, 12 a 84 horas, 12 a 72 horas, 12 a 60 horas, 12 a 48 horas, 12 a 36 horas, 12 a 24 horas, 24 a 96 horas, 24 a 84 horas, 24 a 72 horas, 24 a 60 horas, 24 a 48 horas, 24 a 36 horas, 36 a 96 horas, 36 a 84 horas, 36 a 72 horas, 36 a 60 horas, 36 a 48 horas, 48 a 96 horas, 48 a 84 horas, 48 a 72 horas, 48 a 60 horas, 48 a 84 horas, 48 a 72 horas, 48 a 60 horas, 60 a 96 horas, 60 a 84 horas, 60 a 72 horas, 72 horas a 96 horas, 72 horas a 84 horas o 84 horas a 96 horas después de la administración. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la expresión de la proteína HAP es detectable 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 y/o 72 horas después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de la proteína HAP es detectable de 1 día a 7 días después de la administración. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la proteína HAP es detectable 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días y/o 7 días después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de la proteína HAP es detectable de 1 semana a 8 semanas después de la administración. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la expresión de la proteína HAP es detectable 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y/o 4 semanas después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de la proteína HAP es detectable un mes después de la administración.

3.8 CPS1

[0302] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos y composiciones para administrar ARNcirc que codifica CPS1 a un sujeto para el tratamiento de la deficiencia de CPS1. Un ARNcirc de CPS1 adecuado codifica cualquier longitud completa, fragmento o parte de una proteína CPS1 que puede sustituirse por la actividad de la proteína CPS1 natural y/o reducir la intensidad, gravedad y/o frecuencia de uno o más síntomas asociados con la deficiencia de CPS1.

[0303] En algunas formas de realización, una secuencia de ARN adecuada para la presente invención comprende una secuencia de ARN circular que codifica la proteína CPS1 humana.

[0304] En algunas formas de realización, una secuencia de ARN adecuada puede ser una secuencia de ARN que codifica un homólogo o un análogo de CPS1 humano. Como se usa en el presente documento, un homólogo o un análogo de la proteína CPS1 humana puede ser una proteína CPS1 humana modificada que contiene una o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con una proteína CPS1 humana de tipo salvaje o de origen natural mientras conserva actividad sustancial de la proteína CPS1.

[0305] La carbamoil fosfato sintetasa I (CPS1) cataliza la conversión de amoníaco, bicarbonato y 2 ATP con la formación de carbamoil fosfato en el primer paso del ciclo de la urea. También desempeña un papel en la biosíntesis de arginina, que a su vez es un sustrato para la biosíntesis de NO, por ejemplo, en el caso de un shock de endotoxinas (cf. Shoko Tabuchi et al., Regulation of Genes for Inducible Nitric Oxide Synthase and Urea Cycle Enzymes in Rat Liver in Endotoxin Shock, Biochemical and Biophysical Research Communications 268, 221-224 (2000)). La CPS 1 debe distinguirse de la enzima citosólica CPS 2, que también desempeña un papel en el ciclo de la urea pero procesa el sustrato glutamina. Se sabe que CPS 1 se localiza en las mitocondrias y se presenta de esta forma en grandes cantidades en el tejido hepático (representa del 2 al 6 % de la proteína hepática total). Su secuencia de aminoácidos y localización genética se conocen desde hace mucho tiempo (cf. Haraguchi Y. et al., Cloning and sequence of a cDNA encoding human carbamyl phosphate synthetase I: molecular analysis of hyperammonemia, Gene 1991, 1 de noviembre; 107 (2); 335-340; véase también la publicación WO 03/089933 A1 del solicitante). En cuanto a su papel fisiológico, se puede hacer referencia a artículos de revisión como, por ejemplo, HM Holder et al., Carbamoyl phosphate synthetase: an amazing biochemical odyssey from substrate to product, CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 56 (1999) 507-522, y la literatura allí mencionada, y la introducción a la publicación de Mikiko Ozaki et al., EnzymeLinked Immunosorbent Assay of Carbamoylphosphate Synthetase I: Plasma Enzyme in Rat Experimental Hepatitis and Its Clearance, Enzyme Protein 1994, 95:48:213-221.

[0306] La deficiencia de carbamoil fosfato sintetasa I (CPS1) es un trastorno genético caracterizado por una mutación en el gen de la enzima carbamoil fosfato sintetasa I, que afecta su capacidad para catalizar la síntesis de carbamoil fosfato a partir de amoníaco y bicarbonato. Esta reacción es el primer paso del ciclo de la urea, que es importante para eliminar el exceso de urea de las células. Los defectos en la proteína CPS1 interrumpen el ciclo de la urea e impiden que el hígado procese adecuadamente el exceso de nitrógeno en urea.

[0307] En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada da como resultado la expresión de una proteína CPS1 nivel igual o superior a aproximadamente 100 ng/mg, aproximadamente 200 ng/mg, aproximadamente 300 ng/mg, aproximadamente 400 ng/mg, aproximadamente 500 ng/mg, aproximadamente 600 ng/mg, aproximadamente 700 ng/mg, aproximadamente 800 ng/mg, aproximadamente 900 ng/mg, aproximadamente 1000 ng/mg, aproximadamente 1200 ng/mg o aproximadamente 1400 ng/mg de proteína total en el hígado.

[0308] En algunas formas de realización, la expresión de la proteína CPS1 es detectable de 1 a 96 horas después de la administración. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la expresión de la proteína CPS1 es detectable de 1 a 84 horas, de 1 a 72 horas, de 1 a 60 horas, de 1 a 48 horas, de 1 a 36 horas, de 1 a 24 horas, de 1 a 12 horas, de 1 a 10 horas, 1 a 8 horas, 1 a 6 horas, 1 a 4 horas, 1 a 2 horas, 2 a 96 horas, 2 a 84 horas, 2 a 72 horas, 2 a 60 horas, 2 a 48 horas, 2 a 36 horas, 2 a 24 horas, 2 a 12 horas, 2 a 10 horas, 2 a 8 horas, 2 a 6 horas, 2 a 4 horas, 4 a 96 horas, 4 a 84 horas, 4 a 72 horas, 4 a 60 horas, 4 a 48 horas, 4 a 36 horas, 4 a 24 horas, 4 a 12 horas, 4 a 10 horas, 4 a 8 horas, 4 a 6

horas, 6 a 96 horas, 6 a 84 horas, 6 a 72 horas, 6 a 60 horas, 6 a 48 horas, 6 a 36 horas, 6 a 24 horas, 6 a 12 horas, 6 a 10 horas, 6 a 8 horas, 8 a 96 horas, 8 a 84 horas, 8 a 72 horas, 8 a 60 horas, 8 a 48 horas, 8 a 36 horas, 8 a 24 horas, 8 a 12 horas, 8 a 10 horas, 10 a 96 horas, 10 a 84 horas, 10 a 72 horas, 10 a 60 horas, 10 a 48 horas, 10 a 36 horas, 10 a 24 horas, 10 a 12 horas, 12 a 96 horas, 12 a 84 horas, 12 a 72 horas, 12 a 60 horas, 12 a 48 horas, 12 a 36 horas, 12 a 24 horas, 24 a 96 horas, 24 a 84 horas, 24 a 72 horas, 24 a 60 horas, 24 a 48 horas, 24 a 36 horas, 36 a 96 horas, 36 a 84 horas, 36 a 72 horas, 36 a 60 horas, 36 a 48 horas, 48 a 96 horas, 48 a 84 horas, 48 a 72 horas, 48 a 60 horas, 48 a 84 horas, 48 a 72 horas, 48 a 60 horas, 60 a 96 horas, 60 a 84 horas, 60 a 72 horas, 72 horas a 96 horas, 72 horas a 84 horas o 84 horas a 96 horas después de la administración. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la expresión de la proteína CPS1 es detectable 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 y/o 72 horas después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de la proteína CPS 1 es detectable de 1 día a 7 días después de la administración. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la proteína CPS1 es detectable 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días y/o 7 días después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de la proteína CPS 1 es detectable de 1 semana a 8 semanas después de la administración. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la proteína CPS 1 es detectable 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y/o 4 semanas después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de la proteína CPS 1 es detectable un mes después de la administración.

[0309] En algunas formas de realización, la administración de la composición da como resultado niveles reducidos de amoníaco en un sujeto en comparación con los niveles iniciales antes del tratamiento. Normalmente, los niveles iniciales se miden en el sujeto inmediatamente antes del tratamiento. Normalmente, los niveles de amoníaco se miden en una muestra biológica. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, orina o líquido cefalorraquídeo.

[0310] En algunas formas de realización, la administración de la composición da como resultado niveles reducidos de amoníaco en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de suero, plasma u orina) en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, en al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente 95 % en comparación con los niveles iniciales en un sujeto inmediatamente antes del tratamiento.

[0311] En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada en el presente documento da como resultado niveles reducidos de amoníaco en plasma o suero en comparación con los niveles iniciales de amoníaco en un sujeto inmediatamente antes del tratamiento. En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada da como resultado niveles reducidos de amoníaco en plasma o suero en comparación con los niveles de amoníaco en sujetos que no reciben tratamiento. En algunas formas de realización, la administración de la composición da como resultado la reducción de los niveles de amoníaco a aproximadamente 3000 mmol/L o menos, aproximadamente 2750 mmol/L o menos, aproximadamente 2500 mmol/L o menos, aproximadamente 2250 mmol/L o menos, aproximadamente 2000 mmol/L o menos, aproximadamente 1750 mmol/L o menos, aproximadamente 1500 mmol/L o menos, aproximadamente 1250 mmol/L o menos, aproximadamente 1000 mmol/L o menos, aproximadamente 750 mmol/L o menos, aproximadamente 500 mmol/L o menos, aproximadamente 250 mmol/L o menos, aproximadamente 100 mmol/L o menos o aproximadamente 50 mmol/L o menos en el plasma o suero del sujeto. En una forma de realización particular, la administración de la composición da como resultado la reducción de los niveles de amoníaco a aproximadamente 50 mmol/L o menos en el plasma o suero.

3.9 ADAMTS13

[0312] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos y composiciones para administrar ARNcirc que codifica ADAMTS 13 a un sujeto para el tratamiento de la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). Un ARNcirc de ADAMTS 13 adecuado codifica cualquier proteína ADAMTS 13 de longitud completa, o fragmento o parte funcional de la misma, que puede sustituirse por la proteína ADAMTS 13 de origen natural y/o reducir la intensidad, gravedad y/o frecuencia de uno o más síntomas asociados con TTP.

[0313] En algunas formas de realización, la secuencia de ARN de la presente invención comprende una secuencia de ARN circular que codifica la proteína ADAMTS13 humana.

[0314] En algunas formas de realización, la secuencia de ARN puede ser una secuencia de ARN que codifica un homólogo o un análogo de ADAMTS13 humano. Como se usa en el presente documento, un homólogo o un análogo de la proteína ADAMTS 13 humana puede ser una proteína ADAMTS 13 humana modificada que contiene una o más sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con una proteína ADAMTS13 humana de tipo salvaje o de origen natural mientras conserva actividad sustancial de la proteína ADAMTS13.

[0315] La enzima ADAMTS13 escinde el factor von Willebrand, que, en su forma no escindida, interactúa con las plaquetas y hace que se peguen y se adhieran a las paredes de los vasos sanguíneos, formando coágulos. Los defectos en ADAMTS13 están asociados con la TTP.

[0316] En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada da como resultado la expresión de un nivel de proteína ADAMTS 13 igual o superior a aproximadamente 100 ng/mg, aproximadamente 200 ng/mg, aproximadamente 300 ng/mg, aproximadamente 400 ng/mg, aproximadamente 500 ng/mg, aproximadamente 600 ng/mg, aproximadamente 700 ng/mg, aproximadamente 800 ng/mg, aproximadamente 900 ng/mg, aproximadamente 1000 ng/mg, aproximadamente 1200 ng/mg o aproximadamente 1400 ng/mg de proteína total en el hígado.

[0317] En algunas formas de realización, la expresión de la proteína ADAMTS13 es detectable de 1 a 96 horas después de la administración. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la expresión de la proteína ADAMTS13 es detectable de 1 a 84 horas, de 1 a 72 horas, de 1 a 60 horas, de 1 a 48 horas, de 1 a 36 horas, de 1 a 24 horas, de 1 a 12 horas, de 1 a 10 horas, 1 a 8 horas, 1 a 6 horas, 1 a 4 horas, 1 a 2 horas, 2 a 96 horas, 2 a 84 horas, 2 a 72 horas, 2 a 60 horas, 2 a 48 horas, 2 a 36 horas, 2 a 24 horas, 2 a 12 horas, 2 a 10 horas, 2 a 8 horas, 2 a 6 horas, 2 a 4 horas, 4 a 96 horas, 4 a 84 horas, 4 a 72 horas, 4 a 60 horas, 4 a 48 horas, 4 a 36 horas, 4 a 24 horas, 4 a 12 horas, 4 a 10 horas, 4 a 8 horas, 4 a 6 horas, 6 a 96 horas, 6 a 84 horas, 6 a 72 horas, 6 a 60 horas, 6 a 48 horas, 6 a 36 horas, 6 a 24 horas, 6 a 12 horas, 6 a 10 horas, 6 a 8 horas, 8 a 96 horas, 8 a 84 horas, 8 a 72 horas, 8 a 60 horas, 8 a 48 horas, 8 a 36 horas, 8 a 24 horas, 8 a 12 horas, 8 a 10 horas, 10 a 96 horas, 10 a 84 horas, 10 a 72 horas, 10 a 60 horas, 10 a 48 horas, 10 a 36 horas, 10 a 24 horas, 10 a 12 horas, 12 a 96 horas, 12 a 84 horas, 12 a 72 horas, 12 a 60 horas, 12 a 48 horas, 12 a 36 horas, 12 a 24 horas, 24 a 96 horas, 24 a 84 horas, 24 a 72 horas, 24 a 60 horas, 24 a 48 horas, 24 a 36 horas, 36 a 96 horas, 36 a 84 horas, 36 a 72 horas, 36 a 60 horas, 36 a 48 horas, 48 a 96 horas, 48 a 84 horas, 48 a 72 horas, 48 a 60 horas, 48 a 84 horas o 84 horas a 96 horas después de la administración. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la expresión de la proteína ADAMTS13 es detectable 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 y/o 72 horas después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de la proteína ADAMTS13 es detectable de 1 día a 7 días después de la administración. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la proteína ADAMTS13 es detectable 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días y/o 7 días después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de la proteína ADAMTS 13 es detectable de 1 semana a 8 semanas después de la administración. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la proteína ADAMTS 13 es detectable 1 semana, 2 semanas, 3 semanas y/o 4 semanas después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión de la proteína ADAMTS13 es detectable un mes después de la administración.

[0318] En algunas formas de realización, la administración de la composición da como resultado niveles reducidos del factor von Willebrand (vWF) en un sujeto en comparación con los niveles iniciales de vWF antes del tratamiento. Normalmente, los niveles iniciales se miden en el sujeto inmediatamente antes del tratamiento. Normalmente, los niveles de vWF se miden en una muestra biológica. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, por ejemplo, sangre entera, plasma o suero.

[0319] En algunas formas de realización, la administración de la composición da como resultado niveles reducidos de vWF en una muestra biológica tomada del sujeto en al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % en comparación con los niveles iniciales de vWF inmediatamente antes del tratamiento. En algunas formas de realización, la administración de la composición da como resultado niveles reducidos de vWF en plasma en el sujeto a menos de aproximadamente 2000 μM , 1500 μM , 1000 μM , 750 μM , 500 μM , 250 μM , 100 μM , 90 μM , 80 μM , 70 μM , 60 μM , 50 μM , 40 μM o 30 μM .

[0320] En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada da como resultado niveles reducidos de vWF en muestras de plasma o suero tomadas del sujeto en comparación con los niveles iniciales de vWF inmediatamente antes del tratamiento. En algunas formas de realización, la administración de la composición proporcionada da como resultado niveles reducidos de vWF en plasma o suero en comparación con los niveles de vWF en sujetos que no reciben tratamiento. En algunas formas de realización, la administración de la composición da como resultado una reducción de los niveles de vWF a aproximadamente 3000 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 2750 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 2500 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 2250 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 2000 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 1750 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 1500 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 1250 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 1000 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 750 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 500 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 250 $\mu\text{mol/L}$ o menos, aproximadamente 100 $\mu\text{mol/L}$ o menos o aproximadamente 50 $\mu\text{mol/L}$ o menos en el plasma o suero. En una forma de realización particular, la administración de la composición da como resultado la reducción de los niveles de vWF a aproximadamente 50 $\mu\text{mol/L}$ o menos en el plasma o suero.

4. Producción de polinucleótidos.

[0321] Los vectores proporcionados en este documento se pueden preparar utilizando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, los diversos elementos de los vectores proporcionados en el presente documento se pueden obtener usando métodos recombinantes, tales como seleccionando ADNc y bibliotecas genómicas de células, o derivando los polinucleótidos de un vector que se sabe que los incluye.

[0322] Los diversos elementos de los vectores proporcionados en el presente documento también se pueden producir sintéticamente, en lugar de clonarse, basándose en las secuencias conocidas. La secuencia completa puede ensamblarse

a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados mediante métodos estándar y ensamblarse en la secuencia completa. Véase, por ejemplo, Edge, Nature (1981) 292:756; Nambair et al., Science (1984) 223: 1299; y Jay et al., J. Biol. Chem. (1984) 259:631 1.

[0323] Por lo tanto, se pueden obtener secuencias de nucleótidos particulares a partir de vectores que albergan las secuencias deseadas o sintetizarse completa o parcialmente usando diversas técnicas de síntesis de oligonucleótidos conocidas en la técnica, tales como técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuando sea apropiado. Un método para obtener secuencias de nucleótidos que codifican los elementos del vector deseados es hibridando conjuntos complementarios de oligonucleótidos sintéticos superpuestos producidos en un sintetizador de polinucleótidos automatizado convencional, seguido de ligación con una ADN ligasa apropiada y amplificación de la secuencia de nucleótidos ligada mediante PCR. Véase, por ejemplo, Jayaraman et al., Proc. Nacional. Acad. Sci. EE. UU. (1991) 88:4084-4088. Además, la síntesis dirigida por oligonucleótidos (Jones et al., Nature (1986) 54:75-82), la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de regiones de nucleótidos preexistentes (Riechmann et al., Nature (1988) 332:323-327 y Verhoeven et al., Science (1988) 239: 1534-1536), y el relleno enzimático de oligonucleótidos con huecos utilizando ADN polimerasa T4 (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. (1989) 86: 10029-10033) puede ser usado.

[0324] El ARN precursor proporcionado en el presente documento se puede generar incubando un vector proporcionado en el presente documento en condiciones que permitan la transcripción del ARN precursor codificado por el vector. Por ejemplo, en algunas formas de realización se sintetiza un ARN precursor incubando un vector proporcionado en el presente documento que comprende un promotor de ARN polimerasa aguas arriba de su región formadora de dúplex 5' y/o secuencia de expresión con una enzima ARN polimerasa compatible en condiciones que permiten la transcripción *in vitro*. En algunas formas de realización, el vector se incuba dentro de una célula mediante una ARN polimerasa de bacteriófago o en el núcleo de una célula mediante una ARN polimerasa II del huésped.

[0325] En ciertas formas de realización, se proporciona en el presente documento un método para generar ARN precursor realizando la transcripción *in vitro* utilizando un vector proporcionado en el presente documento como plantilla (por ejemplo, un vector proporcionado en el presente documento con un promotor de ARN polimerasa colocado cadena arriba de la región de homología 5').

[0326] En ciertas formas de realización, el ARN precursor resultante se puede usar para generar ARN circular (por ejemplo, un polinucleótido de ARN circular proporcionado en el presente documento) incubándolo en presencia de iones de magnesio y nucleótido o nucleósido de guanosina a una temperatura a la que se puede realizar la circularización del ARN (por ejemplo, entre 20 °C y 60 °C).

[0327] Por lo tanto, en ciertas formas de realización se proporciona en el presente documento un método para producir ARN circular. En determinadas formas de realización, el método comprende sintetizar ARN precursor mediante transcripción (por ejemplo, transcripción run-off) utilizando un vector proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un vector que comprende, en el siguiente orden, una región de homología 5', un intrón del grupo I en 3' fragmento, un primer espaciador, un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), una secuencia de expresión, un segundo espaciador, un fragmento de intrón del grupo I en 5' y una región de homología en 3') como plantilla, e incubar el ARN precursor resultante en el presencia de cationes divalentes (por ejemplo, iones de magnesio) y GTP de modo que se circulariza para formar ARN circular. En algunas formas de realización, el ARN precursor descrito en el presente documento es capaz de circularizarse en ausencia de iones magnesio y GTP y/o sin la etapa de incubación con iones magnesio y GTP. Se ha descubierto que el ARN circular tiene una inmunogenicidad reducida en relación con un ARNm correspondiente, al menos parcialmente porque el ARNm contiene una tapa 5' inmunogénica. Cuando se transcribe un vector de ADN a partir de ciertos promotores (por ejemplo, un promotor T7) para producir un ARN precursor, se entiende que el extremo 5' del ARN precursor es G. Para reducir la inmunogenicidad de una composición de ARN circular que contiene una baja A nivel de ARNm lineal contaminante, se puede proporcionar un exceso de GMP en relación con GTP durante la transcripción, de modo que la mayoría de las transcripciones contienen un GMP 5', que no se puede bloquear. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la transcripción se lleva a cabo en presencia de un exceso de GMP. En algunas formas de realización, la transcripción se lleva a cabo donde la relación entre la concentración de GMP y la concentración de GTP está dentro del rango de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 15:1, por ejemplo, aproximadamente 3:1 a aproximadamente 10:1, aproximadamente 3:1 a aproximadamente 15:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 4:1 o aproximadamente 5:1.

[0328] En algunas formas de realización, se ha purificado una composición que comprende ARN circular. El ARN circular se puede purificar mediante cualquier método conocido comúnmente utilizado en la técnica, tal como cromatografía en columna, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de exclusión por tamaño. En algunas formas de realización, la purificación comprende uno o más de los siguientes pasos: tratamiento con fosfatasa, purificación por exclusión de tamaño por HPLC y digestión con RNasa R. En algunas formas de realización, la purificación comprende los siguientes pasos en orden: digestión con RNasa R, tratamiento con fosfatasa y purificación por exclusión de tamaño mediante HPLC. En algunas formas de realización, la purificación comprende HPLC de fase inversa. En algunas formas de realización, una composición purificada contiene menos ARN bicatenario, féculas de ADN, ARN trifosforilado, proteínas fosfatasas, proteínas ligasas, enzimas de protección y/o ARN mellado que el ARN no purificado. En algunas formas de realización, una composición purificada es menos inmunogénica que una composición no purificada. En algunas formas de

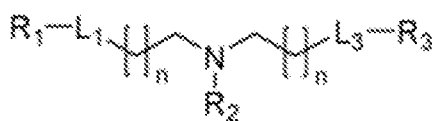
realización, las células inmunes expuestas a una composición purificada producen menos IFN- β 1, RIG-I, IL-2, IL-6, IFN γ y/o TNF α que las células inmunes expuestas a una composición no purificada.

5. Lípidos ionizables

[0329] En ciertas formas de realización se divulgan en el presente documento lípidos ionizables que se pueden usar como componente de un vehículo de transferencia para facilitar o mejorar la entrega y liberación de ARN circular a una o más células diana (por ejemplo, permeando o fusionando con las membranas lipídicas de dichas células diana). En determinadas formas de realización, un lípido ionizable comprende uno o más grupos funcionales escindibles (por ejemplo, un disulfuro) que permiten, por ejemplo, que un grupo de cabeza funcional hidrófilo se disocia de un grupo de cola funcional lipófilo del compuesto (por ejemplo, tras la exposición a agentes oxidantes, condiciones reductoras o ácidas), facilitando así una transición de fase en la bicapa lipídica de una o más células diana.

[0330] En algunas formas de realización, un lípido ionizable es un lípido como se describe en la solicitud de patente internacional PCT/US2018/058555.

[0331] En algunas formas de realización, un lípido ionizable es un compuesto de Fórmula (1):



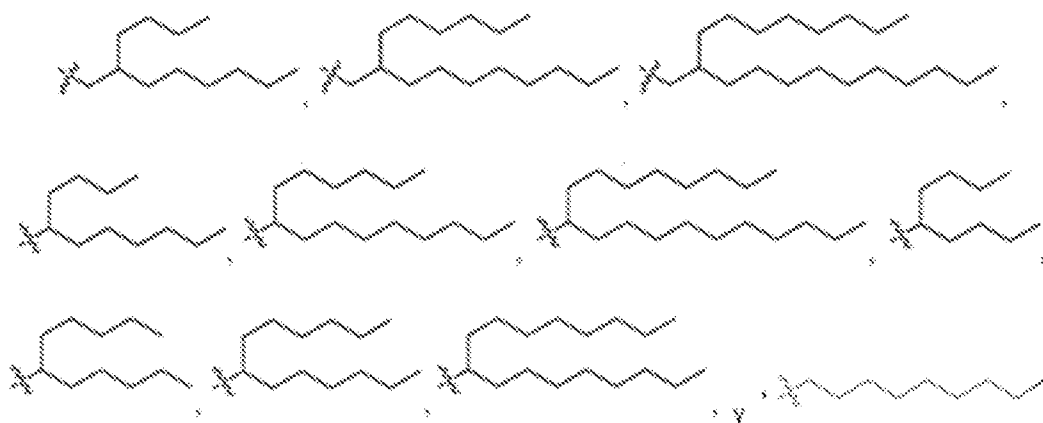
Fórmula (1).

en el que:

cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15; y
 L₁ y L₃ son cada uno independientemente -OC(O)-* o -C(O)O-*, en donde "*" indica el punto de unión a R₁ o R₃;
 R₁ y R₃ son cada uno independientemente un alquilo C₉-C₂₀ o alquenilo C₉-C₂₀ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre oxo, halo, hidroxilo, ciano, alquilo, alquenilo, aldehído, heterociclilalquilo, hidroxialquilo, dihidroxialquilo, hidroxialquilaminoalquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, (heterociclil)(alquil)aminoalquilo, heterociclilo, heteroarilo, alquilheteroarilo, alquinilo, alcoxi, amino, dialquilamino, aminoalquilcarbonilamino, aminocarbonilalquilamino, (aminocarbonilalquil)(alquil)amino, alquenilcarbonilamino, hidroxycarbonilo, alquiloxycarbonilo, aminocarbonilo, aminoalquilaminocarbonilo, alquilaminoalquilaminocarbonilo, dialquilaminoalquilaminocarbonilo, heterociclilalquilaminocarbonilo, (alquilaminoalquil)(alquil)aminocarbonilo, alquilaminoalquilcarbonilo, dialquilaminoalquilcarbonilo, heterociclilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alquinilcarbonilo, alquilsulfóxido, alquilsulfóxidoalquilo, alquilsulfonilo y alquilsulfonaalquilo.

[0332] En algunas formas de realización, R₁ y R₃ son iguales. En algunas formas de realización, R₁ y R₃ son diferentes.

[0333] En algunas formas de realización, R₁ y R₃ son cada uno independientemente un alquilo C₉-C₂₀ saturado ramificado. En algunas formas de realización, uno de R₁ y R₃ es un alquilo C₉-C₂₀ saturado ramificado y el otro es un alquilo C₉-C₂₀ saturado no ramificado. En algunas formas de realización, cada uno de R₁ y R₃ se selecciona independientemente de un grupo que consiste en:



[0334] En diversas formas de realización, R₂ se selecciona de un grupo que consiste en:

5



10



15

20

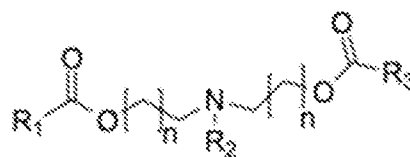


[0335] En algunas formas de realización, R_2 puede ser como se describe en la pub. de la patente internacional n° N° WO2019/152848 A1, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

25

[0336] En algunas formas de realización, un lípido ionizable es un compuesto de Fórmula (1-1) o Fórmula (1-2):

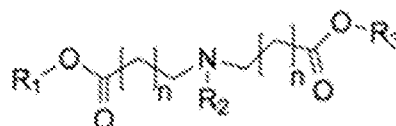
30



35

Fórmula (1-1)

40



45

Fórmula (1-2)

en la que n , R_1 , R_2 y R_3 son como se definen en la Fórmula (1).

[0337] Los métodos de preparación para los compuestos y composiciones anteriores se describen a continuación en el presente documento y/o se conocen en la técnica.

50

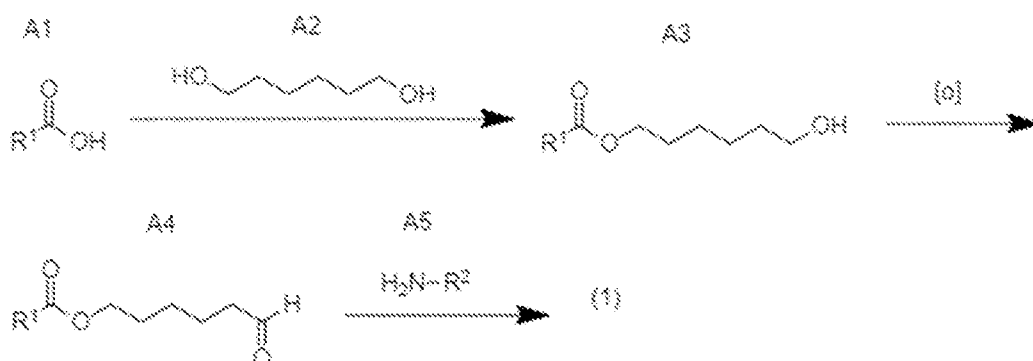
[0338] Los expertos en la técnica apreciarán que en el proceso descrito en el presente documento es posible que sea necesario proteger los grupos funcionales de los compuestos intermedios mediante grupos protectores adecuados. Dichos grupos funcionales incluyen, por ejemplo, hidroxilo, amino, mercapto y ácido carboxílico. Los grupos protectores adecuados para hidroxilo incluyen, por ejemplo, trialquilsililo o diarilalquilsililo (por ejemplo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo o trimetilsililo), tetrahidropiraniilo, bencilo y similares. Los grupos protectores adecuados para amino, amidino y guanidino incluyen, por ejemplo, t-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares. Los grupos protectores adecuados para mercapto incluyen, por ejemplo, $-C(O)-R''$ (donde R'' es alquilo, arilo o arilalquilo), p-metoxibencilo, tritilo y similares. Los grupos protectores adecuados para el ácido carboxílico incluyen, por ejemplo, ésteres de alquilo, arilo o arilalquilo. Los grupos protectores se pueden agregar o eliminar de acuerdo con técnicas estándar, que son conocidas por un experto en la técnica y como se describe en el presente documento. El uso de grupos protectores se describe en detalle, por ejemplo, en Green, T.W. y P. G. M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3ª Ed., Wiley. Como apreciaría un experto en la técnica, el grupo protector también puede ser una resina polimérica tal como una resina Wang, una resina Rink o una resina de cloruro de 2-clorotritilo.

65

[0339] Los expertos en la técnica también apreciarán que, aunque dichos derivados protegidos de los compuestos de esta invención pueden no poseer actividad farmacológica como tales, pueden administrarse a un mamífero y posteriormente metabolizarse en el cuerpo para formar compuestos de la invención que sean farmacológicamente activos. Por tanto, dichos derivados pueden describirse como profármacos. Todos los profármacos de los compuestos de esta invención están incluidos dentro del alcance de la invención.

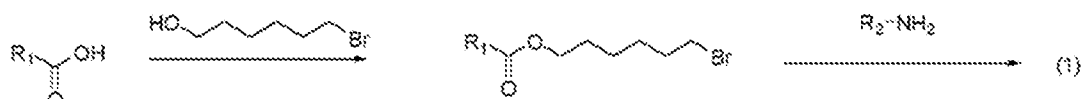
[0340] Además, todos los compuestos de la invención que existen en forma de base libre o ácido se pueden convertir en sus sales farmacéuticamente aceptables mediante tratamiento con la base o ácido inorgánico u orgánico apropiado mediante métodos conocidos por un experto en la técnica. Las sales de los compuestos de la invención también se pueden convertir a su forma de base libre o ácida mediante técnicas estándar.

[0341] El siguiente esquema de reacción ilustra un método ejemplar para preparar compuestos de Fórmula (1):



[0342] Los A1 se compran o preparan según métodos conocidos en la técnica. La reacción de A1 con diol A2 en condiciones de condensación apropiadas (por ejemplo, DCC) produce éster/alcohol A3, que luego puede oxidarse (por ejemplo, con PCC) para dar aldehído A4. La reacción de A4 con la amina A5 en condiciones de aminación reductora produce un compuesto de Fórmula (1).

[0343] El siguiente esquema de reacción ilustra un segundo método ejemplar para preparar compuestos de Fórmula (1), en la que R_1 y R_3 son iguales:



[0344] Las modificaciones al esquema de reacción anterior, tales como el uso de grupos protectores, pueden producir compuestos en los que R_1 y R_3 son diferentes. El uso de grupos protectores, así como otros métodos de modificación, en el esquema de reacción anterior será fácilmente evidente para un experto en la técnica.

[0345] Se entiende que un experto en la técnica puede ser capaz de preparar estos compuestos mediante métodos similares o combinando otros métodos conocidos por un experto en la técnica. También se entiende que un experto en la técnica podría preparar otros compuestos de Fórmula (1) no ilustrados específicamente en el presente documento utilizando los materiales de partida apropiados y modificando los parámetros de la síntesis. En general, los materiales de partida pueden obtenerse de fuentes tales como Sigma Aldrich, Lancaster Synthesis, Inc., Maybridge, Matrix Scientific, TCI y Fluorochem USA, etc. o sintetizarse según fuentes conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5ª edición (Wiley, diciembre de 2000)) o preparado como se describe en esta invención.

[0346] En algunas formas de realización, un lípido ionizable de la divulgación se selecciona de la Tabla 10a. En algunas formas de realización, el lípido ionizable es el lípido 26 en la Tabla 10a. En algunas formas de realización, el lípido ionizable es el lípido 27 en la Tabla 10a. En algunas formas de realización, el lípido ionizable es el lípido 53 en la Tabla 10a. En algunas formas de realización, el lípido ionizable es el lípido 54 en la Tabla 10a.

[0347] En algunas formas de realización, un lípido ionizable de la divulgación se selecciona del grupo que consiste en:

5

10

15

20

25

30

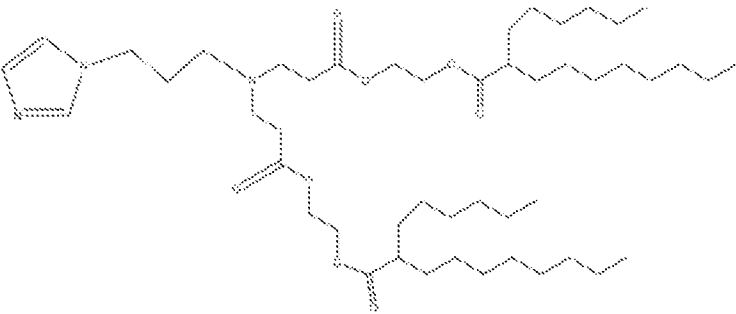
y

35

40

45

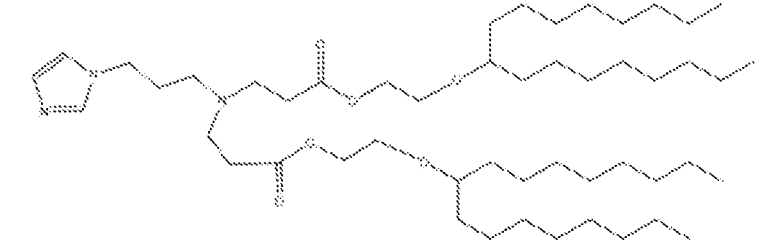
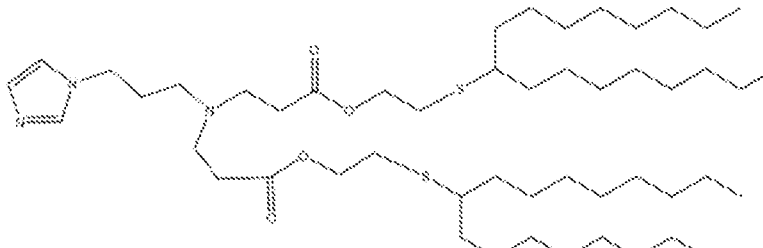
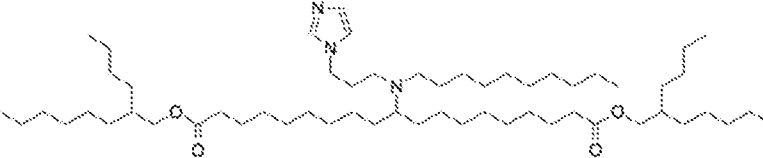
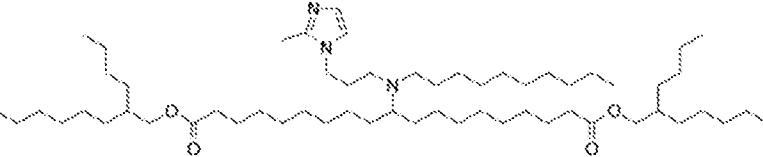
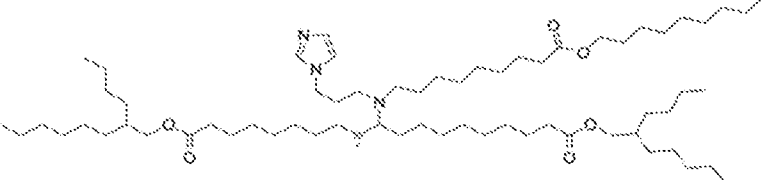
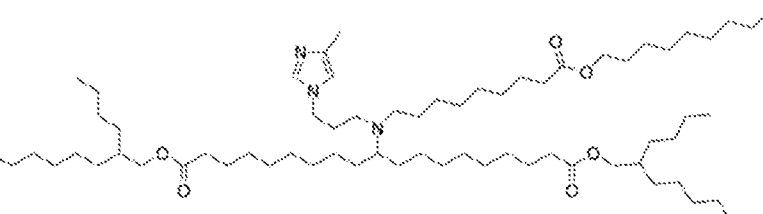
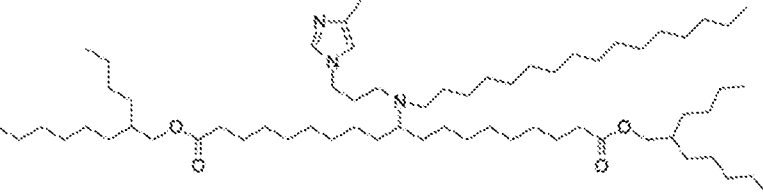
Tabla 10a

N° de lípidos ionizables	Estructura
1	

60

65

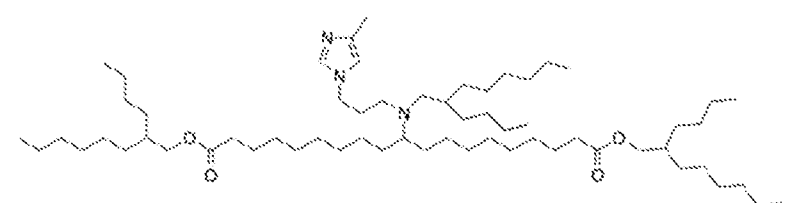
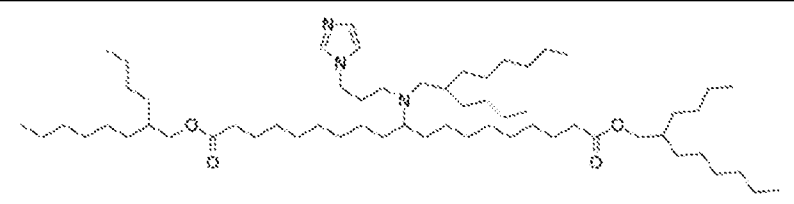
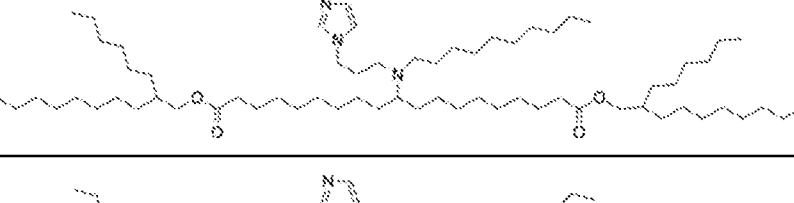
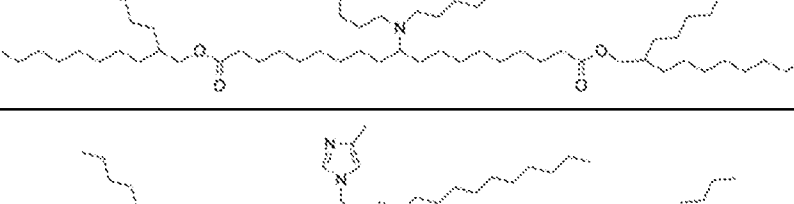
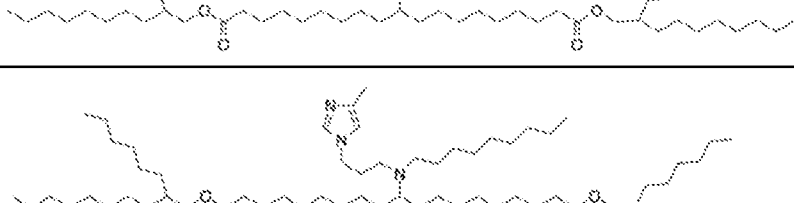
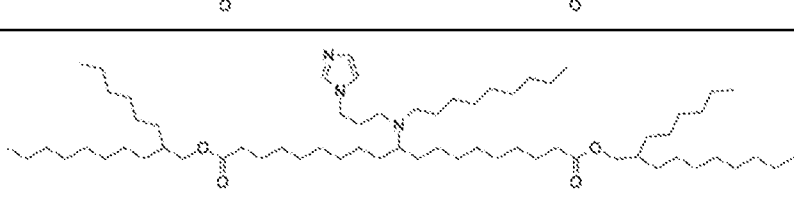
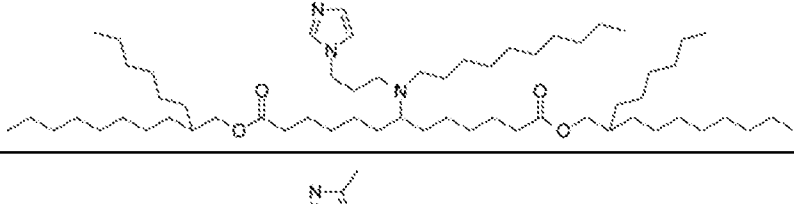
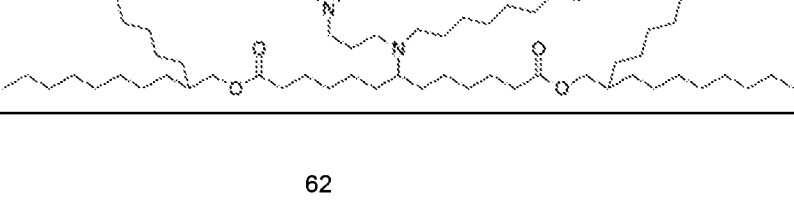
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

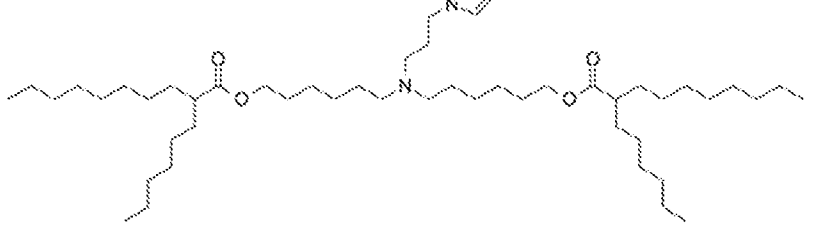
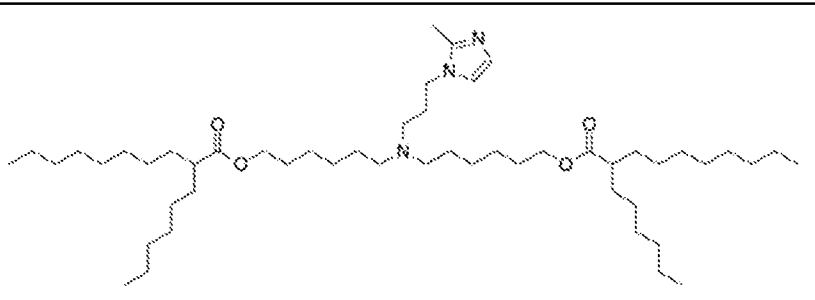
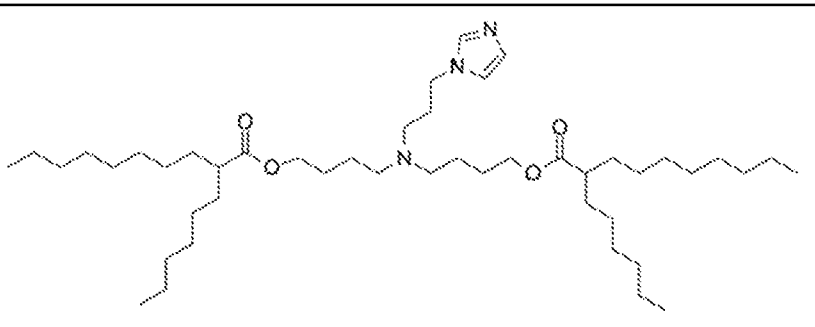
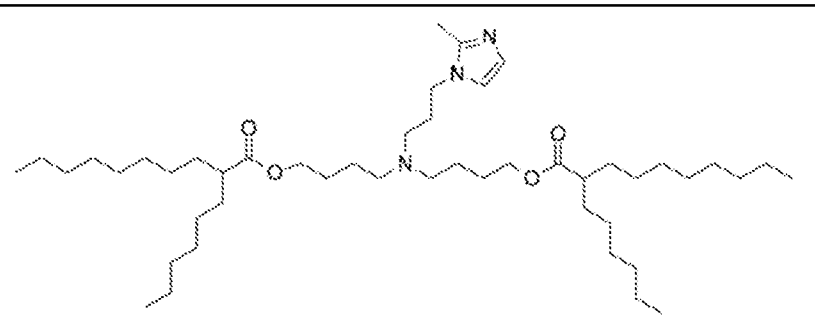
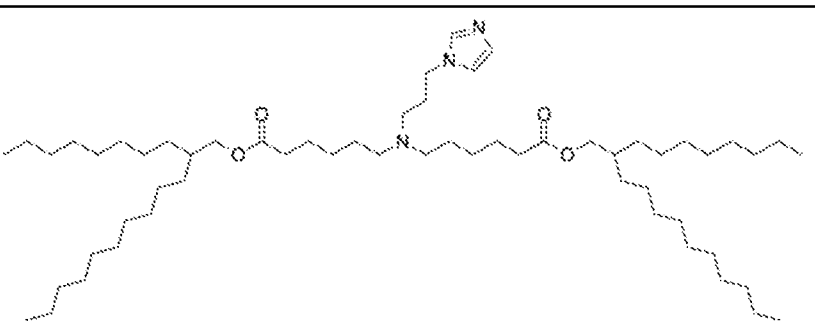
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	

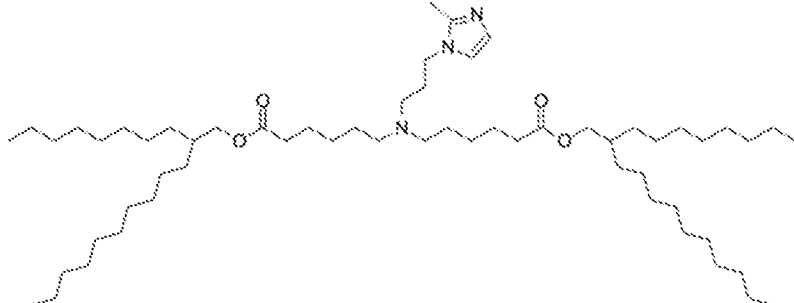
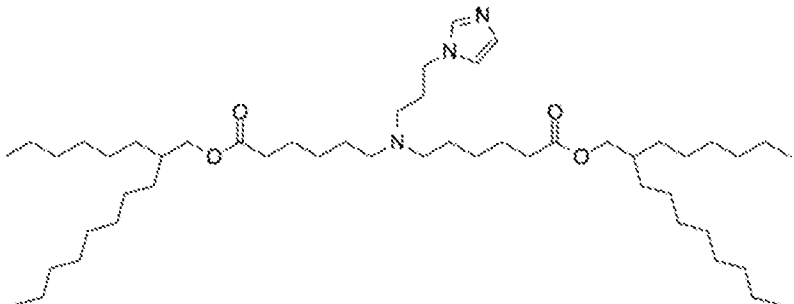
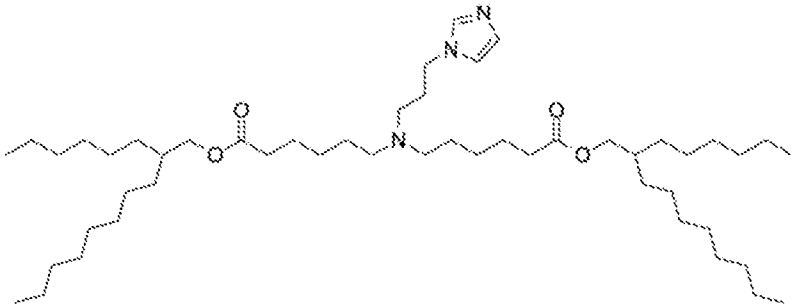
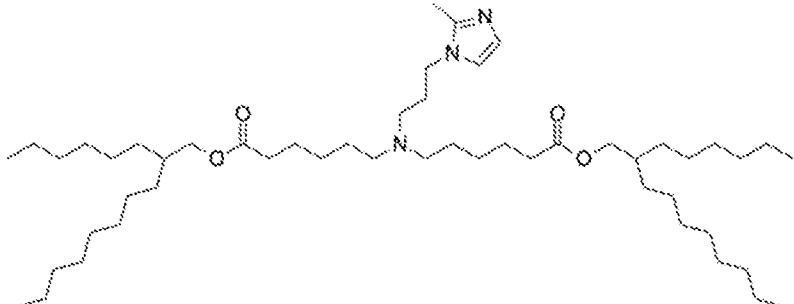
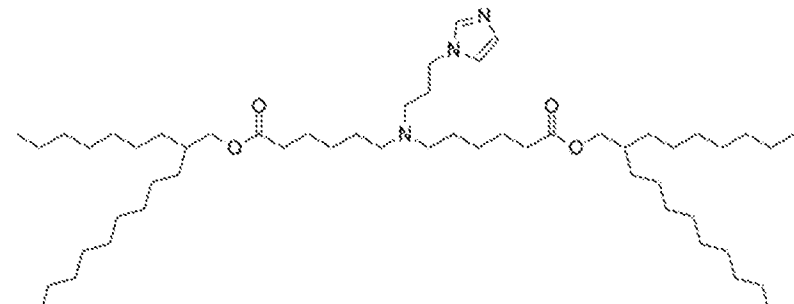
(Continuación)

Nº de ionizables	lípidos	Estructura
5		
10	17	
15	18	
20	19	
25	20	
30	21	
35	22	
40	23	
45	24	
50	25	
55		
60		
65		

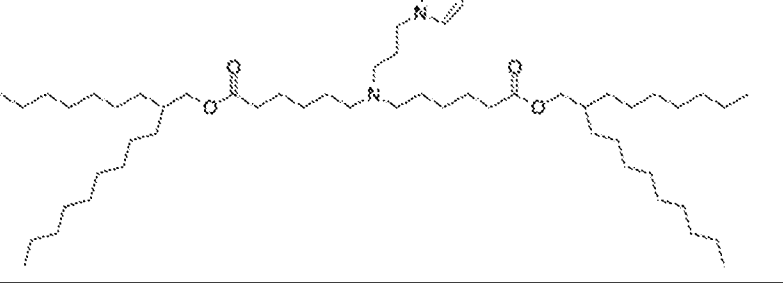
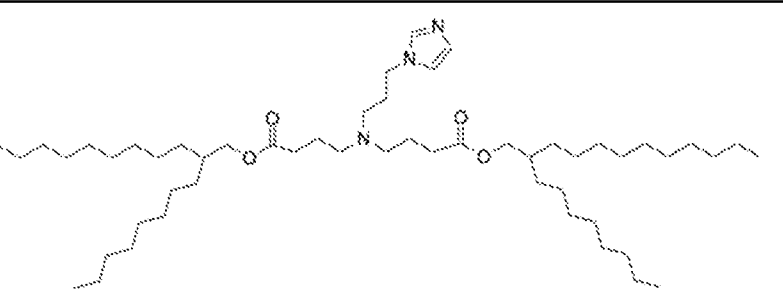
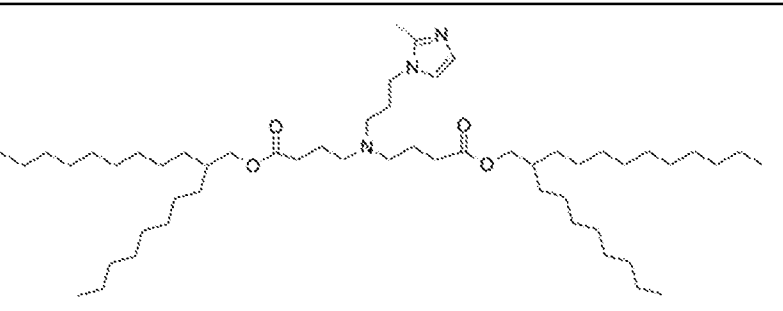
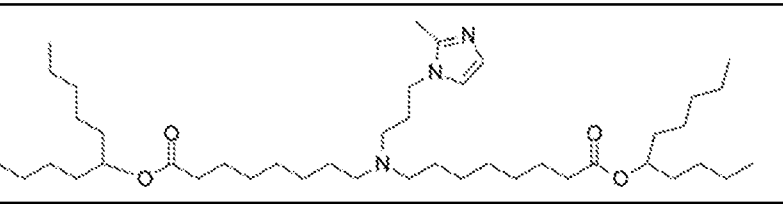
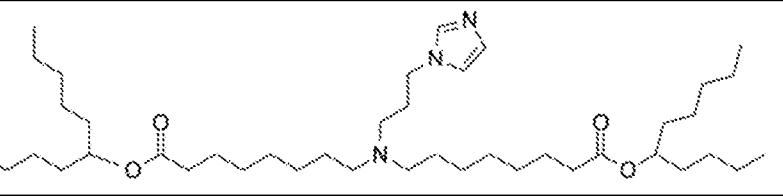
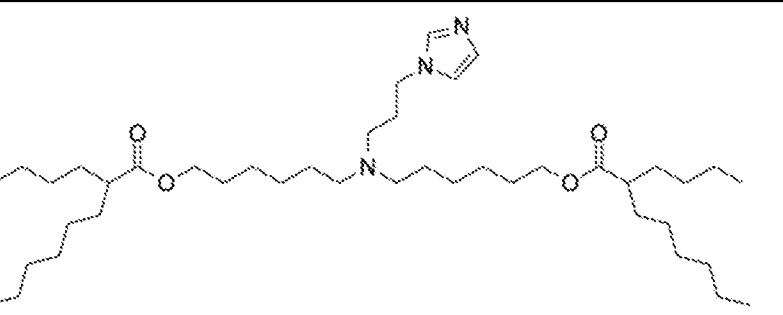
(Continuación)

Nº de ionizables	lípidos	Estructura
26		
27		
28		
29		
30		

(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
31	
32	
33	
34	
35	

(Continuación)

Nº de ionizables	lípidos	Estructura
36		
37		
38		
39		
40		
41		

(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
42	
43	
44	
45	
46	
47	
48	

67

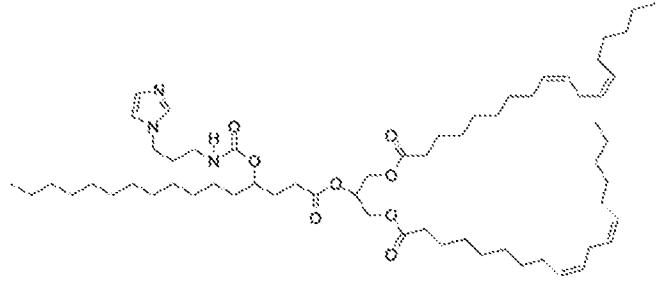
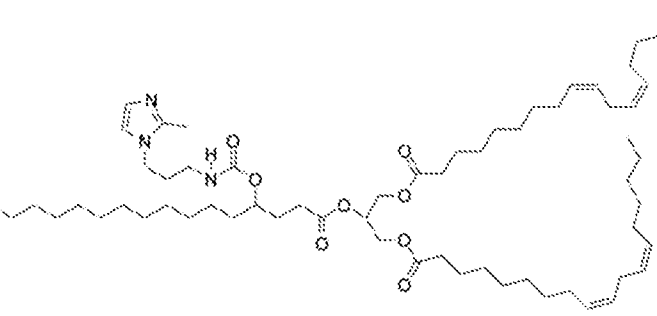
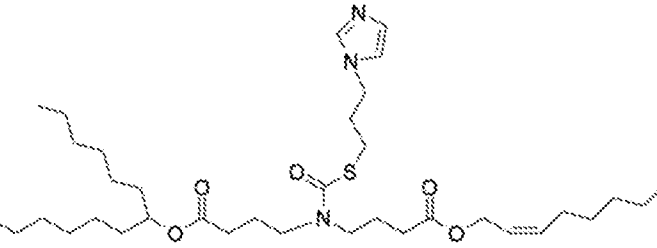
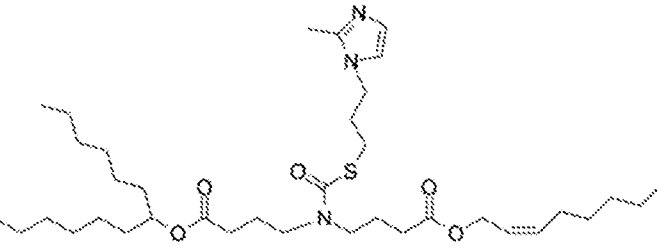
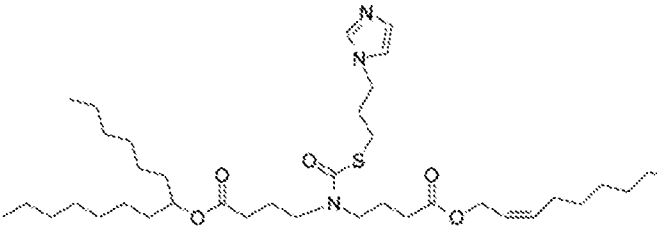
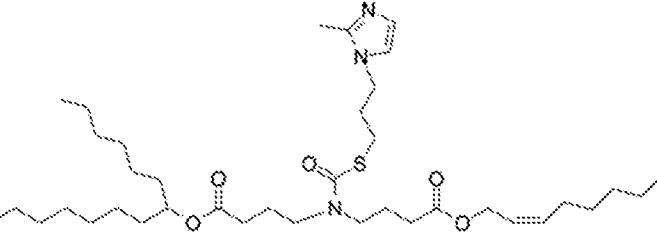
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
57	
58	
59	
60	
61	
62	
63	
64	

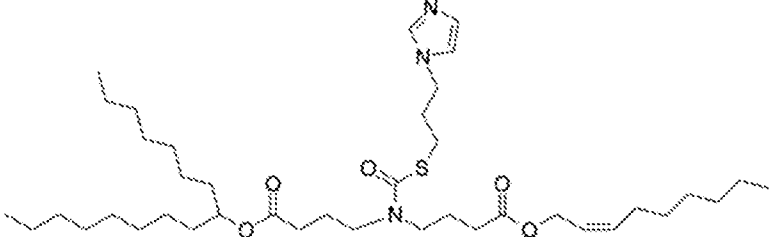
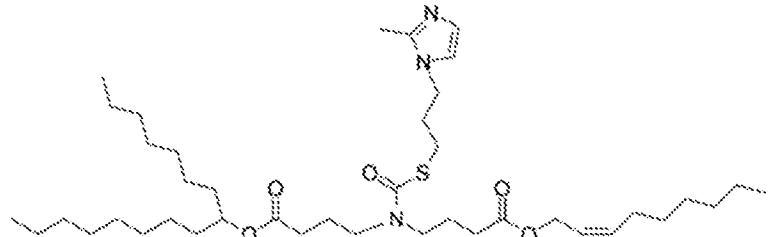
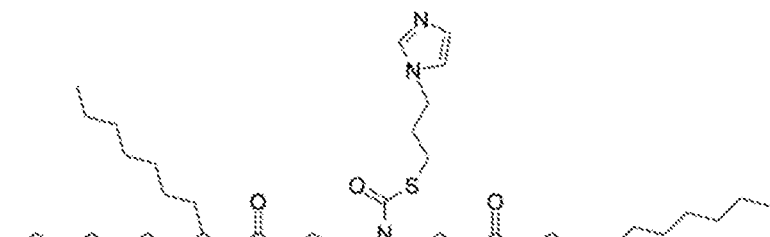
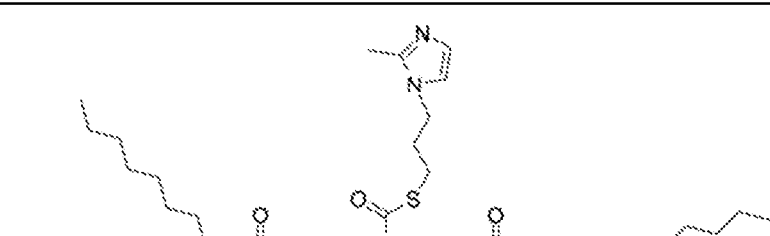
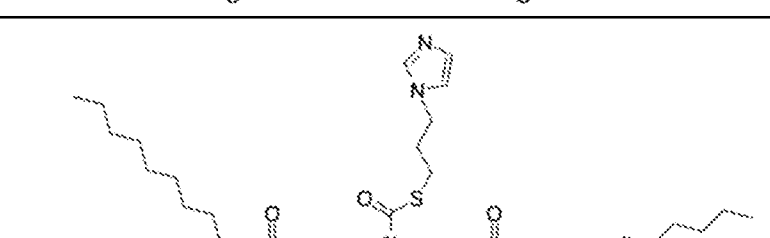
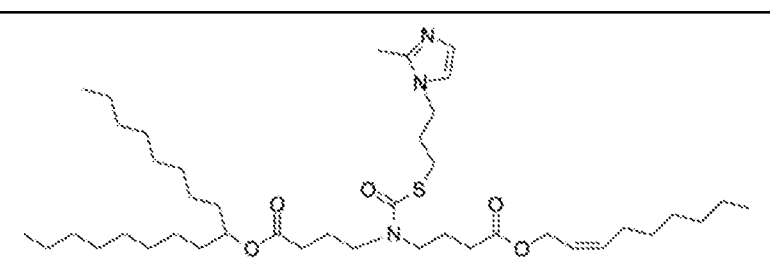
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
65	
66	
67	
68	
69	
70	

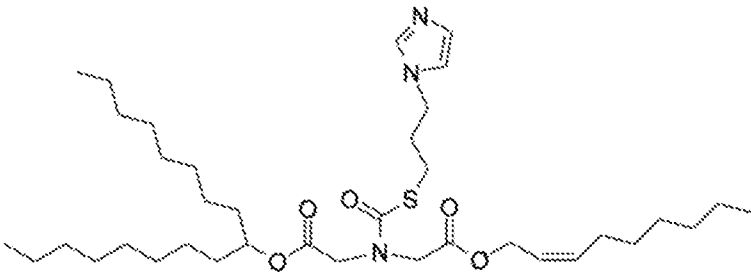
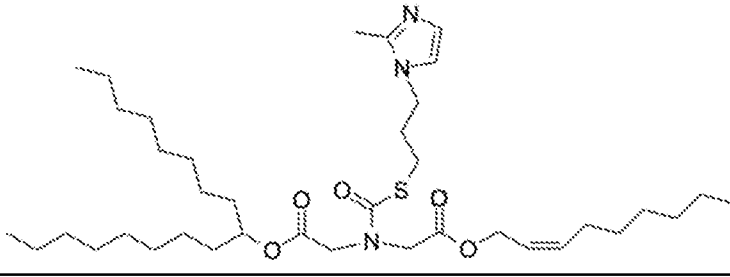
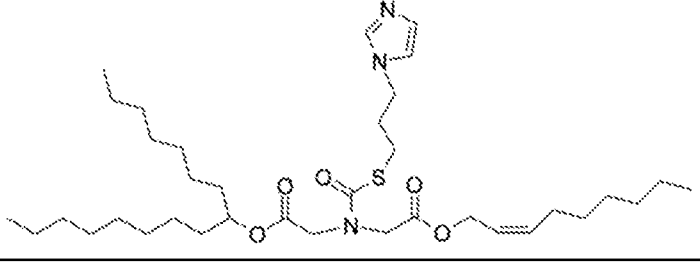
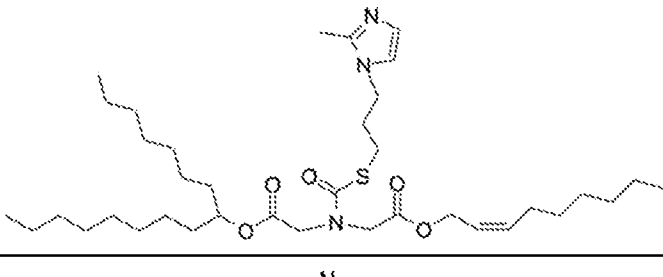
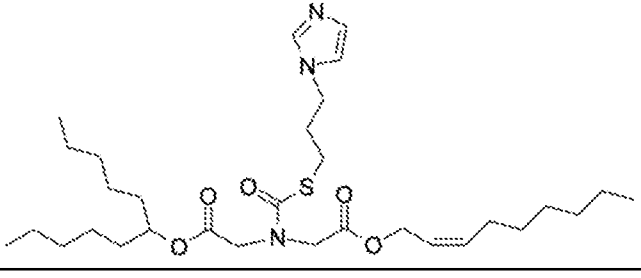
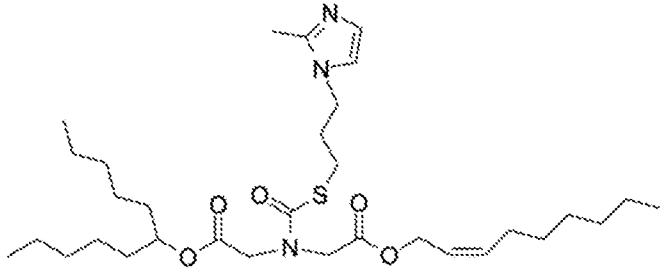
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
71	
72	
73	
74	
75	
76	

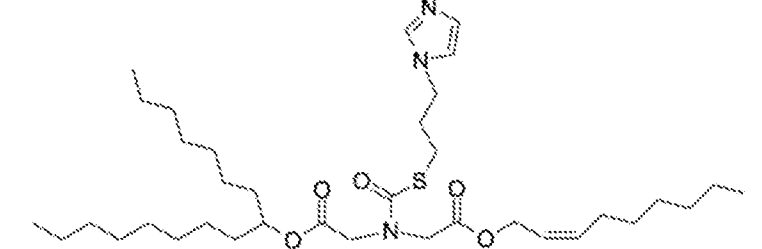
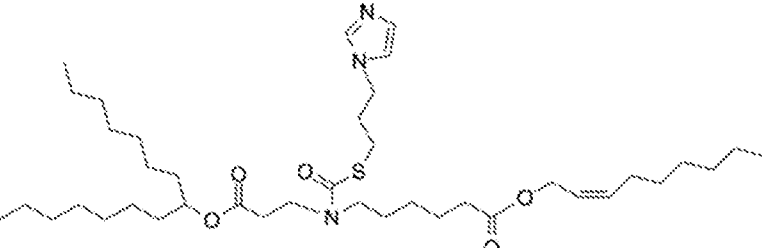
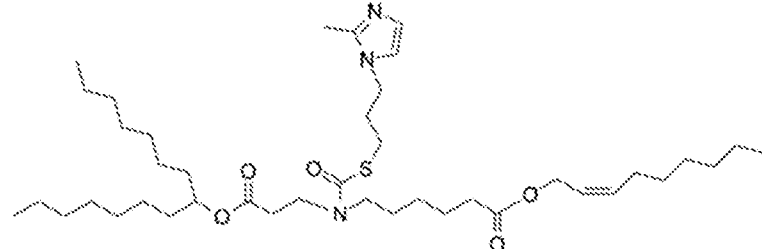
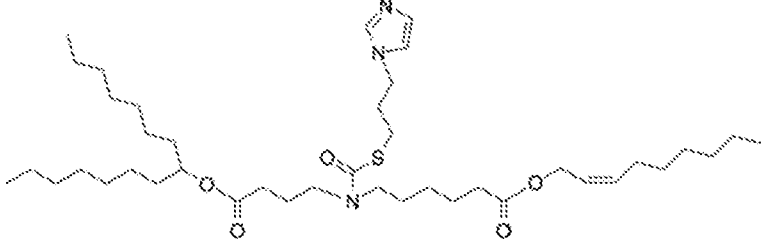
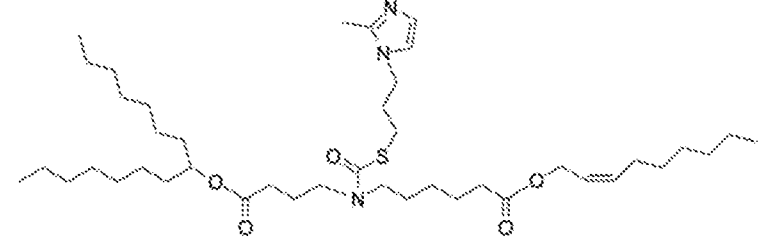
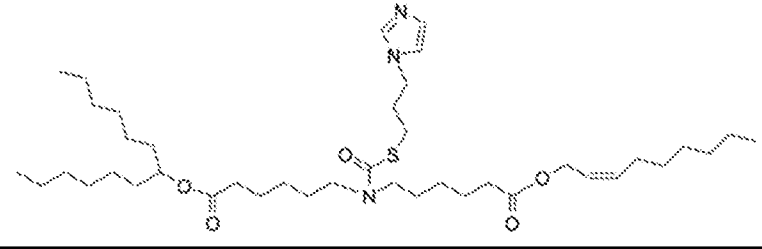
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
77	
78	
79	
80	
81	
82	

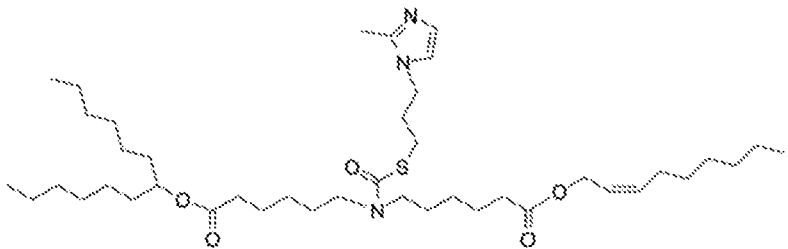
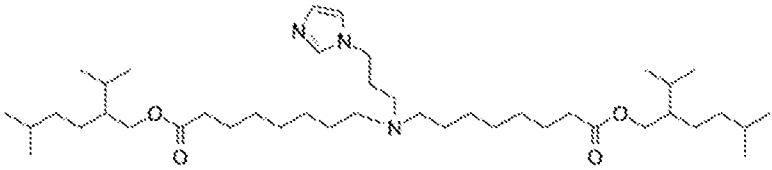
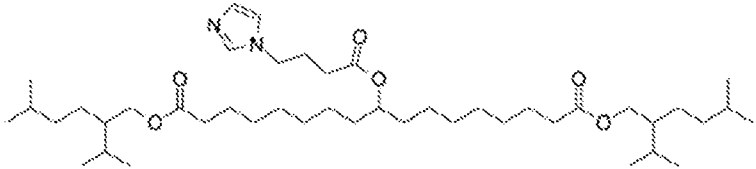
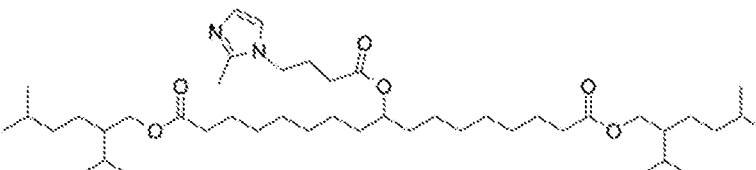
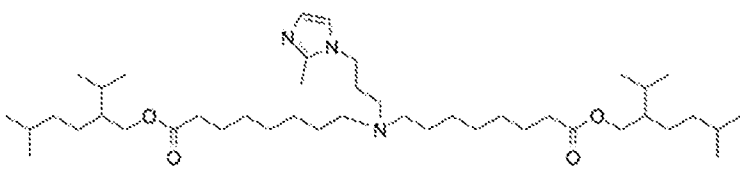
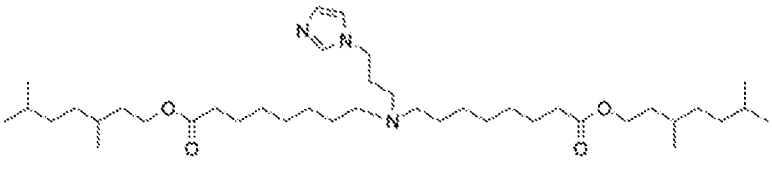
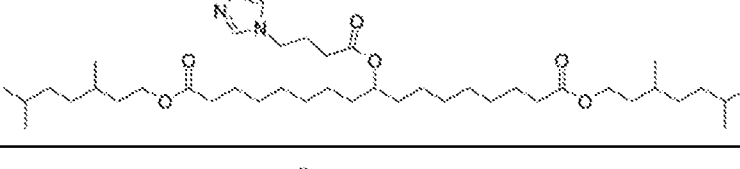
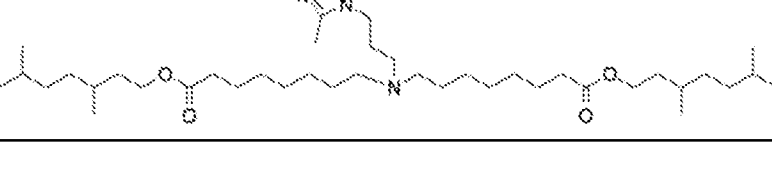
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
83	
84	
85	
86	
87	
88	

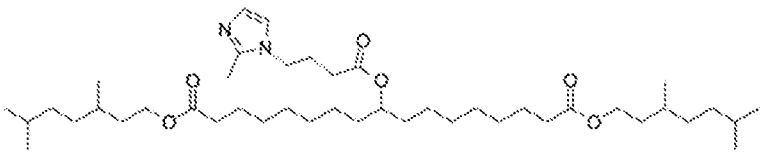
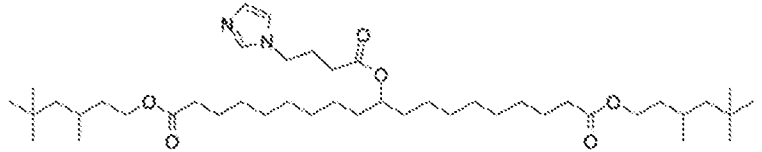
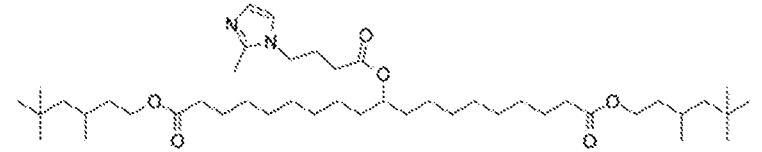
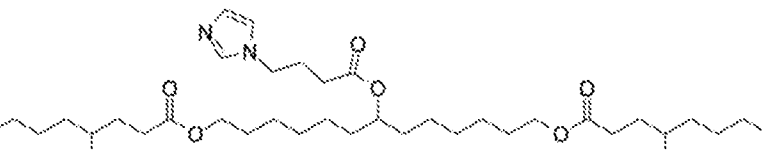
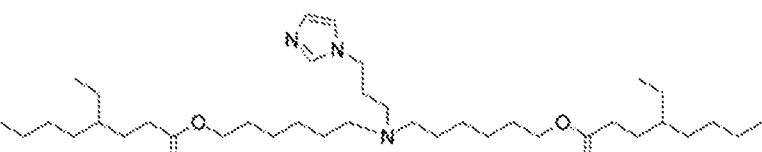
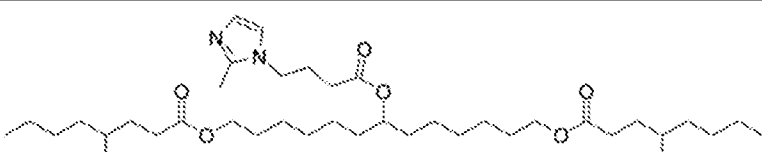
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
89	
90	
91	
92	
93	
94	

(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
95	
96	
97	
98	
99	
100	
101	
102	

(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
103	
104	
105	
106	
107	
108	
109	
110	
111	

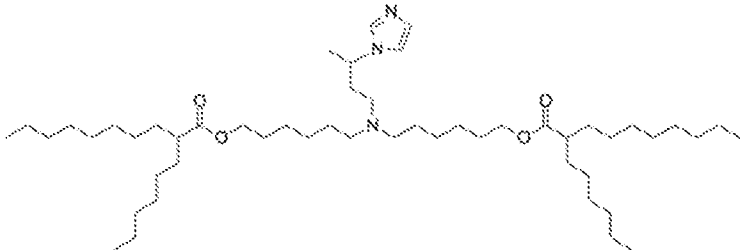
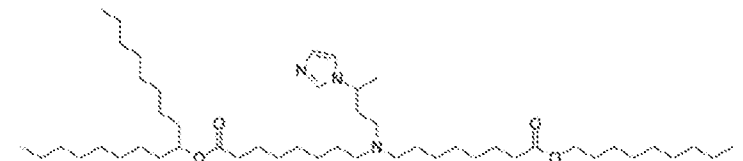
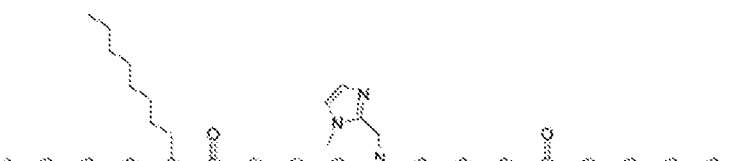
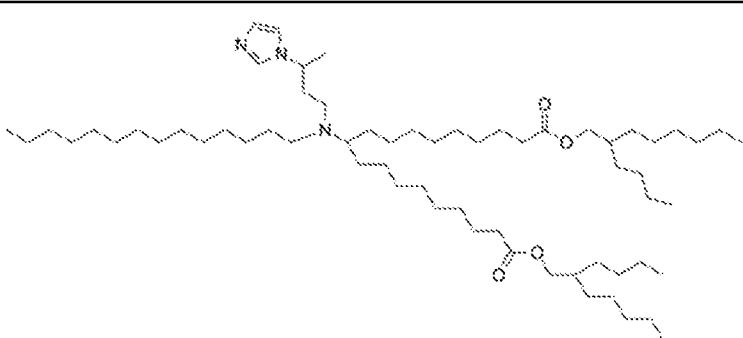
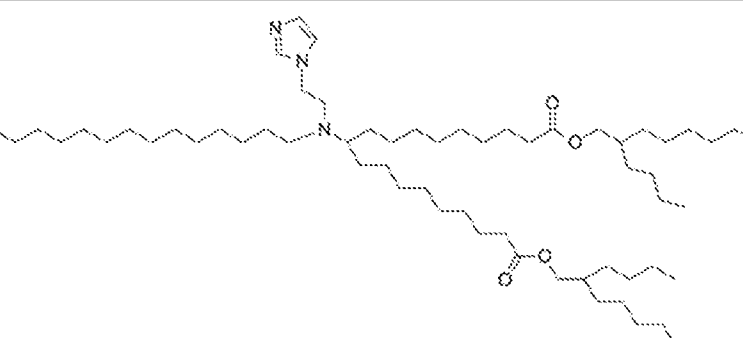
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
112	
113	
114	
115	
116	
117	
118	
119	
120	

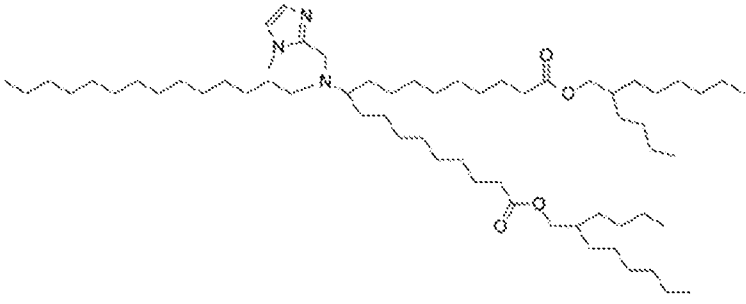
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
121	
122	
123	
124	
125	
126	
127	
128	
129	

(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
130	
131	
132	
133	
134	
135	

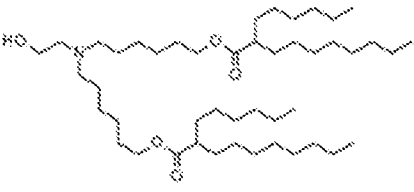
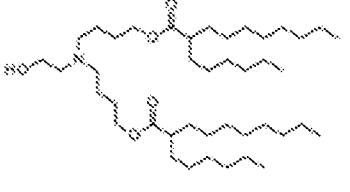
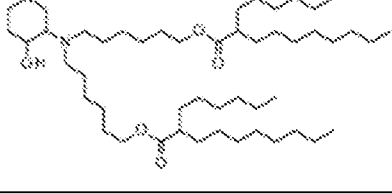
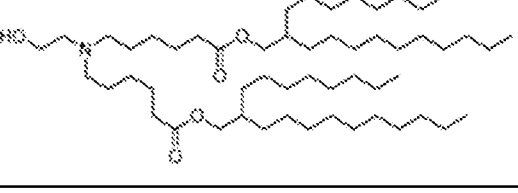
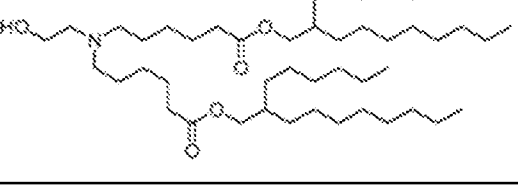
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
136	

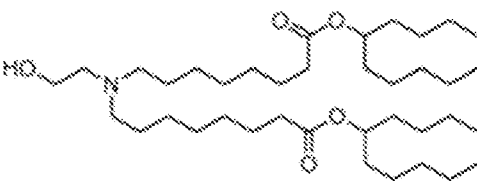
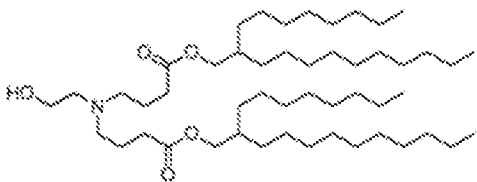
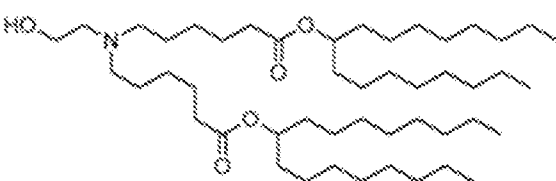
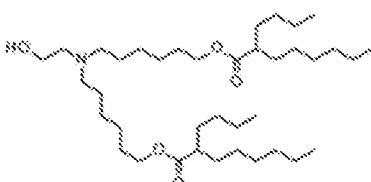
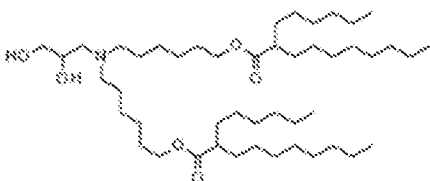
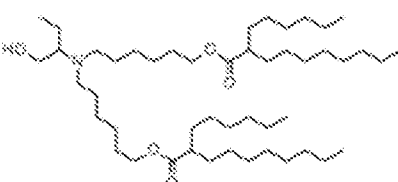
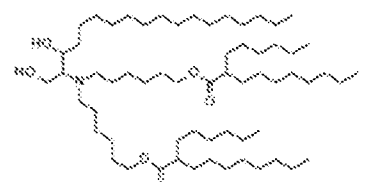
[0348] En algunas formas de realización, el lípido ionizable tiene un grupo principal de beta-hidroxilamina. En algunas formas de realización, el lípido ionizable tiene un grupo principal de gamma-hidroxilamina.

[0349] En algunas formas de realización, un lípido ionizable de la divulgación es un lípido seleccionado de la Tabla 10b. En algunas formas de realización, un lípido ionizable de la divulgación es el Lípido 15 de la Tabla 10b. En una forma de realización, el lípido ionizable se describe en la publicación de patente estadounidense número US20170210697A1. En una forma de realización, el lípido ionizable se describe en la publicación de patente estadounidense número US20170119904A1.

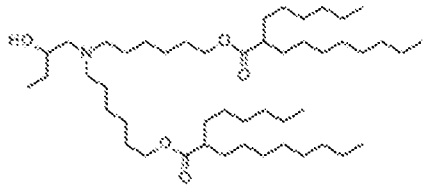
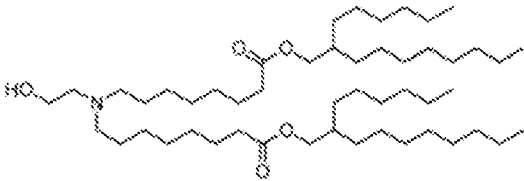
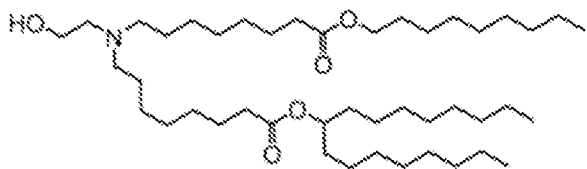
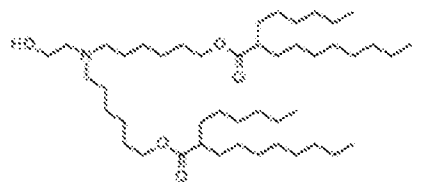
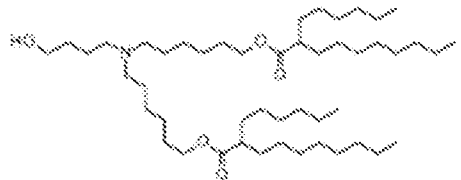
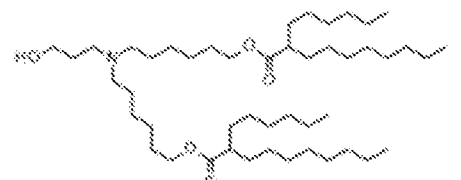
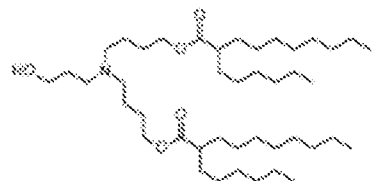
Tabla 10b

Nº de lípidos ionizables	Estructura
1	
2	
3	
4	
5	

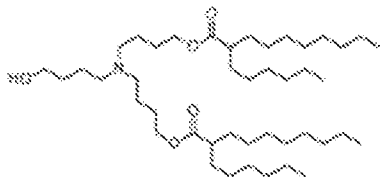
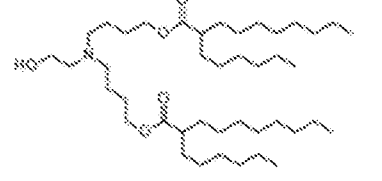
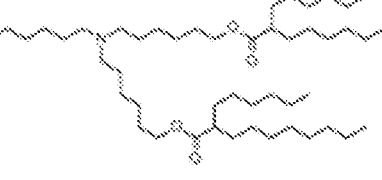
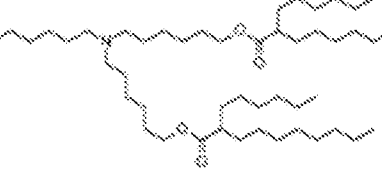
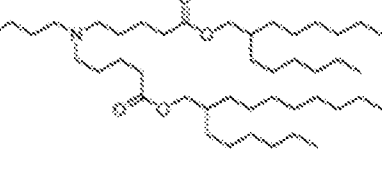
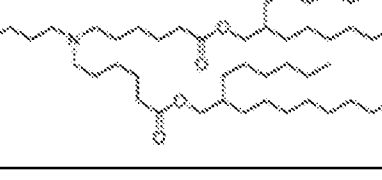
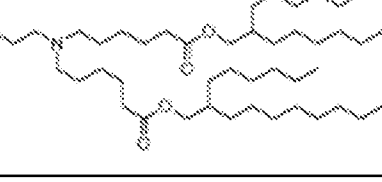
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	

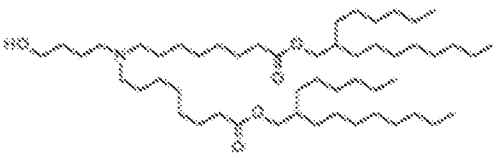
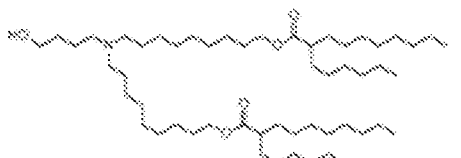
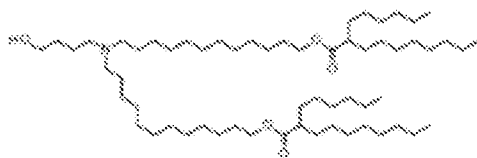
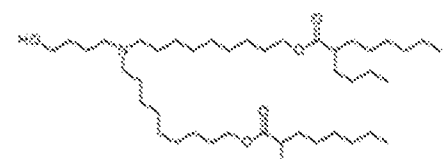
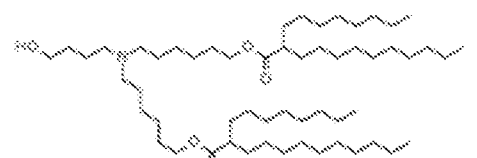
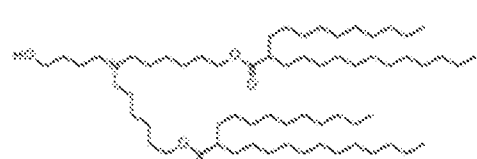
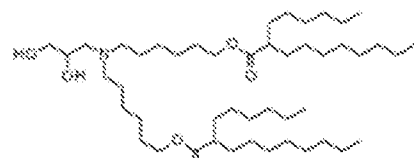
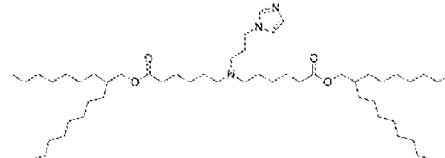
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	

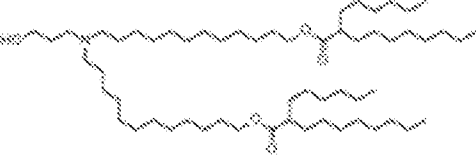
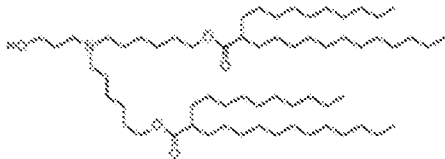
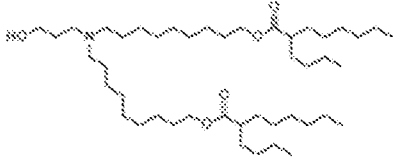
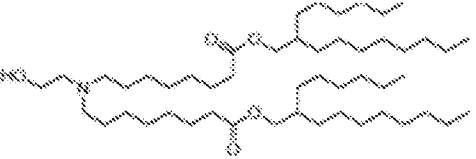
(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	

(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
5 27 10	
15 28	
20 29 25	
30 30	
35 31 40	
45 32 50	
55 33	
60 34 65	

(Continuación)

Nº de lípidos ionizables	Estructura
35	
36	
37	
38	

5.1 Lípidos de amina

[0350] En ciertas formas de realización, las composiciones de vehículos de transferencia para la administración de ARN circular comprenden un lípido de amina. En determinadas formas de realización, un lípido ionizable es una amina-lípido. En algunas formas de realización, una amina lipídica se describe en la solicitud de patente internacional PCT/US2018/053569.

[0351] Los lípidos de amina y otros lípidos biodegradables adecuados para su uso en los vehículos de transferencia, por ejemplo, nanopartículas lipídicas, descritos en el presente documento son biodegradables *in vivo*. Los lípidos de amina descritos en el presente documento tienen una toxicidad baja (por ejemplo, se toleran en modelos animales sin efectos adversos en cantidades mayores o iguales a 10 mg/kg). En determinadas formas de realización, los vehículos de transferencia que componen un lípido de amina incluyen aquellos en los que al menos el 75 % del lípido de amina se elimina del plasma en 8, 10, 12, 24 o 48 horas, o 3, 4, 5, 6, 7, o 10 días.

[0352] Los lípidos biodegradables incluyen, por ejemplo, los lípidos biodegradables de los documentos WO2017/173054, WO2015/095340 y WO2014/136086.

[0353] La eliminación de lípidos se puede medir mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Maier, MA, et al. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. Mol. Ther. 2013, 21(8), 1570-78.

[0354] Las composiciones de vehículos de transferencia que comprenden un lípido de amina pueden conducir a una mayor tasa de eliminación. En algunas formas de realización, la tasa de eliminación es una tasa de eliminación de lípidos, por ejemplo la tasa a la que se elimina un lípido de la sangre, suero o plasma. En algunas formas de realización, la tasa de eliminación es una tasa de eliminación de ARN, por ejemplo, la tasa a la que se elimina un ARNcirc de la sangre, suero o plasma. En algunas formas de realización, la tasa de eliminación es la tasa a la que los vehículos de transferencia se eliminan de la sangre, suero o plasma. En algunas formas de realización, la tasa de eliminación es la tasa a la que los vehículos de transferencia se eliminan de un tejido, tal como tejido hepático o tejido del bazo. En determinadas formas de realización, una alta tasa de eliminación conduce a un perfil de seguridad sin efectos adversos sustanciales. Los lípidos de amina y los lípidos biodegradables pueden reducir la acumulación de vehículos de transferencia en la circulación y en los

tejidos. En algunas formas de realización, una reducción en la acumulación del vehículo de transferencia en la circulación y en los tejidos conduce a un perfil de seguridad sin efectos adversos sustanciales.

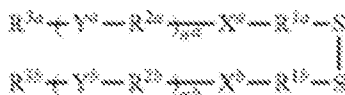
[0355] Los lípidos pueden ser ionizables dependiendo del pH del medio en el que se encuentran. Por ejemplo, en un medio ligeramente ácido, el lípido, tal como un lípido de amina, puede estar protonado y por tanto tener una carga positiva. Por el contrario, en un medio ligeramente básico, como, por ejemplo, sangre, donde el pH es aproximadamente 7,35, el lípido, como por ejemplo un lípido de amina, puede no ser protonado y por lo tanto no tener carga.

[0356] La capacidad de un lípido para soportar una carga está relacionada con su pKa intrínseco. En algunas formas de realización, cada uno de los aminalípidos de la presente divulgación puede tener, independientemente, un pKa en el intervalo de aproximadamente 5,1 a aproximadamente 7,4. En algunas formas de realización, los lípidos biodisponibles de la presente divulgación pueden tener cada uno, independientemente, un pKa en el intervalo de aproximadamente 5,1 a aproximadamente 7,4. Por ejemplo, cada uno de los aminalípidos de la presente divulgación puede tener, independientemente, un pKa en el intervalo de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,5. Los lípidos con un pKa que oscila entre aproximadamente 5,1 y aproximadamente 7,4 son eficaces para el suministro de carga *in vivo*, por ejemplo, al hígado. Además, se ha descubierto que los lípidos con un pKa que oscila entre aproximadamente 5,3 y aproximadamente 6,4 son eficaces para su administración *in vivo*, por ejemplo, en tumores. Véase, por ejemplo, WO2014/136086.

5.2 Lípidos que contienen un enlace disulfuro

[0357] En algunas formas de realización, el lípido ionizable se describe en la patente de EE. UU. 9.708.628.

[0358] La presente invención proporciona un lípido representado por la estructura (XXII):



[0359] En la estructura (XXII), X^a y X^b son cada uno independientemente X^1 o X^2 como se muestra a continuación.

$X^1 =$



$X^2 =$



[0360] R^4 en X^1 es un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, que puede ser lineal, ramificado o cíclico.

[0361] La s en X^2 es 1 o 2.

[0362] X^a puede ser igual o diferente de X^b , y X^a es preferiblemente el mismo grupo que X^b .

[0363] n^a y n^b son cada uno independientemente 0 o 1, preferiblemente 1.

[0364] R^{1a} y R^{1b} es independientemente un grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, que puede ser lineal o ramificado, preferiblemente lineal.

[0365] R^{2a} y R^{2b} es independientemente un grupo alquileo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, que puede ser lineal o ramificado, preferiblemente lineal.

[0366] Cuando X^a y X^b son cada uno X^1 , R^{2a} y R^{2b} son preferiblemente grupos trimetileno. Cuando X^a y X^b son cada uno de ellos X^2 , R^{2a} y R^{2b} son preferiblemente grupos etileno.

[0367] R^{2a} puede ser igual o diferente de R^{2b} , y R^{2a} es preferiblemente el mismo grupo que R^{2b} .

[0368] Y^a e Y^b son cada uno independientemente un enlace éter o un enlace urea, preferiblemente un enlace éster, un enlace amida o un enlace carbamato, lo más preferiblemente un enlace éster. Si bien la dirección de unión de Y^a e Y^b no está limitada, cuando Y^a es un enlace éster, es preferible una estructura de R^{3a} -CO-O- R^{2a} -, y cuando Y^b es un enlace éster, una estructura de R^{3b} -CO-O- R^{2b} - es preferible.

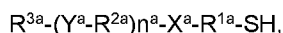
[0369] Y^a puede ser igual o diferente de Y^b , y Y^a es preferiblemente el mismo grupo que Y^b .

[0370] R^{3a} y R^{3b} son cada uno independientemente un residuo de estero, un residuo de vitamina liposoluble o un grupo hidrocarburo alifático que tiene 12-22 átomos de carbono, preferiblemente un residuo de vitamina liposoluble o un grupo hidrocarburo alifático que tiene 12-22 átomos de carbono, más preferiblemente un residuo de vitamina liposoluble. residuos de vitaminas.

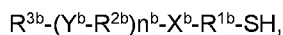
[0371] R^{3a} puede ser igual o diferente de R^{3b} , y R^{3a} es preferiblemente el mismo grupo que R^{3b} .

[0372] En una forma de realización, X^a es igual que X^b , n^a es igual que n^b , R^{1a} es igual que R^{1b} , R^{2a} es igual que R^{2b} , R^{3a} es igual que R^{3b} y Y^a es igual que Y^b .

[0373] Un lípido de la presente invención puede tener un enlace -S-S- (disulfuro). El método de producción de tal compuesto incluye, por ejemplo, un método que incluye producir



y



y

someterlos a oxidación (acoplamiento) para dar un compuesto que contiene -S-S-, método que incluye unir secuencialmente las partes necesarias a un compuesto que contiene un enlace -S-S- para obtener finalmente el compuesto de la presente invención y similares. El preferido es el último método.

5.4 Grupos hidrófilos

[0374] En ciertas formas de realización, el grupo o resto funcional hidrófilo seleccionado puede alterar o de otro modo impartir propiedades al compuesto o al vehículo de transferencia del cual dicho compuesto es un componente (por ejemplo, mejorando las eficiencias de transfección de una nanopartícula lipídica de la cual compuesto es un componente). Por ejemplo, la incorporación de guanidinio como grupo de cabeza hidrófilo en los compuestos descritos en el presente documento puede promover la fusogenicidad de dichos compuestos (o del vehículo de transferencia del que dichos compuestos son un componente) con la membrana celular de una o más células diana, mejorando así, por ejemplo, las eficiencias de transfección de tales compuestos. Se ha planteado la hipótesis de que el nitrógeno de la fracción hidrófila de guanidinio forma un estado de transición de anillo de seis miembros que otorga estabilidad a la interacción y, por lo tanto, permite la absorción celular de materiales encapsulados. (Wender, et al., Adv. Drug Del. Rev. (2008) 60: 452-472). De manera similar, la incorporación de uno o más grupos o restos amino en los compuestos divulgados (por ejemplo, como grupo principal) puede promover aún más la alteración de la membrana endosomal/lisosomal de la célula diana explotando la fusogenicidad de dichos grupos amino. Esto se basa no sólo en el pKa del grupo amino de la composición, sino también en la capacidad del grupo amino para experimentar una transición de fase hexagonal y fusionarse con la superficie de la célula diana, es decir, la membrana de la vesícula. (Koltover, et al. Science (1998) 281: 78-81.) Se cree que el resultado promueve la alteración de la membrana de la vesícula y la liberación del contenido de las nanopartículas lipídicas en la célula diana.

[0375] De manera similar, en ciertas formas de realización la incorporación de, por ejemplo, imidazol como un grupo de cabeza hidrófilo en los compuestos descritos en el presente documento puede servir para promover la liberación endosómica o lisosomal de, por ejemplo, contenidos que están encapsulados en un vehículo de transferencia (por ejemplo, nanopartícula lipídica) de la invención. Dicha liberación mejorada se puede lograr mediante uno o ambos de un mecanismo de disrupción mediado por una esponja de protón y/o un mecanismo de fusogenicidad mejorado. El mecanismo protón-esponja se basa en la capacidad de un compuesto, y en particular de un resto o grupo funcional del compuesto, para amortiguar la acidificación del endosoma. Esto puede manipularse o controlarse de otro modo mediante el pKa del compuesto o de uno o más de los grupos funcionales que comprenden dicho compuesto (por ejemplo, imidazol). Por consiguiente, en ciertas formas de realización la fusogenicidad de, por ejemplo, los compuestos a base de imidazol divulgados en el presente documento (por ejemplo, HGT4001 y HGT4004) están relacionados con las propiedades de alteración endosómica, que son facilitadas por tales grupos imidazol, que tienen un pKa más bajo en relación con otros lípidos ionizables tradicionales. Tales propiedades de alteración endosómica promueven a su vez el hinchamiento osmótico y la alteración de la membrana liposomal, seguido de la transfección o liberación intracelular de los materiales polinucleotídicos cargados o encapsulados en la misma en la célula diana. Este fenómeno puede ser aplicable a una variedad de compuestos con perfiles de pKa deseables además de un resto imidazol. Tales formas de realización también incluyen funcionalidades basadas en nitrógeno múltiple tales como poliaminas, polipéptidos (histidina) y estructuras dendríticas basadas en nitrógeno.

[0376] Lípidos ionizables y/o catiónicos ejemplares se describen en las publicaciones de patente PCT internacionales WO2015/095340, WO2015/199952, WO2018/011633, WO2017/049245, WO2015/061467, WO2012/040184,

WO2012/000104, WO 2015/074085, WO2016 /081029, WO2017/004 143, WO2017/075531, WO2017/117528, WO2011/022460, WO2013/148541, WO2013/116126, WO2011/153120, WO2012/044638, WO2012/054 365, WO2011/090965, WO2013/016058, WO2012/ 162210, WO2008/042973, WO2010/129709, WO2010/144740, WO2012/099755, WO2013/049328, WO2013/086322, WO2013/086373, WO2011/071860, WO2009/13 2131, WO2010/048536, WO2010/088537, WO2010/054401, WO2010/054406, WO2010/054405, WO2010/054384, WO2012/016184, WO2009/086558, WO2010/042877, WO2011/000106, WO2011/000107, WO2005/120152, WO2 011/141705, WO2013/126803, WO2006/007712, WO2011/038160, WO2005/121348, WO2011/066651, WO2009/127060, WO2011/141704, WO2006/069782, WO2012/031043, WO2013/006825, WO2013/033563, WO2013/0891 51, WO2017/099823, WO2015/095346 y WO2013/ 086354 y publicaciones de patentes de EE. UU. US2016/0311759, US2015/0376115, US2016/0151284, US2017/0210697, US2015/0140070, US2013/0178541, US2013/0303587, US2015/0141678, US2015/0239926, US2016/0376224, US2017/0119904, US2012/0149894, US2015/0057373, US2013/0090372, US2013/0274523, US2013/0274504, US2013/0274504, US2009/0023673, US2012/0128760, US2010/0324120, US2014/0200257, US2015/0203446, US2018/0005363, US2014/0308304, US2013/0338210, US2012/0101148, US2012/0027796, US2012/0058144, US2013/0323269, US2011/0117125, US2011/0256175, US2012/0202871, US2011/0076335, US2006/0083780, US2013/0123338, US2015/0064242, US2006/0051405, US2013/0065939, US2006/0008910, US2003/0022649, US2010/0130588, US2013/0116307, US2010/0062967, US2013/0202684, US2014/0141070, US2014/0255472, US2014/0039032, US2018/0028664, US2016/0317458, y US2013/0195920, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad. La solicitud de patente internacional WO 2019/131770 también se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

6. Lípidos PEG

[0377] Se contempla el uso y la inclusión de fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG) y lípidos derivatizados tales como ceramidas derivatizadas (PEG-CER), incluyendo N-octanoil-esfingosina-1-[succinil(metoxipolietilenglicol)-2000] (ceramida C8 PEG-2000) en las composiciones liposomales y farmacéuticas descritas en el presente documento, preferiblemente en combinación con uno o más de los compuestos y lípidos descritos en el presente documento. Los lípidos modificados con PEG contemplados incluyen, entre otros, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) alquílica(s) de longitud C6-C20. En algunas formas de realización, el lípido modificado con PEG empleado en las composiciones y métodos de la invención es 1,2-dimiristoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (PEG de PM 2000) "DMG-PEG2000". La adición de lípidos modificados con PEG al vehículo de administración de lípidos puede prevenir la agregación compleja y también puede proporcionar un medio para aumentar la vida útil en circulación y aumentar la administración de la composición de lípidos y polinucleótidos a los tejidos diana (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), o pueden seleccionarse para intercambiarse rápidamente fuera de la formulación *in vivo* (ver patente estadounidense nº 5.885.613). Lípidos intercambiables particularmente útiles son las ceramidas de PEG que tienen cadenas de acilo más cortas (por ejemplo, C14 o C18). El fosfolípido modificado con PEG y los lípidos derivatizados de la presente invención pueden comprender una proporción molar de aproximadamente 0 % a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 20 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 %, aproximadamente 4 % a aproximadamente 10 %. o aproximadamente el 2 % del lípido total presente en una nanopartícula lipídica liposomal.

[0378] En una forma de realización, un lípido modificado con PEG se describe en la Solicitud de patente internacional Nº PCT/US2019/015913, que se incorporan en este documento como referencia en su totalidad. En una forma de realización, un vehículo de transferencia comprende uno o más lípidos modificados con PEG.

[0379] Los ejemplos no limitantes de lípidos modificados con PEG incluyen fosfatidiletanolaminas y ácidos fosfatídicos modificados con PEG, conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20), dialquilaminas modificadas con PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. En algunas formas de realización adicionales, un lípido modificado con PEG puede ser, por ejemplo, PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC o un PEG-DSPE.

[0380] En algunas formas de realización adicionales, el lípido modificado con PEG incluye, pero no se limita a 1,2-dimiristoil-sn-glicerol metoxipolietilenglicol (PEG-DMG), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (PEG-DSPE), PEG-disterilglicerol (PEG-DSG), PEG-dipalmetoleilo, PEG-dioleilo, PEG-diestearilo, PEG-diacilglicerol (PEG-DAG), PEG-dipalmitoil fosfatidiletanolamina (PEG-DPPE), o PEG-1,2-dimiristiloxipropil-3-amina (PEG-c-DMA).

[0381] En diversas formas de realización, un lípido modificado con PEG también puede denominarse "lípido PEGilado" o "lípido PEG".

[0382] En una forma de realización, el PEG-lípido se selecciona del grupo que consiste en una fosfatidiletanolamina modificada con PEG, un ácido fosfatídico modificado con PEG, una ceramida modificada con PEG, una dialquilamina modificada con PEG, un diacilglicerol modificado con PEG, un dialquilglicerol modificado con PEG y mezclas de los mismos.

[0383] En algunas formas de realización, el resto lipídico de los lípidos PEG incluye aquellos que tienen longitudes de aproximadamente C₁₄ a aproximadamente C₂₂, tales como de aproximadamente C₁₄ a aproximadamente C₁₆. En algunas

formas de realización, un resto de PEG, por ejemplo un mPEG-NH₂, tiene un tamaño de aproximadamente 1.000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 10.000, aproximadamente 15.000 o aproximadamente 20.000 daltons. En una forma de realización, el PEG-lípido es PEG2k-DMG.

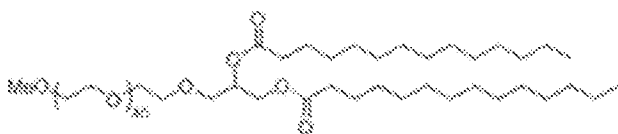
[0384] En una forma de realización, las nanopartículas lipídicas descritas en el presente documento pueden comprender un lípido modificado con un PEG no difusible. Los ejemplos no limitantes de PEG no difusibles incluyen PEG-DSG y PEG-DSPE.

[0385] Los lípidos PEG son conocidos en la técnica, tales como los descritos en las patentes de EE. UU. n° 8.158.601 y la Publ. de patente internacional n° WO2015/130584 A2, que se incorporan en este documento como referencia en su totalidad.

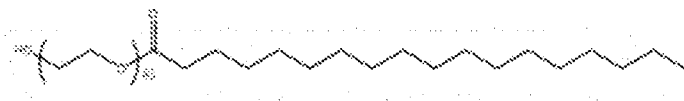
[0386] En diversas formas de realización, los lípidos (por ejemplo, lípidos PEG) descritos en el presente documento se pueden sintetizar como se describe en la patente internacional núm. Publ. N° PCT/US2016/000129, que se incorpora como referencia en su totalidad.

[0387] El componente lipídico de una composición de nanopartículas lipídicas puede incluir una o más moléculas que comprenden polietilenglicol, tales como PEG o lípidos modificados con PEG. Estas especies pueden denominarse alternativamente lípidos PEGilados. Un lípido PEG es un lípido modificado con polietilenglicol. Un lípido de PEG se puede seleccionar del grupo no limitante que incluye fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, ácidos fosfatídicos modificados con PEG, ceramidas modificadas con PEG, dialquilaminas modificadas con PEG, diacilglicérols modificados con PEG, dialquilglicérols modificados con PEG y mezclas de los mismos. Por ejemplo, un lípido PEG puede ser un lípido PEG-c-DMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC o PEG-DSPE.

[0388] En algunas formas de realización, los lípidos modificados con PEG son una forma modificada de PEG-DMG. PEG-DMG tiene la siguiente estructura:

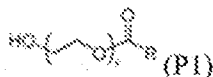


[0389] En algunas formas de realización, los lípidos modificados con PEG son una forma modificada de PEG-C18 o PEG-1. PEG-1 tiene la siguiente estructura:



[0390] En una forma de realización, los lípidos PEG útiles en la presente invención pueden ser lípidos PEGilados descritos en la Publicación Internacional n° WO2012099755, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Cualquiera de estos lípidos de PEG ejemplares descritos en el presente documento puede modificarse para comprender un grupo hidroxilo en la cadena de PEG. En determinadas formas de realización, el lípido PEG es un lípido PEG-OH. En determinadas formas de realización, el lípido PEG-OH incluye uno o más grupos hidroxilo en la cadena de PEG. En determinadas formas de realización, un PEG-OH o un lípido hidroxil-PEGilado comprende un grupo -OH en el extremo de la cadena de PEG. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

[0391] En algunas formas de realización, el lípido PEG es un compuesto de Fórmula (P1):



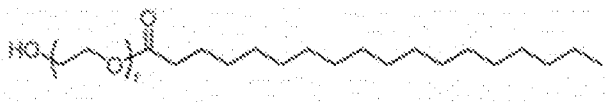
o una sal o isómero del mismo, en el que:

r es un número entero entre 1 y 100;

R es alquilo C₁₀₋₄₀, alquénilo C₁₀₋₄₀ o alquinilo C₁₀₋₄₀; y opcionalmente uno o más grupos metileno de R se reemplazan independientemente con carbociclileno C₃₋₁₀, heterociclileno de 4 a 10 miembros, arileno C₆₋₁₀, heteroarileno de 4 a 10 miembros, -N(R^N)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)N(R^N)-, -NR^NC(O)-, -NR^NC(O)N(R^N)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -OC(O)O-, -OC(O)N(R^N)-, -NR^NC(O)O-, -C(O)S-, -SC(O)-, -C(=NR^N)-, -C(=NR^N)N(R^N)-, -NR^NC(=NR^N)-, -NR^NC(=NR^N)N(R^N)-, -C(S)-, -C(S)N(R^N)-, -NR^NC(S)-, -NR^NC(S)N(R^N)-, -S(O)-, -OS(O)-, -S(O)O-, -OS(O)O-, -OS(O)₂-, -S(O)₂O-, -OS(O)₂O-, -N(R^N)S(O)-, -S(O)N(R^N)-, -N(R^N)S(O)N(R^N)-, -OS(O)N(R^N)-, -N(R^N)S(O)O-, -S(O)₂-, -N(R^N)S(O)₂-, -S(O)₂N(R^N)-, -N(R^N)S(O)₂N(R^N)-, -OS(O)₂N(R^N)-, o -N(R^N)S(O)₂O-; y

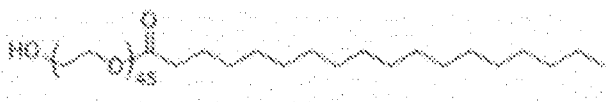
cada caso de R^N es independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-6} o un grupo protector de nitrógeno.

[0392] Por ejemplo, R es alquilo C17. Por ejemplo, el lípido PEG es un compuesto de Fórmula (P1-a):



o una sal o isómero del mismo, en el que r es un número entero entre 1 y 100.

[0393] Por ejemplo, el lípido PEG es un compuesto de la siguiente fórmula:



7. Lípidos auxiliares

[0394] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia (por ejemplo, NPL) descrito en el presente documento comprende uno o más lípidos auxiliares no catiónicos. En algunas formas de realización, el lípido auxiliar es un fosfolípido. En algunas formas de realización, el lípido auxiliar es sustituto o reemplazo de fosfolípidos. En algunas formas de realización, el fosfolípido o sustituto de fosfolípido puede ser, por ejemplo, uno o más fosfolípidos saturados o (poli)insaturados, o sustitutos de fosfolípidos, o una combinación de los mismos. En general, los fosfolípidos comprenden un resto fosfolípido y uno o más restos de ácidos grasos.

[0395] Un resto fosfolípido se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo no limitante que consiste en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, 2-lisofosfatidilcolina y una esfingomielina.

[0396] Un resto de ácido graso se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo no limitante que consiste en ácido láurico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido erúxico, ácido fitanoico, ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido behénico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico.

[0397] Los fosfolípidos incluyen, entre otros, glicerofosfolípidos tales como fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles, fosfatidigliceroles y ácidos fosfatídicos. Los fosfolípidos también incluyen fosfosfingolípidos, como la esfingomielina.

[0398] En algunas formas de realización, el lípido auxiliar es un análogo de 1,2-distearoil-177-glicero-3-fosfocolina (DSPC), un sustituto de DSPC, ácido oleico o un análogo de ácido oleico.

[0399] En algunas formas de realización, un lípido auxiliar es un lípido zwitteriónico no fosfatidilcolina (PC), un análogo de DSPC, ácido oleico, un análogo de ácido oleico o un sustituto de DSPC.

[0400] En algunas formas de realización, un lípido auxiliar se describe en PCT/US2018/053569. Los lípidos auxiliares adecuados para su uso en una composición lipídica de la divulgación incluyen, por ejemplo, una variedad de lípidos neutros, no cargados o zwitteriónicos. Dichos lípidos auxiliares se usan preferiblemente en combinación con uno o más de los compuestos y lípidos descritos en el presente documento. Ejemplos de lípidos auxiliares incluyen, entre otros, 5-heptadecilbenceno-1,3-diol (resorcinol), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), pofosfocolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), dilauriloilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoil fosfatidilcolina (PMPC), 1-palmitoil-2-estearoil fosfatidilcolina (PSPC), 1,2-diaraquidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DBPC), 1-estearoil-2-palmitoil fosfatidilcolina (SPPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoyioleoil fosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidilcolina, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dilinoleoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), palmitoileoil fosfatidiletanolamina (POPE), lisofosfatidiletanolamina y combinaciones de los mismos. En una forma de realización, el lípido auxiliar puede ser distearoilfosfatidilcolina (DSPC) o dimiristoilfosfatidil etanolamina (DMPE). En otra forma de realización, el lípido auxiliar puede ser distearoilfosfatidilcolina (DSPC). Los lípidos auxiliares funcionan para estabilizar y mejorar el procesamiento de los vehículos de transferencia. Dichos lípidos auxiliares se usan preferiblemente en combinación con otros excipientes, por ejemplo, uno o más de los lípidos ionizables descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, cuando se usa en combinación con un lípido ionizable, el lípido auxiliar puede comprender una proporción molar del 5 % a aproximadamente el 90 %, o de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 70 % del lípido total presente en la nanopartícula lipídica.

8. Lípidos estructurales

[0401] En una forma de realización, un lípido estructural se describe en la solicitud de patente internacional PCT/US2019/015913.

[0402] Los vehículos de transferencia descritos en el presente documento comprenden uno o más lípidos estructurales. La incorporación de lípidos estructurales en la nanopartícula lipídica puede ayudar a mitigar la agregación de otros lípidos en la partícula. Los lípidos estructurales pueden incluir, entre otros, colesterol, fecosterol, ergosterol, bassicasterol, tomatidina, tomatina, ursólico, alfa-tocoferol y mezclas de los mismos. En determinadas formas de realización, el lípido estructural es colesterol. En determinadas formas de realización, el lípido estructural incluye colesterol y un corticosteroide (tal como, por ejemplo, prednisolona, dexametasona, prednisona e hidrocortisona), o una combinación de los mismos.

[0403] En algunas formas de realización, el lípido estructural es un esteroide. En determinadas formas de realización, el lípido estructural es un esteroide. En determinadas formas de realización, el lípido estructural es colesterol. En determinadas formas de realización, el lípido estructural es un análogo del colesterol. En determinadas formas de realización, el lípido estructural es alfa-tocoferol.

[0404] Los vehículos de transferencia descritos en este documento comprenden uno o más lípidos estructurales. La incorporación de lípidos estructurales en un vehículo de transferencia, por ejemplo, una nanopartícula lipídica, puede ayudar a mitigar la agregación de otros lípidos en la partícula. En determinadas formas de realización, el lípido estructural incluye colesterol y un corticosteroide (tal como, por ejemplo, prednisolona, dexametasona, prednisona e hidrocortisona), o una combinación de los mismos.

[0405] En algunas formas de realización, el lípido estructural es un esteroide. Los lípidos estructurales pueden incluir, entre otros, esteroides (por ejemplo, fitoesteroides o zooesteroides).

[0406] En ciertas formas de realización, el lípido estructural es un esteroide. Por ejemplo, los esteroides pueden incluir, entre otros, colesterol, β -sitosterol, fecosterol, ergosterol, sitosterol, campesterol, estigmasterol, brasicasterol, ergosterol, tomatidina, tomatina, ácido ursólico o alfa-tocoferol.

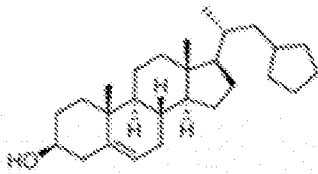
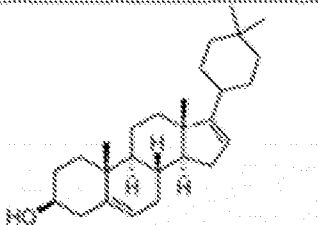
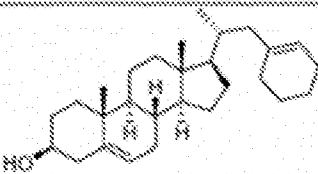
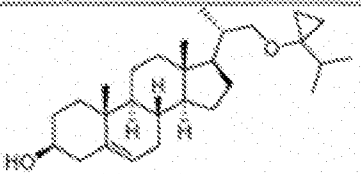
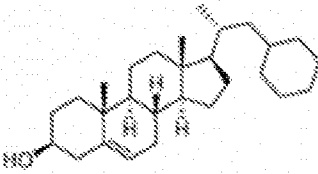
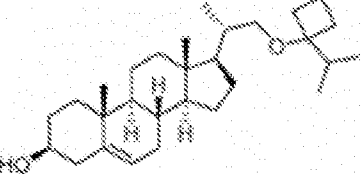
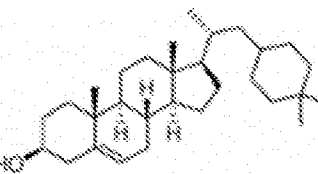
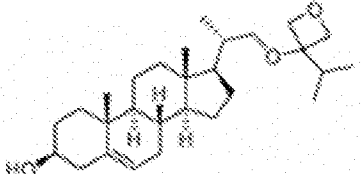
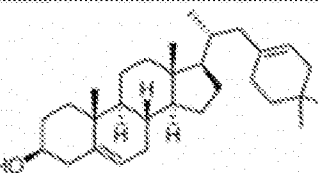
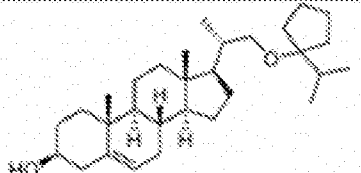
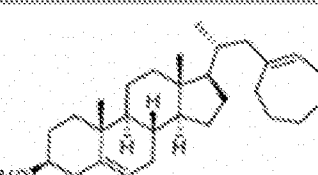
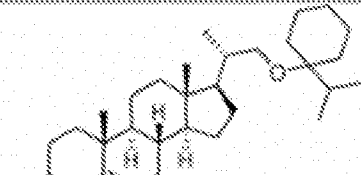
[0407] En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia incluye una cantidad eficaz de un lípido potenciador del suministro de células inmunitarias, por ejemplo, un análogo del colesterol o un aminolípido o una combinación de los mismos, que, cuando está presente en un vehículo de transferencia, por ejemplo, una nanopartícula lipídica, puede funcionar mejorando la asociación y/o captación celular, internalización, tráfico y/o procesamiento intracelular y/o escape endosómico y/o puede mejorar el reconocimiento y/o la unión a células inmunitarias, en relación con un vehículo de transferencia que carece de suministro de células inmunitarias potenciador de lípidos. Por consiguiente, aunque no se pretende limitarse a ningún mecanismo o teoría particular, en una forma de realización, un lípido estructural u otro lípido potenciador de la administración de células inmunitarias de la divulgación se une a C1q o promueve la unión de un vehículo de transferencia que comprende dicho lípido a C1q. Por lo tanto, para el uso *in vitro* de los vehículos de transferencia de la divulgación para la administración de una molécula de ácido nucleico a una célula inmune, se usan condiciones de cultivo que incluyen C1q (por ejemplo, uso de medios de cultivo que incluyen suero o adición de C1q exógeno a medios libres de suero). Para el uso *in vivo* de los vehículos de transferencia de la divulgación, el requisito de C1q lo proporciona el C1q endógeno.

[0408] En determinadas formas de realización, el lípido estructural es colesterol. En determinadas formas de realización, el lípido estructural es un análogo del colesterol. En algunas formas de realización, el lípido estructural es un lípido de la Tabla 16:

Tabla 16

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
1		22	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
2		23	
3		24	
4		25	
5		26	
6		27	
7		28	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
8		29	
9		30	
10		31	
11		32	
12		33	
13		34	

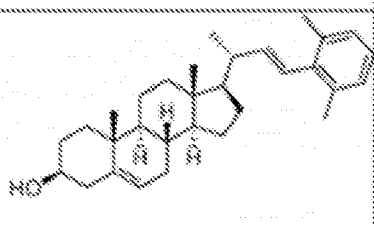
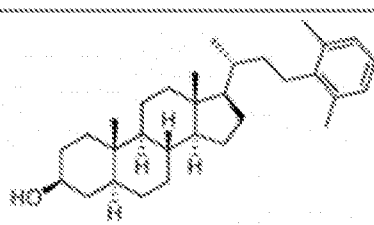
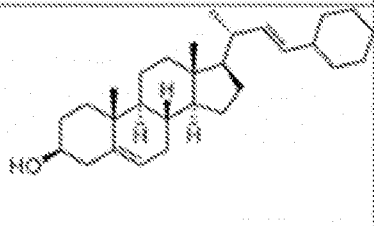
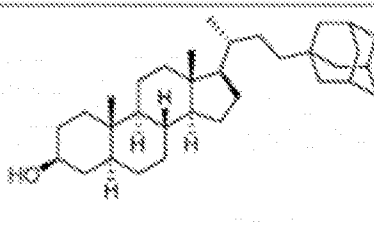
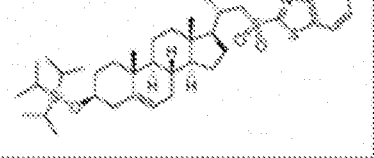
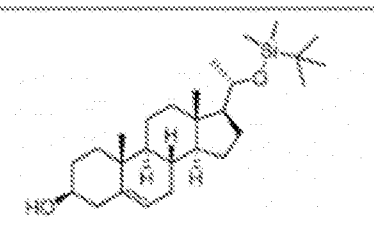
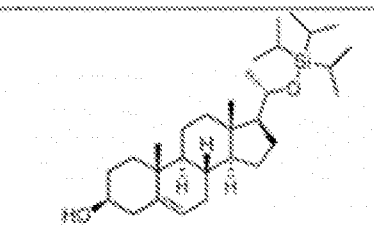
(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
14		35	
15		36	
16		37	
17		38	
18		39	
19		40	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
20		41	
21		42	
150		165	
154		169	
162		170	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
163		171	
164		172	
184			
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
43		47	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
44		48	
45		49	
46		50	
175		177	
176		178	

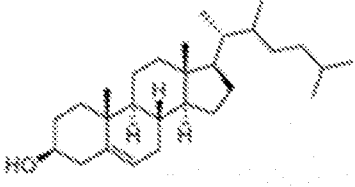
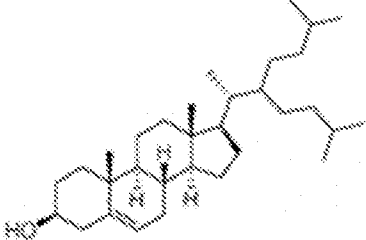
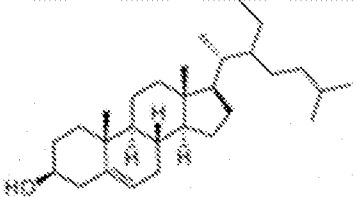
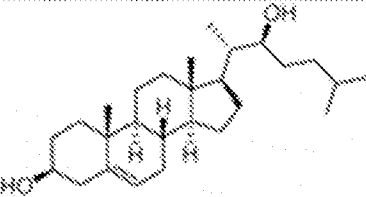
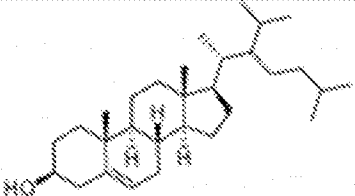
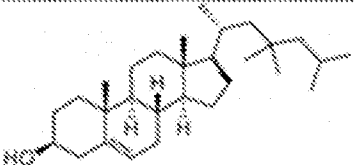
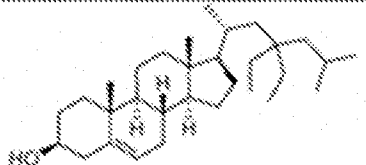
(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
51		60	
52		61	
53		62	
54		63	
55		64	
56		65	
57		66	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
58		67	
59		149	
153			
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
68		71	
69		72	
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
70		73	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
74		77	
75		78	
76			
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
79		80	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
81		85	
82		86	
83		87	
84		152	
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
157			

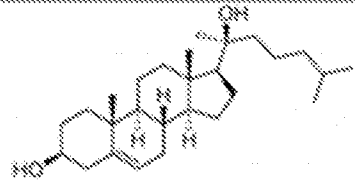
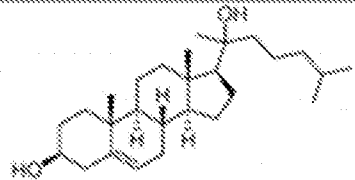
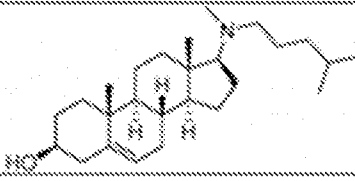
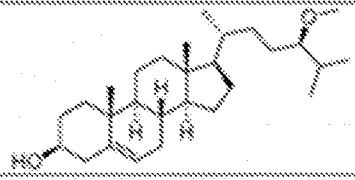
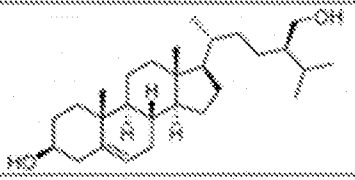
(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
88		93	
89		94	
90		95	
91		96	
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
92		97	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
98		102	
99		103	
100		104	
101		105	
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
180		182	
181			
Comp. N° S.	Estructura		
106			

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
107		108	
Comp. N° S.	Estructura		
109			
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
110		121	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
111		122	
112		123	
113		124	
114		125	
115		126	
116		127	
117		128	

(Continuación)

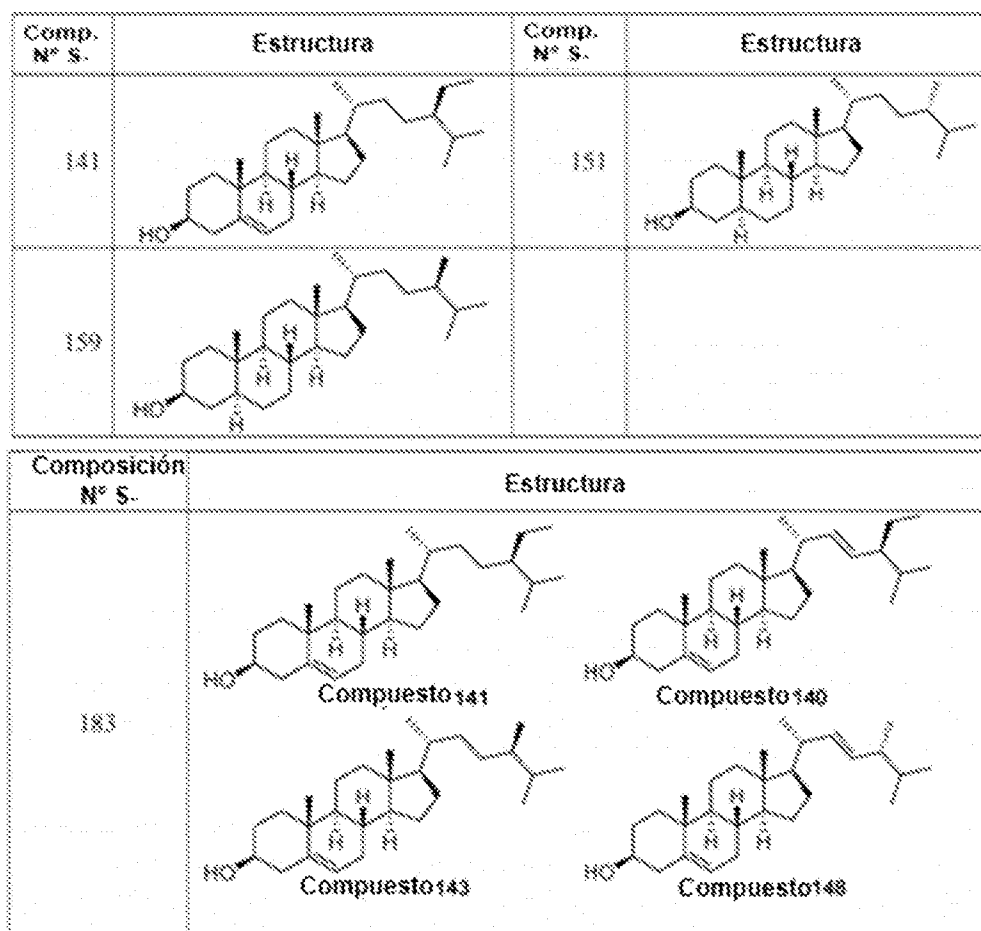
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
118		129	
119		130	
120		155	
156		167	
158		168	
160		173	

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
161		174	
166		179	
Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
131		133	
132			

(Continuación)

Comp. N° S.	Estructura	Comp. N° S.	Estructura
134		142	
135		143	
136		144	
137		145	
138		146	
139		147	
140		148	



9. Formulaciones de NPL

[0409] La formación de una nanopartícula lipídica (NPL) descrita en el presente documento se puede lograr mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, como se describe en la Pub. de patente de EE. UU. N° US2012/0178702 A1, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Ejemplos no limitantes de composiciones de nanopartículas lipídicas y métodos para prepararlas se describen, por ejemplo, en Semple et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:172-176; Jayarama et al. (2012), Angew. Chem. Int. Ed., 51:8529-8533; y Maier et al. (2013) Molecular Therapy 21, 1570-1578 (cuyo contenido de cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad).

[0410] En una forma de realización, la formulación de NPL se puede preparar mediante, por ejemplo, los métodos descritos en la pub. de la patente internacional n° N° WO 2011/127255 o WO 2008/103276, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

[0411] En una forma de realización, las formulaciones de NPL descritas en el presente documento pueden comprender una composición policationica. Como ejemplo no limitante, la composición policationica puede ser una composición seleccionada de las Fórmulas 1-60 de la Patente de EE. UU. Pub. N° US2005/0222064 A1, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0412] En una forma de realización, la nanopartícula lipídica se puede formular mediante los métodos descritos en la Pub. de patente de EE. UU. N° US2013/0156845 A1, y la patente internacional. Pub. N° WO2013/093648 A2 o WO2012/024526 A2, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0413] En una forma de realización, las nanopartículas lipídicas descritas en el presente documento se pueden preparar en un entorno estéril mediante el sistema y/o métodos descritos en la Pub. de patente de EE. UU. N° US2013/0164400 A1, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0414] En una forma de realización, la formulación de NPL se puede formular en una nanopartícula tal como una molécula de la partícula de ácido nucleico-lípido descrita en la patente de EE. UU. N° 8.492.359, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0415] Una composición de nanopartículas puede comprender opcionalmente uno o más recubrimientos. Por ejemplo, se puede formular una composición de nanopartículas en una cápsula, película o tableta que tenga un recubrimiento. Una cápsula, película o tableta que incluye una composición descrita en el presente documento puede tener cualquier tamaño, resistencia a la tracción, dureza o densidad útiles.

[0416] En algunas formas de realización, las nanopartículas lipídicas descritas en el presente documento se pueden sintetizar usando métodos que comprenden mezcladores de microfluidos. Los mezcladores de microfluidos ejemplares pueden incluir, entre otros, un micromezclador interdigital de hendidura que incluye, entre otros, los fabricados por Precision Nanosystems (Vancouver, BC, Canadá), Microinnova (Allerheiligen bei Wildon, Austria) y/o un mezclador en forma de espina de pescado escalonada. micromezclador (SHM) (Zhigaltsev, IV et al. (2012) Langmuir. 28:3633-40; Belliveau, NM et al. Mol. Ther. Nucleic. Acids. (2012) 1:e37; Chen, D. et al. J. Am. Chem. Soc. (2012) 134(16):6948-51; cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad).

[0417] En algunas formas de realización, los métodos de generación de NPL que comprenden SHM comprenden además la mezcla de al menos dos corrientes de entrada en las que la mezcla se produce mediante advección caótica inducida por microestructura (MICA). Según este método, las corrientes de fluido fluyen a través de canales presentes en un patrón en espiga provocando un flujo rotacional y plegando los fluidos entre sí. Este método también puede comprender una superficie para mezclar fluidos en la que la superficie cambia de orientación durante el ciclo del fluido. Los métodos para generar NPL utilizando SHM incluyen los descritos en las Pub. de las patentes de EE. UU. N^{os} US2004/0262223 A1 y US2012/0276209 A1, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0418] En una forma de realización, las nanopartículas lipídicas se pueden formular usando un micromezclador tal como, entre otros, un mezclador microestructurado interdigital con hendidura (SIMM-V2) o un micromezclador interdigital con hendidura estándar (SSIMM) o Caterpillar (CPMM). o Impinging-jet (IJMM) del Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, Mainz Alemania). En una forma de realización, las nanopartículas lipídicas se crean usando tecnología de microfluidos (véase Whitesides (2006) Nature. 442: 368-373; y Abraham et al. (2002) Science. 295: 647-651; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). Como ejemplo no limitante, la formulación de microfluidos controlada incluye un método pasivo para mezclar corrientes de flujos impulsados por presión constante en microcanales a un número de Reynolds bajo (véase, por ejemplo, Abraham et al. (2002) Science. 295: 647651; que se encuentra en el presente documento incorporado como referencia en su totalidad).

[0419] En una forma de realización, el ARNcirc de la presente invención se puede formular en nanopartículas lipídicas creadas usando un chip micromezclador como, entre otros, los de Harvard Apparatus (Holliston, MA), Dolomite Microfluidics (Royston, Reino Unido), o Precision Nanosystems (Van Couver, BC, Canadá). Se puede utilizar un chip micromezclador para mezclar rápidamente dos o más corrientes de fluido con un mecanismo de división y recombinación.

[0420] En una forma de realización, las nanopartículas lipídicas pueden tener un diámetro de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nm, tal como, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 nm, aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nm, aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nm, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nm, aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nm, aproximadamente 10 a aproximadamente 70 nm, aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nm, aproximadamente 10 a aproximadamente 90 nm, aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nm, aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nm, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nm, aproximadamente 20 a aproximadamente 60 nm, aproximadamente 20 a aproximadamente 70 nm, aproximadamente 20 a aproximadamente 80 nm, aproximadamente 20 a aproximadamente 90 nm, aproximadamente 20 a aproximadamente 100 nm, aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nm, aproximadamente 30 a aproximadamente 50 nm, aproximadamente 30 a aproximadamente 60 nm, aproximadamente 30 a aproximadamente 70 nm, aproximadamente 30 a aproximadamente 80 nm, aproximadamente 30 a aproximadamente 90 nm, aproximadamente 30 a aproximadamente 100 nm, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nm, aproximadamente 40 a aproximadamente 60 nm, aproximadamente 40 a aproximadamente 70 nm, aproximadamente 40 a aproximadamente 80 nm, aproximadamente 40 a aproximadamente 90 nm, aproximadamente 40 a aproximadamente 100 nm, aproximadamente 50 a aproximadamente 60 nm, aproximadamente 50 a aproximadamente 70 nm, aproximadamente 50 a aproximadamente 80 nm, aproximadamente 50 a aproximadamente 90 nm, aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nm, aproximadamente 60 a aproximadamente 70 nm, aproximadamente 60 a aproximadamente 80 nm, aproximadamente 60 a aproximadamente 90 nm, aproximadamente 60 a aproximadamente 100 nm, aproximadamente 70 a aproximadamente 80 nm, aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, aproximadamente 70 a aproximadamente 100 nm, aproximadamente 80 a aproximadamente 90 nm, aproximadamente 80 a aproximadamente 100 nm y/o aproximadamente 90 a aproximadamente 100 nm. En una forma de realización, las nanopartículas lipídicas pueden tener un diámetro de aproximadamente 10 a 500 nm. En una forma de realización, la nanopartícula lipídica puede tener un diámetro mayor que 100 nm, mayor que 150 nm, mayor que 200 nm, mayor que 250 nm, mayor que 300 nm, mayor que 350 nm, mayor que 400 nm, mayor que 450 nm., mayor que 500 nm, mayor que 550 nm, mayor que 600 nm, mayor que 650 nm, mayor que 700 nm, mayor que 750 nm, mayor que 800 nm, mayor que 850 nm, mayor que 900 nm, mayor que 950 nm o mayor que 1000 nm. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

[0421] En algunas formas de realización, una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) tiene un diámetro medio de 10-500 nm, 20-400 nm, 30-300 nm o 40-200 nm. En algunas formas de realización, una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) tiene un diámetro medio de 50-150 nm, 50-200 nm, 80-100 nm u 80-200 nm.

[0422] En algunas formas de realización, las nanopartículas lipídicas descritas en el presente documento pueden tener un diámetro desde menos de 0,1 μm hasta 1 mm tal como, pero sin limitarse a menos de 0,1 μm , menos de 1,0 μm , menos de 5 μm , menos de 10 μm , menos de 15 μm , menos de 20 μm , menos de 25 μm , menos de 30 μm , menos de 35 μm , menos de 40 μm , menos de 50 μm , menos de 55 μm , menos de 60 μm , menos de 65 μm , menos de 70 μm , menos de 75 μm , menos de 80 μm , menos de 85 μm , menos de 90 μm , menos de 95 μm , menos de 100 μm , menos de 125 μm , menos de 150 μm , menos de 175 μm , menos de 200 μm , menos de 225 μm , menos de 250 μm , menos de 275 μm , menos de 300 μm , menos de 325 μm , menos de 350 μm , menos de 375 μm , menos de 400 μm , menos de 425 μm , menos de 450 μm , menos de 475 μm , menos de 500 μm , menos de 525 μm , menos de 550 μm , menos de 575 μm , menos de 600 μm , menos de 625 μm , menos de 650 μm , menos de 675 μm , menos de 700 μm , menos de 725 μm , menos de 750 μm , menos de 775 μm , menos de 800 μm , menos de 825 μm , menos de 850 μm , menos de 875 μm , menos de 900 μm , menos de 925 μm , menos de 950 μm , menos de 975 μm .

[0423] En otra forma de realización, los NPL pueden tener un diámetro de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 30 nm, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 40 nm, desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 50 nm, desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 60 nm, desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 70 nm, desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 80 nm, desde aproximadamente 1 nm a aproximadamente 90 nm, desde aproximadamente 5 nm hasta aproximadamente 100 nm, desde aproximadamente 5 nm hasta aproximadamente 10 nm, aproximadamente 5 nm hasta aproximadamente 20 nm, desde aproximadamente 5 nm hasta aproximadamente 30 nm, desde aproximadamente 5 nm hasta aproximadamente 40 nm, desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 50 nm, desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 60 nm, desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 70 nm, desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 80 nm, desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 90 nm, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nm, desde aproximadamente de 20 a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 20 a aproximadamente aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 40 a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 30 a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 60 a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 40 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 60 a aproximadamente 90 nm y/o de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

[0424] Una composición de nanopartículas puede ser relativamente homogénea. Puede usarse un índice de polidispersidad para indicar la homogeneidad de una composición de nanopartículas, por ejemplo, la distribución del tamaño de partículas de las composiciones de nanopartículas. Un índice de polidispersidad pequeño (por ejemplo, inferior a 0,3) generalmente indica una distribución de tamaño de partícula estrecha. Una composición de nanopartículas puede tener un índice de polidispersidad de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,25, tal como 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24 o 0,25. En algunas formas de realización, el índice de polidispersidad de una composición de nanopartículas puede ser de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,20. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

[0425] El potencial zeta de una composición de nanopartículas se puede utilizar para indicar el potencial electrocinético de la composición. Por ejemplo, el potencial zeta puede describir la carga superficial de una composición de nanopartículas. Las composiciones de nanopartículas con cargas relativamente bajas, positivas o negativas, son generalmente deseables, ya que las especies más cargadas pueden interactuar de manera indeseable con células, tejidos y otros elementos del cuerpo. En algunas formas de realización, el potencial zeta de una composición de nanopartículas puede ser de aproximadamente -20 mV a aproximadamente +20 mV, de aproximadamente -20 mV a aproximadamente +15 mV, de aproximadamente -20 mV a aproximadamente +10 mV, de aproximadamente -20 mV a aproximadamente +5 mV, desde aproximadamente -20 mV a aproximadamente 0 mV, desde aproximadamente -20 mV a aproximadamente -5 mV, desde aproximadamente -20 mV a aproximadamente -10 mV, desde aproximadamente -20 mV a aproximadamente -15 mV de aproximadamente -20 mV a aproximadamente +20 mV, desde aproximadamente -20 mV a aproximadamente +15 mV, desde aproximadamente -20 mV a aproximadamente +10 mV, desde aproximadamente -20 mV a aproximadamente +5 mV, desde aproximadamente -20 mV a aproximadamente 0 mV, desde aproximadamente 0 mV hasta aproximadamente +20 mV, desde aproximadamente 0 mV hasta aproximadamente +15 mV, desde aproximadamente 0 mV hasta aproximadamente +10 mV, desde aproximadamente 0 mV hasta aproximadamente +5 mV, desde aproximadamente +5 mV hasta aproximadamente +20 mV, desde aproximadamente +5 mV hasta aproximadamente +15 mV, o desde aproximadamente +5 mV hasta aproximadamente +10 mV. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

[0426] La eficacia de la encapsulación de un agente terapéutico describe la cantidad de agente terapéutico que se encapsula o se asocia de otro modo con una composición de nanopartículas después de la preparación, en relación con la cantidad inicial proporcionada. La eficacia de encapsulación es deseablemente alta (por ejemplo, cercana al 100 %). La eficacia de encapsulación se puede medir, por ejemplo, comparando la cantidad de agente terapéutico en una solución que contiene la composición de nanopartículas antes y después de romper la composición de nanopartículas con uno o más disolventes o detergentes orgánicos. Puede usarse fluorescencia para medir la cantidad de agente terapéutico libre (por ejemplo, ácidos nucleicos) en una solución. Para las composiciones de nanopartículas descritas en el presente documento, la eficacia de encapsulación de un agente terapéutico puede ser al menos 50 %, por ejemplo 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas formas de realización, la eficiencia de encapsulación puede ser al menos del 80 %. En determinadas formas de realización, la eficacia de encapsulación puede ser de al menos el 90 %. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención. En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica tiene un valor de polidiversidad inferior a 0,4. En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica tiene una carga neutra neta a un pH neutro. En algunas formas de realización, la nanopartícula lipídica tiene un diámetro medio de 50-200 nm.

[0427] Las propiedades de una formulación de nanopartículas lipídicas pueden verse influenciadas por factores que incluyen, entre otros, la selección del componente lipídico catiónico, el grado de saturación de lípidos catiónicos, la selección del componente lipídico no catiónico, el grado de la saturación de lípidos no catiónicos, la selección del componente lipídico estructural, la naturaleza de la PEGilación, la proporción de todos los componentes y los parámetros biofísicos como el tamaño. Como se describe en el presente documento, la pureza de un componente lipídico de PEG también es importante para las propiedades y el rendimiento de un NPL.

10. Métodos

[0428] En una forma de realización, se puede preparar una formulación de nanopartículas lipídicas mediante los métodos descritos en las publicaciones internacionales números WO2011127255 o WO2008103276, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. En algunas formas de realización, las formulaciones de nanopartículas lipídicas pueden ser como se describe en la Publicación Internacional N° WO2019131770, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0429] En algunas formas de realización, el ARN circular se formula según un proceso descrito en la solicitud de patente de EE. UU. 15/809,680. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un proceso para encapsular ARN circular en vehículos de transferencia que comprende las etapas de formar lípidos en vehículos de transferencia preformados (es decir, formados en ausencia de ARN) y, a continuación, combinar los vehículos de transferencia preformados con ARN. En algunas formas de realización, el nuevo proceso de formulación da como resultado una formulación de ARN con mayor potencia (expresión de péptidos o proteínas) y mayor eficacia (mejora de un criterio de valoración biológicamente relevante) tanto *in vitro* como *in vivo* con una tolerabilidad potencialmente mejor en comparación con la misma formulación de ARN. preparado sin el paso de preformar las nanopartículas lipídicas (por ejemplo, combinando los lípidos directamente con el ARN).

[0430] Para ciertas formulaciones de nanopartículas lipídicas catiónicas de ARN, para lograr una alta encapsulación de ARN, el ARN en tampón (por ejemplo, tampón citrato) tiene que calentarse. En esos procesos o métodos, se requiere que el calentamiento ocurra antes del proceso de formulación (es decir, calentar los componentes separados) ya que el calentamiento posterior a la formulación (posformación de nanopartículas) no aumenta la eficiencia de encapsulación del ARN en las nanopartículas lipídicas. Por el contrario, en algunas formas de realización de los nuevos procesos de la presente invención, el orden de calentamiento del ARN no parece afectar el porcentaje de encapsulación del ARN. En algunas formas de realización, no se requiere calentamiento (es decir, mantenimiento a temperatura ambiente) de una o más de las soluciones que comprenden las nanopartículas lipídicas preformadas, la solución que comprende el ARN y la solución mixta que comprende el ARN encapsulado en nanopartículas lipídicas antes o después del proceso de formulación.

[0431] El ARN se puede proporcionar en una solución para mezclar con una solución lipídica de modo que el ARN se pueda encapsular en nanopartículas lipídicas. Una solución de ARN adecuada puede ser cualquier solución acuosa que contenga ARN para encapsular en diversas concentraciones. Por ejemplo, una solución de ARN adecuada puede contener un ARN en una concentración de o superior a aproximadamente 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,07 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,09 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, o 1,0 mg/ml. En algunas formas de realización, una solución de ARN adecuada puede contener un ARN en una concentración en un rango de aproximadamente 0,01-1,0 mg/ml, 0,01-0,9 mg/ml, 0,01-0,8 mg/ml, 0,01-0,7 mg/ml, 0,01-0,6 mg/ml, 0,01-0,5 mg/ml, 0,01-0,4 mg/ml, 0,01-0,3 mg/ml, 0,01-0,2 mg/ml, 0,01-0,1 mg/ml, 0,05-1,0 mg/ml, 0,05-0,9 mg/ml, 0,05-0,8 mg/ml, 0,05-0,7 mg/ml, 0,05-0,6 mg/ml, 0,05-0,5 mg/ml, 0,05-0,4 mg/ml, 0,05-0,3 mg/ml, 0,05-0,2 mg/ml, 0,05-0,1 mg/ml, 0,1-1,0 mg/ml, 0,2-0,9 mg/ml, 0,3-0,8 mg/ml, 0,4-0,7 mg/ml o 0,5-0,6 mg/ml.

[0432] Normalmente, una solución de ARN adecuada también puede contener un agente tampón y/o una sal. Generalmente, los agentes tampón pueden incluir HEPES, Tris, sulfato de amonio, bicarbonato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, fosfato de potasio o fosfato de sodio. En algunas formas de realización, la concentración adecuada del agente tampón puede estar en un rango de aproximadamente 0,1 mM a 100 mM, 0,5 mM a 90 mM, 1,0 mM a 80 mM,

2 mM a 70 mM, 3 mM a 60 mM, 4 mM a 50 mM, 5 mM a 40 mM, 6 mM a 30 mM, 7 mM a 20 mM, 8 mM a 15 mM o 9 a 12 mM.

[0433] Las sales ejemplares pueden incluir cloruro de sodio, cloruro de magnesio y cloruro de potasio. En algunas formas de realización, la concentración adecuada de sales en una solución de ARN puede estar en un rango de aproximadamente 1 mM a 500 mM, 5 mM a 400 mM, 10 mM a 350 mM, 15 mM a 300 mM, 20 mM a 250 mM, 30 mM a 200 mM, 40 mM a 190 mM, 50 mM a 180 mM, 50 mM a 170 mM, 50 mM a 160 mM, 50 mM a 150 mM o 50 mM a 100 mM.

[0434] En algunas formas de realización, una solución de ARN adecuada puede tener un pH en un rango de aproximadamente 3,5-6,5, 3,5-6,0, 3,5-5,5, 3,5-5,0, 3,5-4,5, 4,0-5,5, 4,0-5,0, 4,0-4,9, 4,0-4,8, 4,0-4,7, 4,0-4,6 o 4,0-4,5.

[0435] Se pueden usar varios métodos para preparar una solución de ARN adecuada para la presente invención. En algunas formas de realización, el ARN se puede disolver directamente en una solución tampón descrita en el presente documento. En algunas formas de realización, se puede generar una solución de ARN mezclando una solución madre de ARN con una solución tampón antes de mezclar con una solución lipídica para encapsulación. En algunas formas de realización, se puede generar una solución de ARN mezclando una solución madre de ARN con una solución tampón inmediatamente antes de mezclar con una solución lipídica para encapsulación.

[0436] Según la presente invención, una solución lipídica contiene una mezcla de lípidos adecuados para formar vehículos de transferencia para la encapsulación de ARN. En algunas formas de realización, una solución lipídica adecuada está basada en etanol. Por ejemplo, una solución de lípidos adecuada puede contener una mezcla de lípidos deseados disueltos en etanol puro (es decir, etanol al 100 %). En otra forma de realización, una solución lipídica adecuada está basada en alcohol isopropílico. En otra forma de realización, una solución lipídica adecuada está basada en dimetilsulfóxido. En otra forma de realización, una solución lipídica adecuada es una mezcla de disolventes adecuados que incluyen, entre otros, etanol, alcohol isopropílico y dimetilsulfóxido.

[0437] Una solución lipídica adecuada puede contener una mezcla de lípidos deseados en diversas concentraciones. En algunas formas de realización, una solución lipídica adecuada puede contener una mezcla de lípidos deseados en una concentración total en un rango de aproximadamente 0,1-100 mg/ml, 0,5-90 mg/ml, 1,0-80 mg/ml, 1,0-70 mg/ml, 1,0-60 mg/ml, 1,0-50 mg/ml, 1,0-40 mg/ml, 1,0-30 mg/ml, 1,0-20 mg/ml, 1,0-15 mg/ml, 1,0-10 mg/ml, 1,0-9 mg/ml, 1,0-8 mg/ml, 1,0-7 mg/ml, 1,0-6 mg/ml o 1,0-5 mg/ml.

11. Direccionamiento

[0438] La presente invención también contempla el direccionamiento discriminatorio de células y tejidos diana mediante medios de direccionamiento tanto pasivos como activos. El fenómeno de la focalización pasiva explota los patrones de distribución natural de un vehículo de transferencia *in vivo* sin depender del uso de excipientes o medios adicionales para mejorar el reconocimiento del vehículo de transferencia por parte de las células diana. Por ejemplo, es probable que vehículos de transferencia que están sujetos a fagocitosis por las células del sistema retículo-endotelial se acumulen en el hígado o el bazo y, en consecuencia, pueden proporcionar un medio para dirigir pasivamente la administración de las composiciones a dichas células diana.

[0439] Alternativamente, la presente invención contempla el direccionamiento activo, que implica el uso de restos de direccionamiento que pueden unirse (ya sea de forma covalente o no covalente) al vehículo de transferencia para fomentar la localización de dicho vehículo de transferencia en ciertas células diana o tejidos objetivo. Por ejemplo, la dirección puede estar mediada por la inclusión de uno o más restos de dirección endógenos en o sobre el vehículo de transferencia para fomentar la distribución a las células o tejidos diana. El reconocimiento del resto diana por los tejidos diana facilita activamente la distribución tisular y la captación celular del vehículo de transferencia y/o su contenido en las células y tejidos diana (por ejemplo, la inclusión de un ligando dirigido a apolipoproteína-E en o sobre el vehículo de transferencia fomenta reconocimiento y unión del vehículo de transferencia a receptores endógenos de lipoproteínas de baja densidad expresados por hepatocitos). Como se proporciona en el presente documento, la composición puede comprender un resto capaz de mejorar la afinidad de la composición por la célula diana. Los restos diana pueden unirse a la bicapa externa de la partícula lipídica durante la formulación o después de la formulación. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Además, algunas formulaciones de partículas lipídicas pueden emplear polímeros fusogénicos tales como PEAA, hemaglutinina, otros lipopéptidos (ver la solicitud de patente de EE. UU. números de serie 08/835.281 y 60/083.294, que se incorporan en el presente documento como referencia) y otras características útiles para la administración *in vivo* y/o intracelular. En otras algunas formas de realización, las composiciones de la presente invención demuestran eficacias de transfección mejoradas y/o demuestran una selectividad mejorada hacia células o tejidos diana de interés. Por lo tanto, se contemplan composiciones que comprenden uno o más restos (por ejemplo, péptidos, aptámeros, oligonucleótidos, una vitamina u otras moléculas) que son capaces de mejorar la afinidad de las composiciones y su contenido de ácido nucleico por las células o tejidos diana. Opcionalmente, pueden unirse o enlazarse restos adecuados a la superficie del vehículo de transferencia. En algunas formas de realización, el resto de dirección puede abarcar la superficie de un vehículo de transferencia o estar encapsulado dentro del vehículo de transferencia. Los restos adecuados se seleccionan en función de sus propiedades físicas, químicas o biológicas (por ejemplo, afinidad selectiva y/o reconocimiento de marcadores o características de la superficie de la célula diana). Los sitios diana específicos de cada célula y su correspondiente ligando dirigido pueden variar ampliamente. Los restos diana adecuados se seleccionan de manera que

se aprovechen las características únicas de una célula diana, permitiendo así que la composición discrimine entre células diana y no diana. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden incluir marcadores de superficie (por ejemplo, apolipoproteína-B o apolipoproteína-E) que mejoran selectivamente el reconocimiento o la afinidad por los hepatocitos (por ejemplo, mediante el reconocimiento mediado por receptores y la unión a dichos marcadores de superficie). Como ejemplo, se esperaría que el uso de galactosa como resto de dirección dirigiera las composiciones de la presente invención a hepatocitos parenquimatosos, o alternatively se esperaría que el uso de manosa que contiene residuos de azúcar como ligando de dirección dirigiera las composiciones de la presente invención a células endoteliales del hígado (por ejemplo, manosa que contienen residuos de azúcar que pueden unirse preferentemente al receptor de asialoglicoproteína presente en los hepatocitos). (Ver Hillery AM, et al. "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc.) La presentación de tales restos de direccionamiento que se han conjugado con restos presentes en el vehículo de transferencia (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) facilitan por lo tanto el reconocimiento y la absorción de las composiciones de la presente invención en células y tejidos diana. Ejemplos de restos de dirección adecuados incluyen uno o más péptidos, proteínas, aptámeros, vitaminas y oligonucleótidos.

[0440] En formas de realización particulares, un vehículo de transferencia comprende un resto de direccionamiento. En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento media la endocitosis mediada por receptores de forma selectiva en una población específica de células. En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento es capaz de unirse a un antígeno de célula T. En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento es capaz de unirse a un antígeno NK, NKT o macrófago. En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento es capaz de unirse a una proteína seleccionada del grupo CD3, CD4, CD8, PD-1, 4-1BB y CD2. En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento es un fragmento Fv (scFv) de cadena única, nanocuerpo, péptido, macrociclo basado en péptido, minicuerpo, región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera o fragmento de la misma. En algunas formas de realización, el resto de direccionamiento se selecciona entre anticuerpos con motivo de receptor de células T, anticuerpos de cadena α de células T, anticuerpos de cadena β de células T, anticuerpos de cadena γ de células T, anticuerpos de cadena δ de células T, anticuerpos CCR7, anticuerpos CD3, anticuerpos CD4, anticuerpos CD5, anticuerpos CD7, anticuerpos CD8, anticuerpos CD11b, anticuerpos CD11c, anticuerpos CD16, anticuerpos CD19, anticuerpos CD20, anticuerpos CD21, anticuerpos CD22, anticuerpos CD25, anticuerpos CD28, anticuerpos CD34, anticuerpos CD35, anticuerpos CD40, anticuerpos CD45RA, anticuerpos CD45RO, anticuerpos CD52, anticuerpos CD56, anticuerpos CD62L, anticuerpos CD68, anticuerpos CD80, anticuerpos CD95, anticuerpos CD117, anticuerpos CD127, anticuerpos CD133, anticuerpos CD137 (4-1BB), anticuerpos CD163, anticuerpos F4/80, anticuerpos IL-4R α , anticuerpos Sca-1, anticuerpos CTLA-4, anticuerpos GITR, anticuerpos GARP, anticuerpos LAP, anticuerpos granzima B, anticuerpos LFA-1, anticuerpos contra el receptor de transferrina y fragmentos de los mismos. En algunas formas de realización, el resto de dirección es una molécula pequeña que se une a una ectoenzima en los linfocitos. Los aglutinantes de moléculas pequeñas de ectoenzimas incluyen inhibidores de A2A, inhibidores de CD73, CD39 o receptores de adhesinas A2aR y A2bR. Las posibles moléculas pequeñas incluyen AB928.

[0441] En algunas formas de realización, los vehículos de transferencia se formulan y/o se dirigen como se describe en Shobaki N, Sato Y, Harashima H. Mixing lipids to manipulate the ionization status of lipid nanoparticles for specific tissue targeting. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:8395-8410. Publicado el 10 de diciembre de 2018. En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia está compuesto por 3 tipos de lípidos. En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia se compone de 4 tipos de lípidos. En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia se compone de 5 tipos de lípidos. En algunas formas de realización, un vehículo de transferencia se compone de 6 tipos de lípidos.

45 12. Células diana

[0442] Cuando se desea administrar un ácido nucleico a una célula inmunitaria, la célula inmunitaria representa la célula diana. En algunas formas de realización, las composiciones de la invención transfectan las células diana de forma discriminatoria (es decir, no transfectan células no diana). Las composiciones de la invención también se pueden preparar para dirigirse preferentemente a una variedad de células diana, que incluyen, entre otras, células T, células B, macrófagos y células dendríticas.

[0443] En algunas formas de realización, las células diana son deficientes en una proteína o enzima de interés. Por ejemplo, cuando se desea administrar un ácido nucleico a un hepatocito, el hepatocito representa la célula diana. En algunas formas de realización, las composiciones de la invención transfectan las células diana de forma discriminatoria (es decir, no transfectan células no diana). Las composiciones de la invención también se pueden preparar para dirigirse preferentemente a una variedad de células diana, que incluyen, entre otras, hepatocitos, células epiteliales, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células pulmonares, células óseas, células madre, células mesenquimales, células neurales (por ejemplo, meninges, astrocitos, neuronas motoras, células de los ganglios de la raíz dorsal y neuronas motoras del asta anterior), células fotorreceptoras (por ejemplo, varillas y conos), células epiteliales pigmentadas de la retina, células secretoras, células cardíacas, adipocitos, células del músculo liso vascular, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células beta, células pituitarias, células del revestimiento sinovial, células ováricas, células testiculares, fibroblastos, células B, células T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos y células tumorales.

[0444] Las composiciones de la invención se pueden preparar para distribuirse preferentemente a células diana tales como en el corazón, los pulmones, los riñones, el hígado y el bazo. En algunas formas de realización, las composiciones

de la invención se distribuyen en las células del hígado o del bazo para facilitar la administración y la posterior expresión del ARNcirc comprendido en el mismo por las células del hígado (por ejemplo, hepatocitos) o las células del bazo (por ejemplo, células inmunes). Las células diana pueden funcionar como una "reserva" o un "depósito" biológico capaz de producir y excretar sistémicamente una proteína o enzima funcional. Por consiguiente, en una forma de realización de la invención, el vehículo de transferencia puede dirigirse a hepatocitos o células inmunitarias y/o distribuirse preferentemente a las células del hígado o del bazo en el momento de la administración. En una forma de realización, después de la transfección de los hepatocitos o células inmunitarias diana, el ARNcirc cargado en el vehículo se traduce y se produce, excreta y distribuye sistémicamente un producto proteico funcional. En otras formas de realización, células distintas de los hepatocitos (por ejemplo, células de pulmón, bazo, corazón, oculares o del sistema nervioso central) pueden servir como lugar de depósito para la producción de proteínas.

[0445] En una forma de realización, las composiciones de la invención facilitan la producción endógena de un sujeto de una o más proteínas y/o enzimas funcionales. En una forma de realización de la presente invención, los vehículos de transferencia comprenden ARNcirc que codifica una proteína o enzima deficiente. Tras la distribución de dichas composiciones a los tejidos diana y la posterior transfección de dichas células diana, el ARNcirc exógeno cargado en el vehículo de transferencia (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) puede traducirse *in vivo* para producir una proteína o enzima funcional codificada por la sustancia administrada exógenamente. ARNcirc (por ejemplo, una proteína o enzima en la que el sujeto tiene deficiencia). En consecuencia, las composiciones de la presente invención explotan la capacidad de un sujeto para traducir ARNcirc preparado de forma exógena o recombinante para producir una proteína o enzima traducida de forma endógena y, de este modo, producir (y, cuando corresponda, excretar) una proteína o enzima funcional. Las proteínas o enzimas expresadas o traducidas también pueden caracterizarse por la inclusión *in vivo* de modificaciones postraduccionales nativas que a menudo pueden estar ausentes en proteínas o enzimas preparadas de forma recombinante, reduciendo así aún más la inmunogenicidad de la proteína o enzima traducida.

[0446] La administración de ARNcirc que codifica una proteína o enzima deficiente evita la necesidad de administrar los ácidos nucleicos a orgánulos específicos dentro de una célula diana. Más bien, tras la transfección de una célula diana y la entrega de los ácidos nucleicos al citoplasma de la célula diana, se puede traducir el contenido del ARNcirc de un vehículo de transferencia y expresar una proteína o enzima funcional.

[0447] En algunas formas de realización, un ARN circular comprende uno o más sitios de unión de miARN. En algunas formas de realización, un ARN circular comprende uno o más sitios de unión de miARN reconocidos por miARN presentes en una o más células no diana o tipos de células no diana (por ejemplo, células de Kupffer o células hepáticas) y no presentes en una o más células diana o tipos de células diana (por ejemplo, hepatocitos o células T). En algunas formas de realización, un ARN circular comprende uno o más sitios de unión de miARN reconocidos por miARN presentes en una concentración aumentada en una o más células no objetivo o tipos de células no objetivo (por ejemplo, células de Kupffer o células hepáticas) en comparación con uno o más células diana o tipos de células diana (por ejemplo, hepatocitos o células T). Se cree que los miARN funcionan emparejándose con secuencias complementarias dentro de las moléculas de ARN, lo que resulta en el silenciamiento de genes.

13. Composiciones farmacéuticas

[0448] En ciertas formas de realización, en el presente documento se proporcionan composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que comprenden un agente terapéutico proporcionado en el presente documento. En algunas formas de realización, el agente terapéutico es un polinucleótido de ARN circular proporcionado en el presente documento. En algunas formas de realización, el agente terapéutico es un vector proporcionado en el presente documento. En algunas formas de realización, el agente terapéutico es una célula que comprende un ARN circular o un vector proporcionado en el presente documento (por ejemplo, una célula humana, tal como una célula T humana). En determinadas formas de realización, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, las composiciones proporcionadas en el presente documento comprenden un agente terapéutico proporcionado en el presente documento en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos o fármacos, tales como fármacos antiinflamatorios o anticuerpos capaces de dirigirse a antígenos de células B, por ejemplo, anticuerpos antiCD20, por ejemplo, rituximab.

[0449] Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera de los utilizados convencionalmente y está limitado únicamente por consideraciones químico-físicas, tales como solubilidad y falta de reactividad con el(los) agente(s) activo(s), y por la ruta de administración. Los vehículos farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, son bien conocidos por los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el vehículo farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte al agente terapéutico y uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

[0450] La elección del vehículo estará determinada en parte por el agente terapéutico particular, así como por el método particular utilizado para administrar el agente terapéutico. Por consiguiente, existe una variedad de formulaciones adecuadas de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento.

- 5 **[0451]** En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un conservante. En determinadas formas de realización, los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. Opcionalmente, se puede utilizar una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o sus mezclas están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 2 % en peso de la composición total.
- 10 **[0452]** En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende un agente tampón. En algunas formas de realización, los agentes tampón adecuados pueden incluir, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y otros ácidos y sales diversos. Opcionalmente se puede utilizar una mezcla de dos o más agentes tampón. El agente tampón o sus mezclas están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 4 % en peso de la composición total.
- 15 **[0453]** En algunas formas de realización, la concentración de agente terapéutico en la composición farmacéutica puede variar, por ejemplo, menos de aproximadamente 1 %, o al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, o aproximadamente 50 % o más en peso, y puede seleccionarse principalmente por volúmenes de fluido, y viscosidades, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.
- 20 **[0454]** Las siguientes formulaciones para administración oral, en aerosol, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e intratecal) y tópica son meramente ejemplares y de ninguna manera son limitantes. Se puede usar más de una ruta para administrar los agentes terapéuticos proporcionados en el presente documento y, en ciertos casos, una ruta particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra ruta.
- 25 **[0455]** Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden comprender o consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del agente terapéutico disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o jugo de naranja; (b) cápsulas, sobres, tabletas, pastillas y pastillas, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como sólidos o gránulos; c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsulas pueden ser del tipo de gelatina de cáscara dura o blanda ordinaria que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato cálcico y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir una o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tampón, agentes desintegrantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de pastilla pueden comprender el agente terapéutico con un saborizante, normalmente sacarosa, acacia o tragacanto. Las pastillas pueden comprender el agente terapéutico con una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia, emulsiones, geles y similares que contienen, además de excipientes conocidos en la técnica.
- 30 **[0456]** Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos proporcionados en el presente documento se pueden administrar en un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéutico, tal como un líquido estéril o una mezcla de líquidos, que incluye agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, un alcohol como etanol o alcohol hexadecílico, un glicol como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres de ácido o glicéridos, o glicéridos de ácidos grasos acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.
- 35 **[0457]** Los aceites, que se pueden usar en formulaciones parenterales en algunas formas de realización, incluyen petróleo, aceites animales, aceites vegetales o aceites sintéticos. Ejemplos específicos de aceites incluyen maní, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina y aceite mineral. Los ácidos grasos adecuados para uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.
- 40 **[0458]** Los jabones adecuados para su uso en determinadas formas de realización de formulaciones parenterales incluyen sales grasas de metales alcalinos, amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de amonio de dimetildialquilo y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicéridos y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, aminas grasas. óxidos, alcanolamidas de ácidos

grasos y copolímeros de polioxietilenopolipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil- β -aminopropionatos y sales de amonio cuaternario de 2-alkil-imidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

[0459] En algunas formas de realización, las formulaciones parenterales contendrán, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 25 % en peso del agente terapéutico en solución. Se pueden utilizar conservantes y tampones. Para minimizar o eliminar la irritación en el lugar de la inyección, dichas composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tengan, por ejemplo, un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en dichas formulaciones normalmente oscilará, por ejemplo, entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 15 % en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitán, tales como monooleato de sorbitán y aductos de óxido de etileno de alto peso molecular con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales pueden presentarse en envases sellados de dosis unitarias o multidosis, tales como ampollas o viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada (liofilizada) que requiere sólo la adición de un excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

[0460] En ciertas formas de realización, en el presente documento se proporcionan formulaciones inyectables. Los requisitos para vehículos farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., páginas 238-250). (1982) y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4^a ed, páginas 622-630 (1986)).

[0461] En algunas formas de realización, en el presente documento se proporcionan formulaciones tópicas. Las formulaciones tópicas, incluidas aquellas que son útiles para la liberación transdérmica de fármacos, son adecuadas en el contexto de ciertas formas de realización proporcionadas en el presente documento para su aplicación a la piel. En algunas formas de realización, el agente terapéutico solo o en combinación con otros componentes adecuados puede convertirse en formulaciones de aerosol para administrarse mediante inhalación. Estas formulaciones de aerosol se pueden colocar en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También pueden formularse como productos farmacéuticos para preparaciones sin presión, como en un nebulizador o un atomizador. Tales formulaciones de pulverización también se pueden usar para pulverizar mucosa.

[0462] En ciertas formas de realización, los agentes terapéuticos proporcionados en el presente documento se pueden formular como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina o liposomas. Los liposomas pueden servir para dirigir los agentes terapéuticos a un tejido particular. También se pueden usar liposomas para aumentar la vida media de los agentes terapéuticos. Hay muchos métodos disponibles para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9, 467 (1980) y las patentes estadounidenses 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

[0463] En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos proporcionados en el presente documento se formulan en sistemas de administración de liberación prolongada, liberación retardada o liberación sostenida de manera que la administración de la composición ocurre antes y con tiempo suficiente para causar la sensibilización del sitio a ser tratado. Dichos sistemas pueden evitar administraciones repetidas del agente terapéutico, aumentando así la conveniencia para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para ciertas formas de realización de composición proporcionadas en el presente documento. En una forma de realización, las composiciones de la invención se formulan de manera que sean adecuadas para la liberación prolongada del ARNcirc contenido en ellas. Tales composiciones de liberación prolongada pueden administrarse convenientemente a un sujeto en intervalos de dosificación prolongados. Por ejemplo, en una forma de realización, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces al día, diariamente o cada dos días. En una forma de realización, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces por semana, una vez por semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, una vez al mes, cada seis semanas, cada ocho semanas, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis meses, cada ocho meses, cada nueve meses o anualmente.

[0464] En algunas formas de realización, una célula diana produce una proteína codificada por un polinucleótido inventivo durante períodos de tiempo sostenidos. Por ejemplo, la proteína puede producirse durante más de una hora, más de cuatro, más de seis, más de 12, más de 24, más de 48 horas o más de 72 horas después de la administración. En algunas formas de realización, el polipéptido se expresa a un nivel máximo aproximadamente seis horas después de la administración. En algunas formas de realización, la expresión del polipéptido se mantiene al menos a un nivel terapéutico. En algunas formas de realización, el polipéptido se expresa al menos a un nivel terapéutico durante más de una, más de cuatro, más de seis, más de 12, más de 24, más de 48 o más de 72 horas después de la administración. En algunas formas de realización, el polipéptido es detectable a un nivel terapéutico en el suero o tejido del paciente (por ejemplo, hígado o pulmón). En algunas formas de realización, el nivel de polipéptido detectable proviene de la expresión continua de la composición de ARNcirc durante períodos de tiempo de más de uno, más de cuatro, más de seis, más de 12, más de 24, más de 48 o más de 72 horas después de la administración.

[0465] En ciertas formas de realización, una proteína codificada por un polinucleótido inventivo se produce a niveles superiores a los niveles fisiológicos normales. El nivel de proteína puede aumentar en comparación con un control. En

algunas formas de realización, el control es el nivel fisiológico inicial del polipéptido en un individuo normal o en una población de individuos normales. En otras formas de realización, el control es el nivel fisiológico inicial del polipéptido en un individuo que tiene una deficiencia en la proteína o polipéptido relevante o en una población de individuos que tiene una deficiencia en la proteína relevante o polipéptido. En algunas formas de realización el control puede ser el nivel normal de la proteína o polipéptido relevante en el individuo a quien se administra la composición. En otras formas de realización el control es el nivel de expresión del polipéptido tras otra intervención terapéutica, por ejemplo, tras la inyección directa del polipéptido correspondiente, en uno o momentos más comparables.

[0466] En ciertas formas de realización, los niveles de una proteína codificada por un polinucleótido inventivo son detectables en 3 días, 4 días, 5 días o 1 semana o más después de la administración. Se pueden observar niveles elevados de proteína secretada en el suero y/o en un tejido (por ejemplo, hígado o pulmón).

[0467] En algunas formas de realización, el método produce una vida media en circulación sostenida de una proteína codificada por un polinucleótido inventivo. Por ejemplo, la proteína puede detectarse durante horas o días más que la vida media observada mediante inyección subcutánea de la proteína o ARNm que codifica la proteína. En algunas formas de realización, la vida media de la proteína es 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 1 semana o más.

[0468] Muchos tipos de sistemas de administración de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como monodi y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos: recubrimientos de cera; comprimidos comprimidos utilizando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, entre otros: (a) sistemas de erosión en los que la composición activa está contenida en una forma dentro de una matriz como las descritas en las patentes estadounidenses 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas de difusión en el que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de EE. UU. 3.832.253 y 3.854.480. Además, se pueden utilizar sistemas de administración de hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para su implantación.

[0469] En algunas formas de realización, el agente terapéutico se puede conjugar directa o indirectamente a través de un resto de enlace con un resto de direccionamiento. En la técnica se conocen métodos para conjugar agentes terapéuticos con restos diana. Véase, por ejemplo, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3:111 (1995) y la patente de EE. UU. 5.087.616.

[0470] En algunas formas de realización, los agentes terapéuticos proporcionados en el presente documento se formulan en una forma de depósito, de modo que la manera en que el agente terapéutico se libera en el cuerpo al que se administra se controla con respecto al tiempo y la ubicación dentro del cuerpo (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 4.450.150). Las formas de depósito de agentes terapéuticos pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los agentes terapéuticos y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en donde los agentes terapéuticos están encapsulados o difundidos por todo el material y/o la degradación del material no poroso. A continuación, se implanta el depósito en la ubicación deseada dentro del cuerpo y los agentes terapéuticos se liberan del implante a un ritmo predeterminado.

14. Métodos terapéuticos

[0471] En ciertos aspectos, la composición proporcionada en el presente documento se puede usar en un método para tratar y/o prevenir una afección, por ejemplo, cáncer.

[0472] En ciertas formas de realización, los agentes terapéuticos proporcionados en el presente documento se coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales (por ejemplo, en la misma composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas). En algunas formas de realización, el agente terapéutico proporcionado en el presente documento se puede administrar primero y uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar en segundo lugar, o viceversa. Alternativamente, el agente terapéutico proporcionado en el presente documento y uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar simultáneamente.

[0473] En algunas formas de realización, el sujeto es un mamífero. En algunas formas de realización, el mamífero al que se hace referencia en el presente documento puede ser cualquier mamífero, incluidos, entre otros, mamíferos del orden Rodentia, como ratones y hámsteres, o mamíferos del orden Logomorpha, como conejos. Los mamíferos pueden ser del orden Carnivora, incluidos felinos (gatos) y caninos (perros). Los mamíferos pueden ser del orden Artiodactyla, incluidos los bovinos (vacas) y los cerdos, o del orden Perissodactyla, incluidos los equinos (caballos). Los mamíferos pueden ser del orden Primates, Ceboidea o Simioides (monos) o del orden Anthropoidea (humanos y simios). Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

[0474] En algunas formas de realización, un IRES de la invención es un IRES que tiene una secuencia como se enumera en la Tabla 17 (SEQ ID NO: 1-72 y 348-389). En algunas formas de realización, un IRES es un IRES de Salivirus. En algunas formas de realización, un IRES es un IRES de Salivirus SZ1. En algunas formas de realización, un IRES es un AP1.0 (SEQ ID NO:348). En algunas formas de realización, un IRES es un CK1.0 (SEQ ID NO:349). En algunas formas de realización, un IRES es un PV1.0 (SEQ ID NO:350). En algunas formas de realización, un IRES es un SV1.0 (SEQ ID NO:351).

Tabla 18. Secuencias del fragmento del intrón 5' del sitio de permutación de Anabaena.

SEQ ID NO	Sitio de permutación	Secuencia
73	L2-1	GAAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACC TAAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAG TAGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCG GAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGAC GAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGT AGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
74	L2-2	AAGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCT AAATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGT AGTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGG AAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACG AGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTA GCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
75	L2-3	AGAAATTCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTA AATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTA GTAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGA AGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGA GGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAG CGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
76	L5-1	GTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATT AGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGC AGAGACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
77	L5-2	TTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTA GTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCA GAGACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGC TGCAAGAGAATGAAAATCCGT
78	L5-3	TATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAG TAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCA GAGACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA AGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGT
79	L5-4	ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCA GAGACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGT

(Continuación)

SEQ ID NO	Sitio de permutación	Secuencia
80	L5-5	TAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTA AGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAG ACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGT
81	L6-1	ACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCG ACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGT
82	L6-2	CAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGA CGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC CAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGA ATGAAAATCCGT
83	L6-3	AATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGAC GGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC AATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAA TGAAAATCCGT
84	L6-4	ATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACG GGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCA ATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAAT GAAAATCCGT
85	L6-5	TAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGG GAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAA TTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATG AAAATCCGT
86	L6-6	AGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGG AGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAAT TCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGT
87	L6-7	GATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGA GCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGT
88	L6-8	ATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAG CTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCT TCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAA AATCCGT
89	L6-9	TGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGC TACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCT CAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAA ATCCGT
90	L8-1	CAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATA GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
91	L8-2	AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT

(Continuación)

SEQ ID NO	Sitio de permutación	Secuencia
92	L8-3	AGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGG CAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
93	L8-4	GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
94	L8-5	ACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
95	L9a-1	AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
96	L9a-2	ATAGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
97	L9a-3	TAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
98	L9a-4	AGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
99	L9a-5	GGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
100	L9-1	GAAAGCTGCAAGGAATGAAAATCCGT
101	L9-2	AAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
102	L9-3	AAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
103	L9-4	AGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
104	L9-5	GCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
105	L9-6	CTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
106	L9-7	AAGAGAATGAAAATCCGT
107	L9-8	AGAGAATGAAAATCCGT
108	L9-9	GAGAATGAAAATCCGT
109	L9a-6	GCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
110	L9a-7	AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
111	L9a-8	GTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT

[0475] En algunas formas de realización, un fragmento de intrón 5' es un fragmento que tiene una secuencia enumerada en la Tabla 18. Normalmente, una construcción que contiene un fragmento de intrón 5' enumerado en la Tabla 18 contendrá un fragmento de intrón 3' correspondiente como se enumera en la Tabla 19 (por ejemplo, ambos representan fragmentos con el sitio de permutación L9a-8).

Tabla 19. Secuencias del fragmento del intrón 3' del sitio de permutación de Anabaena.

SEQ ID NO	Sitio de permutación	Secuencia
112	L2-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAA
113	L2-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAG
114	L2-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGA
115	L5-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTA
116	L5-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAG
117	L5-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGT
118	L5-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT
119	L5-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTA
120	L6-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT A

(Continuación)

SEQ ID NO	Sitio de permutación	Secuencia
121	L6-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AA
122	L6-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AAC
123	L6-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACA
124	L6-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAA
125	L6-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAAT
126	L6-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATA
127	L6-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAG
128	L6-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGA
129	L8-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGT
130	L8-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTC
131	L8-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCA

(Continuación)

SEQ ID NO	Sitio de permutación	Secuencia
132	L8-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA
133	L8-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAG
134	L9a-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCC
135	L9a-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCA
136	L9a-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAA
137	L9a-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAAT
138	L9a-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATA
139	L9-1	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC

(Continuación)

SEQ ID NO	Sitio de permutación	Secuencia
140	L9-2	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGTCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCG
141	L9-3	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGTCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGA
142	L9-4	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGTCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAA
143	L9-5	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGTCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAA
144	L9-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGTCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG
145	L9-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGTCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC
146	L9-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGTCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCA
147	L9-9	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGTCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCA A

(Continuación)

SEQ ID NO	Sitio de permutación	Secuencia
148	L9a-6	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT ACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG
149	L9a-7	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT ACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC
150	L9a-8	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT ACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACT CGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCA

[0476] En algunas formas de realización, un fragmento de intrón 3' es un fragmento que tiene una secuencia enumerada en la Tabla 19. En algunas formas de realización, una construcción que contiene un fragmento de intrón 3' enumerado en la Tabla 19 contendrá un fragmento de intrón 5' correspondiente como se enumera en la Tabla 18 (por ejemplo, ambos representan fragmentos con el sitio de permutación L9a-8).

Tabla 20. Secuencias de fragmentos de intrones 5' del sitio de permutación no anabaena.

SEQ ID NO	Intrón	Secuencia
151	Azop1	tgcgcgagtgagggtgtagagactagacggcaccacciaaggcaaacgcctatggtgaaggcatagtcac ggagagtggcgaagcacaacaaccggatccgt
152	Azop2	ccggcggtatggcaacgcggagccaagcttcggcgccgcatggaagggttagagactagacggc accacacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtcaggggagtggcgaaagtcacacaaccggat ccgt
153	Azop3	aeggcacccacctaaggcaaacgctatggtgaaggcatagtcaggggagtggcgaaagtcacacaacc ggaatccgt
154	Azop4	acgctatggtgaaggcatagtcaggggagtggcgaaagtcacacaaccggatccgt
155	S795p1	attaaggtatagaattatcagagaatgatatagtcaggcctatggttaacatgaggcacttgaccctggla g
156	dosrtp1	aagatgtaggcaatccgagctaaagctcttaglaataagagaagtgcaacgactatccgataaggagtag ggcgaagtgactcgaaatgggattaccctctagggtagtgatagtcgaaacatataatggaacatag aagcatagagtagtaacgaacctatcgtaacataattgaacttttagttat
157	dosrtp2	taataagagaagtgcaacgactatccgataaggagtagggtaagtgactcgaaatgggattacccttc tagggtagtgatagtcgaaacatataatggaacatataaggaataggagtagaacgaacctatcgtaacat aatgaacttttagttat
158	dosrtp3	taggaagtagggtaagtgactcgaaatgggattaccctctagggtagtgatagtcgaaacatataatg aaacatataaggaataggagtagaacgaacctatcgtaacataattgaacttttagttat
159	dosrtp4	ctagggtagtgatagtcgaaacatataatggaacatataaggaataggagtagaacgaacctatcgtaaca taattgaacttttagttat

(Continuación)

SEQ ID NO	Intrón	Secuencia
160	LSUp1	agttaataaagatgataaatagtctgaaccatttgcgaaaagtggaaataaaagaaaatctttatgataac ataaattgaacaggctaa
161	phip1	caaagactgatgatatagtcgcgacactcctagtaataggagaatacagaaaggatgaaatcc
162	Nostoc	agtcgaggggtaaaggagagagtcgaattctcaaaagcctattggcagtagcgaaagctgcgggagaatgaaa atccgt
163	Nostoc	agccgaggggtaaaggagagagtcgaattctcaaaagcctattggcagtagcgaaagctgcgggagaatgaaa atccgt
164	Nodular	agccgaggggtaaaggagagagtcgaattctcaaaagcctattggcagtagcgaaagctgcgggagaatgaaa atccgt
165	Pleurocápsulas a	agctgaggggtaaaggagagagtcgaattctcaaaagcctattggcagtagcgaaagctgcgggagaatgaaa atccgt
166	Planctotri x	agccgaggggtaaaggagagagtcgaattctcaaaagcctattggcagtagcgaaagctgcgggagaatgaaa atccgt

[0477] En algunas formas de realización, un fragmento de intrón 5' es un fragmento que tiene una secuencia enumerada en la Tabla 20. Una construcción que contiene un fragmento de intrón 5' enumerado en la Tabla 20 contendrá un fragmento de intrón 3' correspondiente en la Tabla 21 (por ejemplo, ambos representan fragmentos con el intrón Azop1).

Tabla 21. Secuencias de fragmentos de intrones 3' del sitio de permutación no anabaena.

SEQ ID NO	Intrón	Secuencia
167	Azop1	gcggactcataatttcgatgtgccitgcgcggggaaccacgcgaaggatgggicaaattcggcgaaac ctaagcgcccgccggcggtatggcaacgccgagccaagcttcggcgcc
168	Azop2	gcggactcataatttcgatgtgccitgcgcggggaaccacgcgaaggatgggicaaattcggcgaaac ctaagcgcccgcc
169	Azop3	gcggactcataatttcgatgtgccitgcgcggggaaccacgcgaaggatgggicaaattcggcgaaac ctaagcgcccgccggcggtatggcaacgccgagccaagcttcggcgccctgcgcgatgaaggigta gagactag
170	Azop4	gcggactcataatttcgatgtgccitgcgcggggaaccacgcgaaggatgggicaaattcggcgaaac ctaagcgcccgccggcggtatggcaacgccgagccaagcttcggcgccctgcgcgatgaagggtga gagactagacggcacccacctaaggca
171	S795p1	aggattagataactactaagtgtccccagactggtagacagtctgggtgtgcafcagctatatcggtgaa acccattgggtaataccgaggggaagctataattatataataataaatagcccgtagagactatgta ggtaaggagatagaagatgataaaafcaaaatcatc
172	dosrtp1	actactgaaagcataaataattgtgctttatagtaagtataatcgaaaatcctctaatcagggaacac ctaaacaaact
173	dosrtp2	actactgaaagcataaataattgtgctttatagtaagtataatcgaaaatcctctaatcagggaacac ctaaacaaactaagatgtaggcaatctgagctaaagctcttag

(Continuación)

SEQ ID NO	Intrón	Secuencia
174	dosrtp3	actactggaagcataaafaattgtgcccttatacagtaafgtatatacgaanaafccctaatcagggaacac ctaaacaactaagatgtaggcaatccctgagctaaagctcttagtaataagagaaaagtcacagactatcc ga
175	dosrtp4	actactggaagcataaafaattgtgcccttatacagtaafgtatatacgaanaafccctaatcagggaacac ctaaacaactaagatgtaggcaatccctgagctaaagctcttagtaataagagaaaagtcacagactatcc galagggaagtaggggcaagtgactcgaaatggggattaccct
176	LSUp1	cgttagggattataactgtgagtcctcaatataaanaatgttgtaatatattgggtaaatcacaagaca actttctccacgcaggatataagtgatgtgaagcgaaactatittagcagtgaaaagcaataaggaac gttcaacgactaaaaggtgagtaattgtaacaataaafccctttttaatgcccacacatititaact
177	phip1	gtgggtgcataaactatcattgtgcacatlaaactcgggtgaactcggggaacccctaatggggcaatacc gagcccaagccatagggaggatataagagaggaaggaatgaattcttgagggccactgagactggtgtga tcatccctacgtcacacaactaatgctgagtggtatctcagaaagaaacaaatggcgtcttagagatgt atcacagancgggtgtggaaggagcataacgggagacafactgagtggttcgagatagaccataaggtgc gcaatagggctgtctgtaataatagagcatttacaatgctgaggggtacagcccacactgttaagaccaat cgtgaacgctacgcagacagaaggaacagctaggggaatctggcgtggagactggatgtacgggcc tagcactcgggtgagaagtttggtgtgtgtctctctgtgttaagtggaattagagaatgggaaggcgtaga gactatccgaaaggagtagggccgagggatgagacccctctgtaaccggaagcgcagacagtcact
178	Nostoc	acggacttaagtaattgagccttaagaagaatcttitaagtgccagctcctcaactcagggaacactaa atctgttcacagacaaaggcaatcctgagccaagccgaaagagtcagagtgctgagtagtgagtaaat naaagctcacaaactcagaggtgttaactcgaagctagtcgggaagggtgcagagactcagagggagctac cctaaccgtaa
179	Nostoc	acggacttaactgaattgagccttagagagaagaattcttaagtgctcagctcctcaactcagggaacact aatctgttgacagacaaggcaatccctgagccaagccgagaacictaagttattgggaagggtgcagaga ctcagacgggagctacccctaaccgta
180	nodular	acggacttagaaaactgagcctgagcagaaatctcaagtggaagctctcaatcagggaaacctaa atctgtttacagataatggcaatcctgagccaagccgaanacagctcagagtgtaagctcataactcgc gggaagggtgcagagactcagcgggagctacccctaaccgta
181	pleurocapsa	acggacttaaaaaatgagccttgagcagagaatctgtcatgcgaacgctctcaatcagggaaacct aagctctggcaacagataatggcaatcctgagccaagccctaataaggaanaaacattttacctttacctt gaaagggaagggtgcagagactcaacgggagctacccctaaccaggta
182	planctotrix	acggacttaagaataatgagccttgagcagagaatctctcaagtgtaagctgtcaatcagggaaa cctaatactgtaaatcagacaaggcaatcctgagccaagccctaggggtattagaaatgaggaggttcc ccaatcgaagataatcctaggaagggtgcagagactcagcgggagctacccctaaccgta

[0478] En algunas formas de realización, un fragmento de intrón 3' es un fragmento que tiene una secuencia enumerada en la Tabla 21. Una construcción que contiene un fragmento de intrón 3' enumerado en la Tabla 21 contendrá el fragmento de intrón 5' correspondiente como se enumera en la Tabla 20 (p. ej., ambos representan fragmentos con el intrón Azop1).

Tabla 22. Secuencias de fragmentos del intrón 5' del espaciador y de Anabaena.

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
183	T25 L10	agtatataagaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGC
184	T25 L20	AGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
185	T25 L30 (180-10) [Control]	ctgaaatatactatactacaaacaaaccacTAGATGACTTACA ACTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAG GGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGC GAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
186	T25 L40	catcaacaataatgaaatatactatactacagatataagacaacaaaccacTAGATGACTTAC AACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAA CGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCA ATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggct cgagc
187	T25 L50	catcaacaataatgaaatatactatactacagatataagacaacaaaccacTAGATG ACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTA CCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCA AAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAAT CCGTggctcgagc
188	T50 L10	tagcgtcagcaaacaaacnaaTAGATGACTTACA ACTAATCGGAAGGTGC AGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAA AGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAG CTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
189	T50 L20	atactatactagcgtcagcaaacaaacnaaTAGATGACTTACA ACTAATCGGA AGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGA GGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAG CGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
190	T50 L30	gtgtgaagctatactatactagcgtcagcaaacaaacnaaTAGATGACTTACA ACTA ATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCA AGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGG CAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagc
191	T50 L40	ccacacgtgagtggaagctatactatactagcgtcagcaaacaaacnaaTAGATGACTTA CAACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTA ACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCC AATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgg ctcgagc
192	T50 L50	cgaatgatgccacacgtgagtggaagctatactatactagcgtcagcaaacaaacnaaTAGAT GACTTACA ACTAATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCT ACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTC AAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAA TCCGTggctcgagc

128

(Continuación)

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
204	T25 L30 150-10	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAACCTAA TCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
205	T25 L30 150-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAACCTAA TCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgagcataa tatccg
206	T25 L30 180-20	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAACCTAA TCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagcgcg ccfaccg
207	T25 L30 180-20x2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAACCTAA TCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagcgcg cctaccgaaagccggcgctcgagcttagccg
208	T25 L30 150-20x2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAACCTAA TCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggatcgagcataa tatccgaaacgaggatacaagtgacatgc
209	T25 L30 125-20x2	ctgaaattatacttatactcagtatatgacaacaaccacTAGATGACTTACAACCTAA TCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTgattcacatctaaa ttaagaaacgataaatagaactctaac
210	T0 L0	aaacaaccacTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGAC TCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGAGAG AGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAA GAGAATGAAAATCCGTggctcgagcgc
211	T100 L5	cgggcaacaacaacaaTAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAG AGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAG AGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagcgc
212	T75 L30	cgctcgagcagcttccggcagtgagcaacaacaacaaTAGATGACTTACAACCT AATCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCA AAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAG GCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgagcgc
213	T0 L0a	aaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GTggctcgagcgc
214	T25 L10a	agtatataagaacaacaaccacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgagcgc

(Continuación)

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
215	T25 L20a	ctgaaattatactatatactcaaacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgccgc
216	T25 L30a (180-10) [Control]	ctgaaattatactatatactcagtagaacaacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgccgc
217	T50 L10a	tagctcgccgcacacacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgccgc
218	T50 L20a	atactcatactagctcgccgcacacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgccgc
219	T50 L30a	gtgtgaagctatactcatactagctcgccgcacacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgccgc
220	T75 L10a	cggctcgccgcacacacacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgccgc
221	T75 L20a	cggctcgccgcacacacacacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGA GAATGAAAATCCGTggctcgccgc
222	T75 L30a	cggctcgccgcacacacacacacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGA ATGAAAATCCGTggctcgccgc
223	T0 L0b	aaacacacacacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAA GCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCC GTggctcgccgc
224	T25 L10b	agtatataagaacacacacacacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCT CAAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAA AATCCGTggctcgccgc
225	T25 L20b	ctgaaattatactatatactcaaacacacacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCC CAATTCTCAAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGA ATGAAAATCCGTggctcgccgc
226	T25 L30b (180-10)	ctgaaattatactatatactcagtagaacaacacacacAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCA AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgccgc
	[Control]	AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgccgc
227	T50 L10b	tagctcgccgcacacacacacacacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgccgc
228	T50 L20b	atactcatactagctcgccgcacacacacacacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGT CCAATTCTCAAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAG AATGAAAATCCGTggctcgccgc
229	T50 L30b	gtgtgaagctatactcatactagctcgccgcacacacacacacAAGACGAGGGTAAAG AGAGTCCAATTCTCAAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTG CAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgccgc
230	T75 L10b	cggctcgccgcacacacacacacacAAGACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATT CTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGA AAATCCGTggctcgccgc

(Continuación)

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
231	T75 L20b	cgctcgcagccagtgccgagcaaacacacaaaAAGACGAGGGTAAAGAGAGAG TCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGCAAGA GAATGAAAATCCGTggctcgcagc
232	T75 L30b	cgctcgcagcagcttcggccagtgccgagcaaacacacaaaAAGACGAGGGTAAAG AGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCT GCAAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagc
233	T25 L30 10-0	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacTAAATGACTTACAATAA TCGGAAGGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAA GACGAGGGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGC AGTAGCGAAAGCTGCAAGAGAATGAAAATCCGT
234	T25 L30a 10-0	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGT
235	T25 L30a 125-10	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTgatttaacag
236	T25 L30a 125-20	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTgattcacaataataatacag
237	T25 L30a 150-10	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
238	T25 L30a 150-20	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggatcgcagcacaataatacag
239	T25 L30a 180-20	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctacag
240	T25 L30b 10-0	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGT
241	T25 L30b 125-10	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTgatttaacag
242	T25 L30b 125-20	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTgattcacaataataatacag
243	T25 L30b 150-10	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggatcatagc
244	T25 L30b 150-20	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggatcgcagcacaataatacag
245	T25 L30b 180-20	ctgaaattatactatactcagttatgacaaacacacacAAGACGAGGGTAAAGAG AGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAGGCAGTAGCGAAAGCTGC AAGAGAATGAAAATCCGTggctcgcagcgcgcctacag

[0479] En algunas formas de realización, un espaciador y un fragmento de intrón 5' son espaciadores y fragmentos que tienen secuencias como se enumeran en la Tabla 22.

Tabla 23. Secuencias del fragmento del intrón 3' del espaciador y de Anabaena.

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
246	T25 L10	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaacacaaactatataact
247	T25 L20	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaacacaaagagtataagataatttcag
248	T25 L30 (180-10) [Control]	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaacacaaagtcataatactagtagtataagataatttcag
249	T25 L40	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaacacaaagtcataatactagtagtataagataatttcataattgttgatg
250	T25 L50	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaacacaaagcgataatgttcataatactagtagtataagtagtttcataattg ttgatg
251	T50 L10	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaaaaacaaagctgacgcta
252	T50 L20	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaaaaacaaagctgacgctagtatagtagt
253	T50 L30	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaaaaacaaagctgacgctagtatagtagttagcttcacac
254	T50 L40	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaaaaacaaagctgacgctagtatagtagttagcttcacactcaggtagg
255	T50 L50	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAAACAACacaaaaaacaaagctgacgctagtatagtagttagcttcacactcaggtaggc atcattcgg

(Continuación)

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
256	T75 L10	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaaacaagctcgaccg
257	T75 L20	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaaacaagctcgaccg
258	T25 L30 1MM	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaacacagtcatactagatataagataaattcag
259	T25 L30 3MM	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaacacagtcatactagatataagataaattcag
260	T25 L30 5MM	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaacacagtcatactagatataagataaattcag
261	T25 L30 8MM	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaacacagtcatactagatataagataaattcag
262	T25 L30 Fuera del objetivo 10	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaacacagtcatactagatataagataaattcag
263	T25 L30 Fuera del objetivo 20	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaacacagtcatactagatataagataaattcag
264	T25 L30 Fuera del objetivo 30	gctgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaacacagtcatactagatataagataaattcag
265	T25 L30 125-10	ctgttaacACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAAacacaaacacagtcatactagatataagataaattcag
266	T25 L30 125-20	cgtaattatattgtgaacACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTAAGTGGATGCTCTCAAACTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT TAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAAacacaaacacagtcatactagatataagataaattcag

134

(Continuación)

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
277	T25 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAATAcacaaacacaacttatatact
278	T25 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAATAcacaaacacaagagtataagtaattic ag
279	T25 L30a (180-10) [Control]	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAATAcacaaacacaagtcataactagtataa gtataatticag
280	T50 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAATAaacaanaacaaagctgaagcta
281	T50 L20a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAATAaacaanaacaaagctgaagctagtatga gtat
282	T50 L30a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAATAaacaanaacaaagctgaagctagtatga gtatagcttcacac
283	T75 L10a	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCCTAACGTCAAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAATAaacaanaacaaagctgcacccg

(Continuación)

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
284	T75 L20a	getgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAATAaacaanaacagctgcactgggtcgg agc
285	T75 L30a	getgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAAATAaacaanaacagctgcactggcgga agctgcagagagc
286	T0 L0b	getgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcaacnaacnaa
287	T25 L10b	getgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcaacaaacacaaactatatact
288	T25 L20b	getgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcaacnaacacagagtataagataat tcag
289	T25 L30b	getgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC
(180-10) [Control]		TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcaacnaacacagtcataatactgagiat aagtataaattcag
290	T50 L10b	getgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaanaacacagctgacgcta
291	T50 L20b	getgagagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaanaacacagctgacgctagtatg agtat

(Continuación)

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
292	T50 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaanaacagctgcagctagtatg agtatagcttcacac
293	T75 LIOb	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaanaacagctgcacacg
294	T75 L20b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaanaacagctgcactgggtcg gagcg
295	T75 L30b	gctgcgagccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCaacaanaacagctgcactggcg gaagctcgctcgagcg
296	T25 L30 IO-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAAcacaacacacagctcatatactgagtataagfataatttcag
297	T25 L30a IO-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTC GACGGGAGCTACCCTAACGTCAGACGAGGGTAAAGAGAGA GTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacacagctcatatactgagtataat ttcag
298	T25 L30a 125-10	ctgttaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA
		GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacacagctcatatactgagtataa gtataatttcag
299	T25 L30a 125-20	cgtaatttatatiggaatcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATC TAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGT GCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCAGACGAGGGT AAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaacacacagctcatatac tgagtataagfataatttcag

(Continuación)

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
300	T25 L30a 150-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGGGTAAAGA GAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcatactgagtataa gtataaatttcag
301	T25 L30a 150-20	cggatattatgctgcatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAA TCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGT AATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAG GTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAGG GTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcata ctgagtataaagtataaatttcag
302	T25 L30a 180-20	cggtagggcgctgcatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG GAAATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAG GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTC AAGACGAG GGTAAAGAGAGAGTCCAATTCTCAAAGCCAATAcacaaacacaagtcata ctgagtataaagtataaatttcag
303	T25 L30b 10-0	ACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCTTTAAG TGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTTATAGA CAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGTAAGTT AACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGAGACTC GACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaaacacaagtcatactgagtataa atttcag
304	T25 L30b 125-10	ctgttaacACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTCCT TTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaaacacaagtcatactgagtata aagtataaatttcag
305	T25 L30b 125-20	cgttaattatattgtgaacACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGA AATTCCTTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATC TAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAA TTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGT GCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaaacacaagtcata actgagtataaagtataaatttcag
306	T25 L30b 150-10	gctatgatccACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAGAAATTC TTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAATCTAGTT ATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGTAATTAGT AAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAGGTGCAGA GACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaaacacaagtcatactgagtata aagtataaatttcag

(Continuación)

SEQ ID NO	Espaciador	Secuencia
307	T25 L30b 150-20	cggatattatgctgctgctacCGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAAG AAATTCCTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAAA TCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAGT AATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAAG GTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaaagtc afatactgagtaagtaataatticag
308	T25 L30b 180-20	cggtaggcgcgcgcgcgcgcACGGACTTAAATAATTGAGCCTTAAAGAA GAAATTCCTTAAGTGGATGCTCTCAAACCTCAGGGAAACCTAA ATCTAGTTATAGACAAGGCAATCCTGAGCCAAGCCGAAGTAG TAATTAGTAAGTTAACAATAGATGACTTACAACCTAATCGGAA GGTGCAGAGACTCGACGGGAGCTACCCTAACGTCcacaacacaaagtc catatactgagtaagtaataatticag

[0480] En algunas formas de realización, un fragmento espaciador y de intrón 3' es un fragmento espaciador y de intrón que tiene secuencias, tal como se ha enumerado en la Tabla 23.

Tabla 24. Secuencias CAR

SEQ ID NO	CAR	Secuencia
309	FMC63-4-1BB	ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCC ATCCTGCTTTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGAC CACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCAT CAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACCTG GTATCAGCAAAAGCCCGACGGCACCCTGAAGCTGCTGATCTA CCACACCAGCAGACTGACAGCGGCGTGCCAAAGCAGATTTTC TGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCTGACAATCAGCAA CCTGGAAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGG CAACACCTTGCCTTACACCTTTGGCGGAGGACCAAGCTGGA AATCACCAGGCTCTACAAGCGGACGCGGCAACCTGGATCTGG CGAGGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAACTGCAAGAGTCTG GCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTG TACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCTGATTACGGCGTGTCTCTG GATCAGACAGCCTCTCGGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGT GATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAA GTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAGGT GTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCAT CTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGC CATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTTTCTTCT GCCCGCGCTATCGAAGTGATGTACCTCCTCTTACCTGGACA ACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCCAGTGAAAGGGCAAG CACCTGTGTCTCTCTCCACTGTTCCTCCCGGACCTAGCAAGCCTT TCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGGCGTGCTGGCTGTTACAG CCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCAAGAGA GGCCGGAAGAACTTCTTTATATATTCAAGCAGCCCTTTATGC GACCCGTTTCACTACTACCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCC GCTTTCCAGAAGAGGAGGAGGGCGGGTCCGAACCTGtaa

(Continuación)

SEQ ID NO	CAR	Secuencia
5	310	ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCC
		ATCCTGCTCTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGAC
		CACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGGCGATAGAGTGACCAT
		CAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
10		GTATCAGCAAAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTA
		CCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTC
		TGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCTGACAATCAGCAA
		CCTGGAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGG
15		CAACACCTGCTTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGA
		AATCACC GGCTCTACAAGCGGCAGCGGCAAACTGGATCTGG
		CGAGGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAAACTGCAAGAGTCTG
		GCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTG
		TACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCTGATTACGGCGTGTCTTG
20		GATCAGACAGCCTCCTCGGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGT
		GATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAA
		GTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAGGT
		GTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCAT
		CTACTATTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGC
25		CATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCAGCGTGACCGTTTCTTCT
		GCCGCCGCTATCGAAGTGATGTACCCCTCCTCCTTACCTGGACA
		ACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAG
		CACCTGTGTCTTCTCCACTGTTCCCCGGACCTAGCAAGCCTT
30		TCTGGGTGCTCGTTGTTGTTGGCGGCGTGCTGGCCTGTTACAG
		CCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCCGAAGC
		AAGCGGAGCCGGCTGCTGCACTCCGACTACATGAACATGACC
		CCTAGACGGCCCCGGACCAACCAGAAAGCACTACCAGCCTTAC
		GCTCCTCCTAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCC _{taa}

(Continuación)

SEQ NO	ID	CAR	Secuencia
5			ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCC
10			ATCTGCTCTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGAC
15			CACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGGCAGATAGAGTGACCAT
20			CAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
25			GTATCAGCAAAAGCCCCGACGGCACCCTGAAGCTGCTGATCTA
30			CCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTC
35			TGGCAGCGGCTCTGGCACCAGCTACAGCCTGACAATCAGCAA
40			CCTGGAAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGG
45			CAACACCCTGCCCTTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGA
50			AATCACCAGGCTCTACAAGCGGCAGCGGCAAACTGGATCTGG
55			CGAGGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAACTGCAAGAGTCTG
60			GCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTG
65			TACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCCTGATTACGGCGTGCTCTG
70			GATCAGACAGCCCTCCTCGGAAAGGCCTGGAATGGCTGGGAGT
75			GATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAA
80			GTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGT
85			GTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCAT
90			CTACTATTGGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGC
95			CATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTTTCTTCT
100			GCCGCGCTATCGAAGTGATGTACCCCTCCTTACCTGGACA
105			ACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAG
110			CACCTGTGTCTTCTCCACTGTTCCTCCGGACCTAGCAAGCCTT
115			TCGGGTGCTCGTTGTGTGGCGGCGTGCTGGCTGTGTACAG
120			CCTGCTGGTTACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCCGAAGC
125			AAGCGGAGCCGGCTGCTGCACTCCGACTACATGAACATGACC
130			CCTAGACGGCCCCGGACCAACCAGAAAGCACTACCAGCCTTAC
135			GCTCTCTCTAGAGACTTCGCCGCTACCGGTCCAGAGTGAAG
140			TTCAGCAGATCCCGCGATGCTCCCGCTATCAGCAGGGCCAA
145			AACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGA
150			GTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAA
155			TGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTG
160			TATAATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAG
165			CGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAAGAGGCAAGGGAC
170	311	FMC63-CD28-zeta	
175	312	FMC63-zeta	ACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGATA
180			CCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAtaa

(Continuación)

SEQ ID NO	CAR	Secuencia
5		ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCC
10		ATCTGCTGCTTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGAC
15		CACAAGCAGCCTGTCTGCTCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCAT
20		CAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
25		GTATCAGCAAAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTA
30		CCACACCAGCAGACTGACACAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTCT
35		TGGCAGCGGCTCTGGCACCAGCTACAGCCTGACAATCAGCAA
40		CCTGGAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGG
45		CAACACCTTGCCTTACACCTTTGGCGGAGGCACCTAAGCTGGA
50		AATCACCAGGCTCTACAAGCGGCAGCGGCAAACTGGATCTGG
55		CGAGGGATCTACCAAGGGCGAAGTGAAACTGCAAGAGTCTG
60		GCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTG
65		TACAGTCAGCTGGAGTGTCCCTGCTGATTACGGCGTGTCTTG
70		GATCAGACAGCCTCTCTGGAAAGGCTGGAATGGCTGGGAGT
75		GATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAA
80		GTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAGGT
85		GTTCCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCGACACACCGCCAT
90		CTACTATTGGCGCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGC
95		CATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTTTCTTCT
100		GCCGCGCTATCGAAGTGATGTACCCTCTCTTACCTGGACA
105		ACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCCAGTGAAGGGCAAG
110		CACCTGTGTCTTCTTCACTGTTCCTCCCGGACCTAGCAAGCCTT
115		TCGGGTGCTCGTTGTTGTGGCGGCGTGCTGGCCTGTTACAG
120		CCTGCTGGTTACCGTGGCTTCAATCATCTTTTGGGTGAGAGTG
125		AAGTTCAGCAGATCCGCGGATGCTCCCGCTATCAGCAGGGC
130		CAAAACCAAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGA
135		AGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTG
140		AAATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAATCTCAAGAGGGGC
145		CTGTATAATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCCTAC
150		AGCGAGATCGGAATGAAGGCGAGCGCAGAAAGAGGCAAGGG
155		ACACGATGGACTGTACCAGGGAAGTGAACACCGCCACCAAGG
160		ATACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCTTCCAAGAtaa
165		ATGGCTCTCCCGGTACAGCCCTTCTCTGCCCCCTGGCACTCT
170		TGCTGCAATGCGGCACGACCCGACATCCAGATGACCCAGACCA
175		CAAGCAGCCTGTCTGCTAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCA
180		GCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGT
185		ATCAGCAAAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACC
190		ACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTCTG
195		GCAGCGGCTCTGGCACCAGCTACAGCCTGACAATCAGCAACC
200		TGGAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCA
205		ACACCTGCTCTTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAA
210		TCACCGGTGGAGGTGGTTCTGGCGGAGGGGGATCTGGTGGAG
215		GCGGTTTCAAGAGTGAAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTGG
220		TGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTCAGCG
225		GAGTGTCCCTGCTTGATTACGGCGTGTCTTGGATCAGACAGC
230		CTCTTCGGAAAGGCTGGAAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCA
235		GCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGCTGA
240		CCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAGGTGTGTCTTGAAGA
245		TGAACAGCCTGCAGACEGACGACACCGCCATCTACTATTGCG
250		CCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGATTATT
255		GGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTTTCTTCTACCACAACGC
260		CCGCCCCGCGACCGCCTACTCCCGCTCCCACAATTGCATCACA

(Continuación)

SEQ ID NO	CAR	Secuencia
5	314	ACCCCTGTCTTTGAGACCCGAAGCTTGTTCGACCAGCTGCCGGT
10		GGCGCGGTTTACACGCGGGGGCTCGATTTTCGCTGTGATATA
15		TATATATGGGCCCCATTGGCTGGAACATGCGGAGTATTGCTTC
20		TGAGCCTGGTGATTACCCCTCTACTGTAAGAGAGGCCGGAAGA
25		AACTTCTTTATATATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCCGTTCA
30		GACTACCCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCCAGA
35		AGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAAC TGAGAGTGAAGTTTCAGCA
40		GATCCGCGCATGCTCCCGCCTATCAGCAGGGCCAAAACCAGC
45		TGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGAC
50		GTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGG
55		CAAGCCCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGA
60		GCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCG
65		GAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGA
		CTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTATGAC
		GCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAtaa
		ATGGCTCTCCCGGTACAGCCCTTCTCCTGCCCTGGCACTCT
		TGCTGCATGCGGCACGACCCGACATCCAGATGACCCAGACCA
		CAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCA
		GCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACCTGGT
		ATCAGCAAAAGCCCCGACGGCACCGTGAACTGCTGATCTACC
		ACACCAGCAGACTGCACAGCGCGGTGCCAAGCAGATTTTCTG
		GCAGCGGCTCTGGCACCCGACTACAGCCTGACAATCAGCAACC
		TGGAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCA
		ACACCCCTGCCCTTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAA
		TCACCGGTGGAGGTGGTTCTGGCGGAGGGGGATCTGGTGGAG
		GCGGTTTCAGAAGTGAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTGG
		TGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTCAGCG
		GAGTGTCCCTGCCTGATFACGGCGTGTCCTGGATCAGACAGC
		CTCCTCGGAAAGGCCTGGAAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCA
		GCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCAGCTGA
		CCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGGAAG
		TGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCATCTACTATTGCG
		CCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGATTATT
		GGGGCCAGGGCAACCAGCGTGACCGTTTCTTCTACCACAACGC
		CCGCCCCGCGACCGCCTACTCCCGCTCCCACAATTGCATCACA
		ACCCCTGTCTTTGAGACCCGAAGCTTGTTCGACCAGCTGCCGGT
		GGCGCGGTTTACACGCGGGGGCTCGATTTTCGCTGTGATATA
		TATATATGGGCCCCATTGGCTGGAACATGCGGAGTATTGCTTC
		TGAGCCTGGTGATTACCCCTCTACTGTAAGAGAGGCCGGAAGA
		AACTTCTTTATATATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCCGTTCA
		GACTACCCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCCAGA
		AGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAAC TGAGAGTGAAGTTTCAGCA
		GATCCGCGCATGCTCCCGCCTATAAGCAGGGCCAAAACCAGC
		TGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGAC
		GTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGG
		CAAGCCCAGACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGA
		GCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCG
		GAATGAAGGGCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGA
		CTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACCAAGGATACCTATGAC
		GCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCTCCAAGAtaa

(Continuación)

SEQ ID NO	CAR	Secuencia
5		ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCC
10		ATCCTGCCTTTCTGCTGATCCCCCAGGTTCAACTCCAGCAGTC
15		TGGTCCCGGCTCGTTAAACCAAGCCAGACTTTGTCTCTTACC
20		TGTGCTATCAGTGCCGATAGCGTGTCTAGTAATTCAGCCGCAT
25		GGAAC TGGATCCGACAATCACCGAGTAGGGGACTTGAATGGC
30		TGGGTAGAACCTATTACCGGTCCAAATGGTAC AATGACTATG
35		CAGTGTCTGTAAAAAGCAGGATCACGATCAACCTGATACGT
40		CTAAAAACCAGTTTTTCTCTGCAACTTAATAGTGTGACCCCTGA
45		AGACACCGCTGTGTATTACTGTGCACGGGAGGTTACCGGTGA
50		TCTTGAAGATGCTTTTGATATATGGGGCCAAGGTACGATGGT
55		CACGGTGTCTAGTgggggaggcggcagcGACATACAGATGACGCAG
60		AGCCCATCCAGTCTCTCCGCGTCTGTTGGTGACAGAGTGACTA
65		TTACATGTAGGGCGTCTCAGACCATTGGTCTTACCTCAATTG
70		GTATCAACAGCGACCAGGCAAAGCACCGAACTTGCTCATTTA
75		CGCTGCCAGCTCACTCCAAAGTGGTGTGCCGTCCAGATTTAGT
80		GGTAGGGGCACTGGCACTGATTTCACTCTGACTATTTCAAGTC
85		TTCAAGCTGAGGATTTTGCCACATACTACTGCCAGCAAAGTT
90		ACTCAATACCTCAGACTTTTGGACAGGGGACAAAATTTGGAGA
95		TTAAAtccggaACCACAACGCCCGCCCCGCGACCGCCTACTCCC
100		GCTCCCAACAATTGCATCACAAACCCCTGTCTTTGAGACCCGAA
105		GCTTGTGACACAGCTGCCGGTGGCGCGGTTACACGCCGGGGG
110		CTCGATTTCGCTGTGATATATATATATGGGCCCCCATTTGGCTG
115		GAACATGCGGAGTATTGCTTCTGAGCCTGGTGATTACCTCTA
120		CTGTAAGAGAGGGCCGGAAGAAACFTCTTTATATATATCAAGCA
125		GCCCTTTATGCGACCCGTTTACAGACTACCCAAGAGGAAGATGG
130		ATGCAGTTGCCGCTTTCCAGAAGAGGAGGAGGGCGGGTGCGA
135		ACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGATGCTCCCGCCTA
140		TAAGCAGGGCCAAAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGG
145		GGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGC
150		AGAGATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAATCC
155		TCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGG
160		CCGAGGCCTACAGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGA
165		AGAGGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCAC
170		CGCCACCAAGGATACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCT
175		GCCTCCAAGAtaa

(Continuación)

SEQ ID NO	CAR	Secuencia
5		ATGCTGCTGCTGGTCAATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCC
10		ATCCTGCCCTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGACCCAGAC
15		CACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCGGGGCGATAGAGTGACCAT
20		CAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTG
25		GTATCAGCAAAAGCCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTA
30		CCACACCAGCAGACTGACAGCGGCGTGCCAAGCAGATTTTC
35		TGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACAGCCTGACAATCAGCAA
40		CCTGGAAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGG
45		CAACACCCCTGCCCTTACACCTTTGGCGGAGGACCAAGCTGGA
50		AATCACCGggggggaggatccCAGGTTCAACTCCAGCAGTCTGGTC
55		CCGGCCTCGTTAAACCAAGCCAGACTTTGTCTCTTACCTGTGC
60		TATCAGTGGCGATAGCGTGTCTAGTAATTCAGCCGCATGGAA
65		CTGGATCCGACAATCACCAGTAGGGGACTTGAATGGCTGGG
70		TAGAACCATTATACCGGTCCAAATGGTACAATGACTATGCAGT
75		GTCTGTAAAAAGCAGGATCACGATCAACCCGTGATACGTCTAA
80		AAACCAGTTTTTCTCTGCAACTTAATAGTGTGACCCCTGAAGAC
85		ACCGCTGTGTATTACTGTGCACGGGAGGTTACCGGTGATCTTG
90		AAGATGCTTTTGATATATGGGGCCAAGGTACGATGGTCAEGG
95		TGTCTAGTGGCTCTACAAGCGGCAGCGGCAACCTGGATCTG
100		GCGAGGGATCTACCAAGGGCGACATACAGATGACGCAGAGC
105		CCATCCAGTCTCTCCGCGTCTGTTGGTGACAGAGTGACTATTA
110		CATGTAGGGCGTCTCAGACCATTGGTCTTACCTCAATTGGTA
115		TCAACAGCGACCAAGGCAAGCACCAGAACTTGCTCATTTACGC
120		TGCCAGCTCACTCCAAAGTGGTGTGCCGTCCAGATTTAGTGGT
125		AGGGGCAGTGGCACATGATTTCACTCTGACTATTTCAAGTCTTC
130		AAGCTGAGGATTTTGGCCACATACTACTGCCAGCAAAGTFACT
135		CAATACCTCAGACTTTTGGACAGGGGACAAATTTGGAGATTAA
140		AAgggggaggcggcagcGAAGTGAAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGG
145		ACTGGTGGCCCCATCTCAGTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTC
150		AGCGGAGTGTCCCTGCCCTGATTACGGCGTGTCTGGATCAGA
155		CAGCCTCCTCGGAAAGGCCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGG
160		GGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGG
165		CTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCCCTG
170		AAGATGAACAGCCTGCAAGACCGACGACACCGCCATCTACTAT
175		TGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGAT
180		TATTGGGGCCAGGGCACCAAGCGTGACCGTTTCTTCTTccggaACC
185		ACAACGCCCCGCCCCGCGACCGCCTACTCCCGCTCCCACAATT
190		GCATCACAACCCCTGTCTTTGAGACCCGAAGCTTGTGACCA
195		GCTGCCGGTGGCGCGGTTTACACGCGGGGGCTCGATTTGCGC
200		TGTGATATATATATATGGGCCCCATTGGCTGGAACATGCGGA
205		GTATTGCTTCTGAGCCTGGTGATTACCTCTACTGTAAGAGAG
210		GCCGGAAGAACTTCTTTATATATTTCAAGCAGCCCTTTATGCG
215		ACCCGTTCAAGACTACCCAAGAGGAAGATGGATGCAGTTGCCG
220		CTTTCCAGAAGAGGAGGAGGGCGGGTGCGAACTGAGAGTGA
225		AGTTACAGCAGATCCGCCGATGCTCCCGCTATAAGCAGGGCC
230		AAAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAA
235		GAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGA
240		AATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAATCTCAAGAGGGGCC
245		TGTATAATGAGCTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGGCTACA
250		GCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGCAGAAAGAGGCAAGGGA
255		CACGATGGACTGTACCAGGGACTGAGCAACCGCCACCAAGGAT
260		ACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCTCCAAGAtaa

(Continuación)

SEQ ID NO	CAR	Secuencia
5		ATGCTGCTGCTGGTCACATCTCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCCC
		ATCCTGCCCTTCTGCTGATCCCCCAGGTTCAACTCCAGCAGTC
		TGGTCCCGGCTCTGTTAAACCAAGCCAGACTTTGTCTCTTACC
10		TGTGCTATCAGTGCGGATAGCGTGTCTAGTAATTCAGCCGCAT
		GGAAC TGGATCCGACAATCACCGAGTAGGGGACTTGAATGGC
		TGGGTAGAACCTATTACCGGTCCAAATGGTACAATGACTATG
		CAGTGTCTGTAAAAAGCAGGATCACGATCAACCCGTGATACGT
15		CTAAAAACCAGTTTCTCTGCAACTTAATAGTGTGACCCCTGA
		AGACACCGCTGTGTATTACTGTGCACGGGAGGTTACCGGTGA
		TCTTGAAGATGCTTTTGATATATGGGGCCCAAGGTACGATGGT
		CACGGTGTCTAGTgggggagggcgagcGACATACAGATGACGCAG
		AGCCCATCCAGTCTCTCCGCGTCTGTGTGGTGACAGAGTGACTA
20		TTACATGTAGGGCGTCTCAGACCATTGTGGTCTTACCTCAATTG
		GTATCAACAGCGACCAGGCAAAAGCACCGAACTTGTCTATTTA
		CGCTGCCAGCTCACTCCAAAGTGGTGTGCCGTCCAGATTTAGT
		GGTAGGGGCAGTGGCACTGATTTCCTCTGACTATTTCAAGTC
		TTCAAGCTGAGGATTTTGGCCACATACTACTGCCAGCAAAAGTT
25		ACTCAATACCTCAGACTTTTGGACAGGGGGACAAATTTGGAGA
		TTAAAGGGGGAGGCGGATCCGGCCGGTGGTGGCTCCGGCGGTG
		GTGGTCTGGAGCCGGCGGAAGCGGTGGGGGTGGTAGCGAC
		ATCCAGATGACCCAGACCACAAGCAGCCTGTCTGCCAGCCTG
30		GGCGATAGAGTGACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGGACATC
		AGCAAGTACCTGAAC TGGTATCAGCAAAAGCCCCGACGGCACC
		GTGAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGC
		GTGCCAAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCAGTAC
		AGCCTGACAATCAGCAACCTGGAAACAAGAGGATATCGCTACC
35	317	TACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCCTGCCTTACACCTTTGGCG
	CircCD19_22Biespe- cífico 30	GAGGCACCAAGCTGGAAATCACCGGCTCTACAAGCGGCAGC
		GGCAAACCTGGATCTGGCGAGGGATCTACCAAGGGCGAAGT
		GAAACTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCATCTCA
40		GTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTCAGCGGAGTGTCCCTGCCT
		GATTACGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCTCCTCGGAAAGGC
		CTGGAAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTAC
		TACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGAC
		AACTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAG
45		ACCGACGACACCGCCATCTACTATTGGCGCAAGCACTACTAC
		TACGGCGGCAGCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACC
		AGCGTGACCGTTTCTTCTccgggaACCACAACGCCCGCCCGCGA
		CCGCCTACTCCCGCTCCCACAATTGCATCACAAACCCCTGTCTT
50		TGAGACCCGAAGCTTGTGCGACCAGCTGCCGGTGGCGCGGTTT
		ACACGCGGGGGCTCGATTTCCCTGTGATATATATATATGGG
		CCCCATTGGCTGGAAACATGCGGAGTATTGCTTCTGAGCCTGGT
		GATTACCCCTACTGTAAAGAGAGGCCGGAAGAACTTCTTTA
		TATATTCAAGCAGCCCTTTATGCGACCCGTTACAGACTACCCAA
55		GAGGAAGATGGATGCAGTTGCCGCTTTCCAGAAGAGGAGGA
		GGGCGGGTGCGAACTGAGAGTGAAGTTACAGCAGATCCGCCG
		ATGCTCCCGCTATAAGCAGGGGCCAAAACCAGCTGTACAACG
		AGCTGAACCTGGGGAGAAGAGAAGAGTACGACGTGCTGGAC
		AAGCGGAGAGGCAGAGATCCTGAAATGGGCGGCAAGCCAG
60		ACGGAAGAATCCTCAAGAGGGCCTGTATAATGAGCTGCAGAA
		AGACAAGATGGCCGAGGCCCTACAGCGAGATCGGAATGAAGG
		GCGAGCGCAGAAGAGGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAG
		GGACTGAGCACCCGCCACCAAGGATACCTATGACGCCCCTGCAC
65		ATGCAAGGCCCTGCCTCCAAGAtaa

[0481] En algunas formas de realización, un CAR está codificado por una secuencia de nucleótidos como se enumera en la Tabla 24.

Tabla 25. Secuencias del dominio CAR.

SEQ NO	ID	Proteína	Secuencia
318		4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
319		Dominio intracelular CD3ζ	RVKFSRSADAPAYKQGQNLQYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
320		Dominio de señalización intracelular CD28	QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCASGYTFTDYYMHWVRQAPGQ GLEWMGWNPNSGGTNYAQKFQGRVTMTDRDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCASGWDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGS GGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIRYYLSWYQQKP GKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CLQYITPDPGPGTKVEIK
321		FMC63 VH	EVKLQESGPGVLAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRGGLE WLGVIWGETTYNSALKSRLTHIKDNSKSVFLKMNSLQTDITA IYYCAKHYYVGGSYAMDYWGOGTSVTVSS
322		FMC63 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGN TLPYTPGGGKLEIT

[0482] En algunas formas de realización, un dominio CAR codificado por un polinucleótido inventivo tiene una secuencia como se enumera en la Tabla 25.

Tabla 26. Secuencias PD-1 o PD-L1.

SEQ NO	ID	Descripción	Secuencia
323		Cadena pesada de pembrolizumab	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWV RQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSST TTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK
324		Cadena ligera de pembrolizumab	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWY QQKPGQAPRLIYLASYLESQVPAFSGSGSGTDFTLTIS LEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPVTKSFNRGEC

(Continuación)

SEQ NO	ID	Descripción	Secuencia
5			
10	325	Cadena pesada de nivolumab	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWDGSKRYADSVKGRFTISRDNK NTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTILTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWS NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVF LFPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVFQNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGSEFLYSLRTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNH YTQKSLSLSPGK
20	326	Cadena ligera de nivolumab	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPE DFAVYYCQQSSNWPRTPGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
30	327	Cadena pesada de atezolizumab	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQ APGKGLEWVAVWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTILTV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
40			NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM EALHNHYTQKSLSLSPGK
45	328	Cadena ligera de atezolizumab	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSQSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQYLYHPATFQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
50	329	Cadena pesada de Avelumab	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQ APGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDYWGQGTILTV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
60			
65			

(Continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
330	Cadena ligera de avelumab	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGL QAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTV TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV KAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS
331	Cadena pesada de Durvalumab	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVR QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPEFEKGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGPYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
332	Cadena ligera de Durvalumab	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYVGSFPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

[0483] En algunas formas de realización, un sitio de escisión que separa secuencias de expresión codificadas por un polinucleótido inventivo tiene una secuencia enumerada en la Tabla 26.

Tabla 27. Secuencias de citocinas.

SEQ ID NO	Citocina	Secuencia
333	IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFY
		MPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSHSTLT
334	IL-12A	RNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMMALCLSSYIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQN MLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIR AVTIDRVMSYLNAS
335	IL-12B	IWELKKDYYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWTITISTDLTFSV KSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQEDSACPA AEESLPIEVMDAVHKLKYENYTSFFIRDIKPDPPKNLQKPLKN SRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQKSKREKKDRVFTD KTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCS
336	IL-7	DCDIEGKDGKQYESVLMVSDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHI CDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLN CTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLLNDLCTFLKRLI QEIKTCWNKILMGTEKH

(Continuación)

SEQ ID NO	Citocina	Secuencia
337	IL-10	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTTFFQMKDQLD NLLLKESLLEDFKGYLGQCQALSEMIQFYLEEVMPPQAEHQDPDIKA HVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNFNLQEQ KGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
338	IL-15	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL ELQVISLESQDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEELE EKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
339	IL-18	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTSDSCRDNAPRTI FIHSMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKHSFKEMNPPDNIKD TKSDHFFQRSVPQHDNKMQFESSYEGYFLACEKERDLFKLILKK EDELGDRSIMFTVQNEQ
340	IL-27beta	RKGPPAALTLPRVQCRASRYPIAVDCSWTLPPAPNSTSPVSFIATY RLGMAARGHSWPCLQQTPTSTSTCTTIDVQLFSMAPYVLNVTAVH PWGSSSSSFVPFTEHIIKPDPEGVRLSPLAERQLQVQWEPPGSPWF PEIFSLKYWIRYKROGAARFHRVGPIEATSFILRAVRPRARYVQV AAQDLTDYGELSDWSLPATATMSLGK
341	IFNgamma	QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNPKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAHIELIQVMAELSPAAGTKRKRKRSQ MLFRG
342	TGFbeta1	ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFC LGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIV YYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

[0484] En algunas formas de realización, una citoquina codificada por un polinucleótido inventivo tiene una secuencia como se enumera en la Tabla 27.

Tabla 28. Secuencias de factores de transcripción.

SEQ ID NO	Factor de transcripcion	Secuencia
343	FOXP3	MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGT FQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGP LPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLT PPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPR
344	FOXP3	KDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEDFLKHCQADH LLDEKGRAQCLLOREMVSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAKGM ALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPWWSGPREAPDSLFAV RRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILE APEKQRTLNEIYHWFTRMF AFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFV RVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSCSNPTPGP MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGT FQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGP LPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLT PPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPR KDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEDFLKHCQADH LLDEKGRAQCLLOREMVSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAKGM ALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPWWSGPREAPDSLFAV RRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILE APEKQRTLNEIYHWFTRMF AFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFV RVESEKGAVWTVDELEFRKKR

(Continuación)

SEQ ID NO	Factor de transcripcion	Secuencia
345	FOXP3	GGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQAL LQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATG VFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLS AVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEDFLKHCQADHLLDEK GRAQCLLOREMOVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKA SSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAPWSGPAPDSLFAVRRHLW GSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQ RTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLHLKCFVRVESE KGAVWTVDELEFRKKR
346	ESTAT5B	MAVWIAQQLQGEALHQMQUALYQGHFPIEVRHYLSQWIESQA WDSVDLDNPQENIKATQLLEGLVQELQKKAHQVGEDGFLKLI KLGHYATQLQNTYDRCPMELVRCIRHILYNEQRLVREANNGSSP AGSLADAMSQKHLQINQTFEELRLVTQDTENELKKLQQTQYFII QYQESLRIQAQFGPLAQLSPQERLSRETALQKQVSLAWLQRE AQTLQQYRVELAEKHQKTLQLLRKQQTILDELIQWKRQQLA GNGGPPEGSLDVLQSWCEKLAHHWQNRQQIRRAEHLCOQLPIPG PVEEMLAEVNATITDIISALVTSTFHEKQPPQVLKTQTKFAATVR LLVGGKLNVMNPPQVKATHISEQQAQKSLKNNENTRNDYSGEIL NNCCVMEYHQATGTLAHFRNMSLKRIKRSRRGAESVTEEFK TILFESQPSVGGNELVFQVKTLSLPVVVIVHGSQDNNATATVLW DNAFAEPGRYPFAVPDKVLWPQLCEALNMKFAEVQSNRGLTK ENLVFLAQKLFNNSSSHLEDYSGLSVSWQFNRENLPGRNYTFW QWFDGYMEVLKKHLKPHWNDGAILGFVNKQQAHDLLINKPDG TFLLRFSDSIEGIGITIAWKFDSDOERMFWNLMPFTTRDFSIRSLADR LGDNLNLIYVFPDRPKDEVYSKYYPVPCESATAKAVDGYVKPQ IKQVVPEFVNASADAGGGSATYMDQAPSPAVCPQAHYNMYPQ NPDSVLDTDGDFFLEDTMDVARRVEELLGRPMDSQWIPHAQS
347	HELIOS	METEADGYITCDNELSPEREHSNMAIDLTSSSTPNGQHASPSHMT STNSVKLEMQSDEECDRKPLSREDEIRGHDEGSSLEEPLIESSEVA DNRKVQELQGEQGIRLPNGKLLKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH TGERPFHCNQCASFTQKGNLLRHILKLSGEEKPFKCPFCSYACRR RDALTGHLRTHSVGKPHKCNYSYGRSYKQRSSLEEHEKCHNYL QNVSMEEAAGQVMSSHVPPMEDCKEQEPIMDNNISLVPFERPAVI EKL TGNMGRKSSSTPQKPVGEKLMRFSYPDHFDMLNLTYEKEA ELMQSHMMDQAINNATYLGAEALHPLMQHPPSTIAEVAPVISS AYSQVYHPNRIERPISRETADSHENNMDGPISLIRPKSRPOEREAS PSNSCLDSTDSESSHDDHQSYQGHFALNPKRKQSPAYMKEDVK
		ALDTTKAPKGSILKDIYKVFNGEGEQIRAFKCEHCRVFLDHYMY TIHMGCHGYRDPLECNICGYRSQDRYEFSSHIVRGEHTFH

[0485] En algunas formas de realización, un factor de transcripción codificado por un polinucleótido inventivo tiene una secuencia como se enumera en la Tabla 28.

Tabla 29. Secuencias de accesorios adicionales

SEQ ID NO	IRES	Secuencia
390	CK 3' UTR Scr	ccctgcagccgcgcacccgaagttgaagttacccgaatcagccctctgcttccagccgcgtccaaft ccctgtcttattgttccctccagccggttacccggtgacgacgaactgtgtcgagctaccacattatt ccgagacccttcattctcgcgcgcctgctgacgt
391	CK 3' UTR S2M	ggagaccgcggccacgcgcgagtaggatcgaggggtacagtcctcc

(Continuación)

SEQ ID NO	IRES	Secuencia
392	CK 3' UTR	gacaccaggatcacctctgctgacccgcccctgtgtagaatagactcatgcttccctaagacctgg attcttcccaggacattcaccgcccctgtgctctctcagtggaactgcacccaggaggcgggtc ctgactgtcttactttatcttgatgc
393	CK 5' UTR 1	AAACCCCCCTAAGCCGCCGCCGCCGCCACC
394	CK 5' UTR ₂	CCCCCCCCAACCCGTCACG
395	CK 5' UTR 3	GTCACG
396	SZ1 3' UTR Scr	tctggcactcgttaactcagtaactaaccccccttctggacacatgcgataatcgatccgcttttcc acccgcttgggaattttatctaacctgaactgaactggagctctcttgggtttacaggaggccctccgc ca
397	SZ1 S2M	ggagaccgcgccacgcccagtagtagatcgagggtacagtctcc
398	SZ1 3' UTR	ccccctgaaacccccgccccagggtcagctctcttcatccctctgtctctgcatgggtatacaagac ccttctgggaccctaagccatgtagtgcctctccctccagttgtgaaatgtgttctgttaataca ca
399	SZ1 5' UTR 1	AAACCCCC CTAAGCCGCCGCCGCCGCCACC
400	SZ1 5' UTR 2	CCCCCCCCAACCCGTCACG
401	SZ1 5' UTR 3	GTCACG
402	UTR1	gTcacG
403	UTR2	AATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAQC CACC
404	UTR3	cgaactagtattcttctggtcccccacagactcagagagaacccgccacc
405	UTR4	Agccacc
406	PARADA1	tgatAGctAaCtaG
407	PARADA2	etiquetatagtAGctAaCtaG
408	PARADA3	tGatGActGaGtGA
409	PARADA4	etiquetatagctagGtag
410	PARADAS	taa
411	PARADA6	taatagCtaaCtag
412	PARADA7	taaCtagCtaaCtag

[0486] En algunas formas de realización, un ARN circular o un ARN precursor (por ejemplo, ARN precursor lineal) divulgado en el presente documento comprende una secuencia como se enumera en la Tabla 29.

[0487] En algunas formas de realización, un polinucleótido o una proteína codificada por un polinucleótido contiene una secuencia con al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de similitud con una o más secuencias divulgadas en el presente documento. En algunas formas de realización, un polinucleótido o una proteína codificada por un polinucleótido contiene una secuencia que es idéntica a una o más secuencias divulgadas en el presente documento.

[0488] En el presente documento se describen formas de realización preferidas. Las variaciones de esas formas de realización preferidas pueden resultar evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se practique de otra manera que como se describe específicamente en el presente documento. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del objeto mencionado en las reivindicaciones adjuntas al presente según lo permita la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas sus posibles variaciones está abarcada por la invención a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente.

EJEMPLOS

[0489] Wesselhoeft et al. (2019) La circularización del ARN disminuye la inmunogenicidad y puede extender la duración de la traducción in vivo. *Célula molecular*. 74(3), 508-520 y Wesselhoeft et al. (2018) Ingeniería de ARN circular para una

traducción potente y estable en células eucarióticas. Comunicaciones de la naturaleza. 9, 2629 se incorporan como referencia en su totalidad.

[0490] La invención se describe con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos, pero no se pretende que se limite a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos abarcan todas y cada una de las variaciones de las ilustraciones con la intención de proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo hacer y utilizar la invención en cuestión y no pretenden limitar el alcance de lo que se considera la invención.

EJEMPLO 1

Ejemplo 1A: Las regiones de homología externa permiten la circularización de ARN precursor largo usando la estrategia de circularización del exón intrón permutado (PIE).

[0491] Se insertó una secuencia de 1.100 nt que contiene un IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) de longitud completa, una secuencia de expresión de luciferasa *Gaussia* (*GLuc*) y dos fragmentos de exón cortos de la construcción intrón-exón permutado (PIE) entre 3' y Intrones 5' del intrón catalítico permutado del grupo I en el gen de la timidilato sintasa (Td) del fago T4. El ARN precursor se sintetizó mediante transcripción run-off. Se intentó la circularización calentando el ARN precursor en presencia de iones de magnesio y GTP, pero no se obtuvieron productos de empalme.

[0492] Se diseñaron y agregaron regiones de homología de 9 nucleótidos y 19 nucleótidos de longitud perfectamente complementarias en los extremos 5' y 3' del ARN precursor. La adición de estos brazos de homología aumentó la eficiencia de corte y empalme del 0 al 16 % para regiones de homología de 9 nucleótidos y al 48 % para regiones de homología de 19 nucleótidos, según lo evaluado por la desaparición de la banda de ARN precursora.

[0493] El producto de empalme se trató con RNasa R. La secuenciación a través de la supuesta unión de corte y empalme de las reacciones de corte y empalme tratadas con RNasa R reveló exones ligados, y la digestión de la reacción de corte y empalme tratada con RNasa R con RNasa H dirigida a oligonucleótidos produjo una única banda en contraste con dos bandas producidas por el precursor lineal digerido con RNasa H. Esto muestra que el ARN circular es un producto importante de las reacciones de corte y empalme del ARN precursor que contiene las regiones de homología externa de 9 o 19 nucleótidos de longitud.

Ejemplo 1B: Los espaciadores que conservan las estructuras secundarias de los sitios de empalme IRES y PIE aumentan la eficiencia de la circularización.

[0494] Se diseñó e insertó una serie de espaciadores entre el sitio de empalme de PIE 3' y el IRES. Estos espaciadores se diseñaron para conservar o alterar estructuras secundarias dentro de secuencias de intrones en el IRES, el sitio de empalme PIE 3' y/o el sitio de empalme 5'. La adición de secuencias espaciadoras diseñadas para conservar estructuras secundarias dio como resultado una eficiencia de empalme del 87 %, mientras que la adición de secuencias espaciadoras disruptivas resultó en un empalme no detectable.

EJEMPLO 2

Ejemplo 2A: Las regiones de homología internas además de las regiones de homología externas crean una burbuja de empalme y permiten la traducción de varias secuencias de expresión.

[0495] Se diseñaron espaciadores para que no estuvieran estructurados, no fueran homólogos a las secuencias de intrón e IRES, y para que contuvieran regiones de homología espaciador-espaciador. Estos se insertaron entre el exón 5' y el IRES y entre el exón 3' y la secuencia de expresión en construcciones que contienen regiones de homología externa, EMCV IRES y secuencias de expresión para *Gaussia* luciferasa (longitud total: 1289 nt), luciferasa de las luciérnagas (2384 nt), eGFP. (1451nt), eritropoyetina humana (1313nt) y endonucleasa Cas9 (4934nt). Se logró la circularización de las 5 construcciones. La circularización de construcciones que utilizan fagos T4 e intrones de *Anabaena* fue aproximadamente igual. La eficiencia de la circularización fue mayor para secuencias más cortas. Para medir la traducción, cada construcción se transfectó en células HEK293. Las células transfectadas con luciferasa de *Gaussia* y de las luciérnagas produjeron una respuesta sólida medida por luminiscencia, la eritropoyetina humana fue detectable en el medio de las células transfectadas con ARNcirc de eritropoyetina y se observó fluorescencia de EGFP en células transfectadas con ARNcirc de EGFP. La cotransfección de ARNcirc Cas9 con sgRNA dirigido contra GFP en células que expresan constitutivamente GFP dio como resultado una fluorescencia eliminada en hasta el 97 % de las células en comparación con un control de sgRNA solamente.

Ejemplo 2B: El uso de CVB3 IRES aumenta la producción de proteínas.

[0496] Se realizaron construcciones con regiones de homología interna y externa y IRES diferentes que contenían secuencias de expresión de luciferasa de *Gaussia* o luciferasa de las luciérnagas. La producción de proteínas se midió mediante luminiscencia en el sobrenadante de células HEK293 24 horas después de la transfección. La construcción IRES del virus Cocksackie B3 (CVB3) produjo la mayor cantidad de proteínas en ambos casos.

Ejemplo 2C: El uso de espaciadores poliA o poliAC aumenta la producción de proteínas.

[0497] Se añadieron espaciadores poliA o poliAC de treinta nucleótidos de longitud entre el IRES y la unión de empalme en una construcción con cada IRES que produjo proteína en el ejemplo 2B. La actividad de luciferasa de *Gaussia* se midió mediante luminiscencia en el sobrenadante de células HEK293 24 horas después de la transfección. Ambos espaciadores mejoraron la expresión en cada construcción con respecto a las construcciones de control sin espaciadores.

EJEMPLO 3

Las células HEK293 o HeLa transfectadas con ARN circular producen más proteínas que las transfectadas con ARN lineal modificado o no modificado comparable.

[0498] Se comparó el ARNm codificante de luciferasa de *Gaussia* purificado por HPLC (CVB3-GLuc-pAC) con un ARNm de GLuc lineal canónico no modificado cubierto con 5' metilguanosina y con cola 3' poliA, y un ARNm de GLuc modificado con nucleósidos disponible comercialmente (pseudouridina, 5-metilcitosina) ARNm de GLuc lineal (de Trilink). La luminiscencia se midió 24 h después de la transfección, revelando que el ARNcirc produjo un 811,2 % más de proteína que el ARNm lineal no modificado en células HEK293 y un 54,5 % más de proteína que el ARNm modificado. Se obtuvieron resultados similares en células HeLa y en una comparación del ARNcirc optimizado que codifica la eritropoyetina humana con el ARNm lineal modificado con 5-metoxiuridina.

[0499] Se recogieron datos de luminiscencia durante 6 días. En las células HEK293, la transfección de ARNcirc dio como resultado una vida media de producción de proteínas de 80 horas, en comparación con las 43 horas del ARNm lineal no modificado y las 45 horas del ARNm lineal modificado. En las células HeLa, la transfección de ARNcirc dio como resultado una vida media de producción de proteínas de 116 horas, en comparación con las 44 horas del ARNm lineal no modificado y las 49 horas del ARNm lineal modificado. ARNcirc produjo sustancialmente más proteínas que los ARNm lineales modificados y no modificados durante su vida en ambos tipos de células.

EJEMPLO 4

***Ejemplo 4A:** La purificación de ARNcirc mediante digestión con RNasa, purificación por HPLC y tratamiento con fosfatasa disminuye la inmunogenicidad. El ARN circular completamente purificado es significativamente menos inmunogénico que el ARN circular no purificado o parcialmente purificado. La estabilidad de la expresión de proteínas y la viabilidad celular dependen del tipo de célula y de la pureza del ARN circular.*

[0500] Se transfectaron células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) y de carcinoma de pulmón humano A549 con:

- productos de una reacción de empalme de ARN circular GLuc no purificado,
- productos de la digestión con RNasa R de la reacción de empalme,
- productos de la digestión con RNasa R y la purificación por HPLC de la reacción de corte y empalme, o
- productos de digestión con RNasa, purificación por HPLC y tratamiento con fosfatasa de la reacción de empalme.

[0501] En comparación, la digestión con RNasa R de las reacciones de empalme fue insuficiente para prevenir la liberación de citocinas en las células A549 a controles no transfectados.

[0502] La adición de purificación por HPLC también fue insuficiente para prevenir la liberación de citoquinas, aunque hubo una reducción significativa en la interleucina-6 (IL-6) y un aumento significativo en el interferón- α 1 (IFN- α 1) en comparación con la reacción de empalme no purificada.

[0503] La adición de un tratamiento con fosfatasa después de la purificación por HPLC y antes de la digestión con RNasa R redujo drásticamente la expresión de todas las citoquinas reguladas positivamente evaluadas en células A549. La proteína 1 de hormiga quimioattractora de monocitos secretada (MCP1), la IL-6, el IFN- α 1, el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la proteína 10 inducible por IFN γ (IP-10) cayeron a niveles iniciales indetectables o no transfectados.

[0504] No hubo liberación sustancial de citoquinas en las células HEK293. Las células A549 tuvieron una mayor estabilidad de la expresión de GLuc y viabilidad celular cuando se transfectaron con ARN circular de mayor pureza. El ARN circular completamente purificado tenía un fenotipo de estabilidad similar al de las células 293 transfectadas.

***Ejemplo 4B:** El ARN circular no provoca inmunogenicidad significativa y no es un ligando de RIG-I.*

[0505] Se transfectaron células A549 con los productos de una reacción de corte y empalme: Se transfectaron células A549 con:

- ARN circular no purificado,
- ARN de alto peso molecular (concatenaciones lineales y circulares),
- ARN circular (cortado),

- una fracción temprana de ARN circular purificado (más superposición con el pico de ARN cortado),
- una fracción tardía de ARN circular purificado (menos superposición con el pico de ARN mellado),
- intrones extirpados durante la circularización, o
- vehículo (es decir, control no transfectado).

[0506] El ARN precursor se sintetizó y purificó por separado en forma del mutante de delección del sitio de empalme (DS) debido a las dificultades para obtener ARN precursor lineal adecuadamente puro a partir de la reacción de empalme. En cada caso se midió la liberación de citoquinas y la viabilidad celular.

[0507] Se observó una liberación robusta de IL-6, RANTES e IP-10 en respuesta a la mayoría de las especies presentes en la reacción de corte y empalme, así como al ARN precursor. Las primeras fracciones de ARNcirc provocaron respuestas de citocinas comparables a otras fracciones que no son de ARNcirc, lo que indica que incluso cantidades relativamente pequeñas de contaminantes de ARN lineal pueden inducir una respuesta inmune celular sustancial en las células A549. Las fracciones tardías de ARNcirc no provocaron una respuesta de citoquinas superior a la de los controles no transfectados. La viabilidad de las células A549 36 horas después de la transfección fue significativamente mayor para las fracciones tardías de ARNcirc en comparación con todas las demás fracciones.

[0508] Se analizó la inducción del transcrito de RIG-I e IFN- β 1 tras la transfección de células A549 con fracciones tardías de HPLC de ARN circular, ARN precursor o reacciones de empalme no purificadas. La inducción de los transcritos de RIG-I e IFN- β 1 fue más débil para las fracciones tardías de ARNcirc que para el ARN precursor y las reacciones de empalme no purificadas. El tratamiento con RNasa R de las reacciones de empalme por sí solo no fue suficiente para eliminar este efecto. La adición de cantidades muy pequeñas del ligando 3p-hpRNA de RIG-I al ARN circular indujo una transcripción sustancial de RIG-I. En las células HeLa, la transfección de reacciones de empalme digeridas con RNasa R indujo RIG-I e IFN- β 1, pero el ARNcirc purificado no. En general, las células HeLa eran menos sensibles a las especies de ARN contaminantes que las células A549.

[0509] Un experimento de curso temporal que monitoriza la inducción de la transcripción de RIG-I, IFN- β 1, IL-6 y RANTES dentro de las primeras 8 horas después de la transfección de células A549 con reacciones de empalme o ARNcirc completamente purificado no reveló una respuesta transitoria al ARNcirc. El ARNcirc purificado tampoco logró inducir transcripciones proinflamatorias en macrófagos murinos RAW264.7.

[0510] Se transfectaron células A549 con ARNcirc purificado que contenía una secuencia de expresión de EMCV IRES y EGFP. Esto no logró producir una inducción sustancial de transcripciones proinflamatorias. Estos datos demuestran que los componentes no circulares de la reacción de empalme son responsables de la inmunogenicidad observada en estudios previos y que el ARNcirc no es un ligando natural para RIG-I.

EJEMPLO 5

El ARN circular evita la detección por parte de los TLR.

[0511] Se transfectaron líneas celulares informadoras TLR 3, 7 y 8 con múltiples construcciones de ARN lineales o circulares y se midió la fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP) secretada.

[0512] Se construyó el ARN linealizado eliminando las secuencias del intrón y del brazo de homología. A continuación, las construcciones de ARN lineal se trataron con fosfatasa (en el caso de ARN protegidos, después del recubrimiento) y se purificaron mediante HPLC.

[0513] Ninguna de las transfecciones intentadas produjo una respuesta en células informadoras TLR7. Las células informadoras TLR3 y TLR8 se activaron mediante ARN linealizado protegido, ARN linealizado poliadenilado, la fracción de HPLC de ARNcirc mellado y la fracción temprana de ARNcirc. La fracción tardía de ARNcirc y ARNm de m1 ψ no provocaron una respuesta mediada por TLR en ninguna línea celular.

[0514] En un segundo experimento, el ARNcirc se linealizó utilizando dos métodos: tratamiento del ARNcirc con calor en presencia de iones de magnesio y digestión con ARNasa H guiada por oligonucleótidos de ADN. Ambos métodos produjeron una mayoría de ARN lineal de longitud completa con pequeñas cantidades de ARNcirc intacto. Se transfectaron células informadoras TLR3, 7 y 8 con ARN circular, ARN circular degradado por calor o ARN circular degradado por RNasa H, y la secreción de SEAP se midió 36 horas después de la transfección. Las células informadoras TLR8 secretaron SEAP en respuesta a ambas formas de ARN circular degradado, pero no produjeron una mayor respuesta a la transfección de ARN circular que la transfección simulada. No se observó activación en células indicadoras TLR3 y TLR7 para condiciones degradadas o intactas, a pesar de la activación de TLR3 mediante ARN linealizado transcrito *in vitro*.

EJEMPLO 6

El ARN circular no modificado produce una mayor expresión sostenida de proteínas in vivo que el ARN lineal.

[0515] Se inyectaron ratones y se transfectaron células HEK293 con ARNm lineales y ARNcirc de eritropoyetina humana (hEpo) no modificada y m1ψ modificada. La transfección equimolar de ARNm de m1ψ y ARNcirc no modificado dio como resultado una expresión sólida de proteínas en células HEK293. El ARNm lineal y el ARN circular de hEpo mostraron patrones de expresión de proteínas y viabilidades celulares relativos similares en comparación con el ARNm lineal y el ARN circular de GLuc tras la transfección de igual peso de células HEK293 y A549.

[0516] En ratones, se detectó hEpo en suero después de la inyección de ARNcirc de hEpo o ARNm lineal en tejido adiposo visceral. La hEpo detectada después de la inyección de ARNcirc no modificado se descompuso más lentamente que la del ARNm m1ψ o no modificado y todavía estaba presente 42 horas después de la inyección. La hEpo sérica disminuyó rápidamente tras la inyección de reacciones de empalme de ARNcirc no purificado o de mRNA lineal no modificado. La inyección de reacciones de empalme no purificadas produjo una respuesta de citoquinas detectable en el suero que no se observó para los otros ARN, incluido el ARNcirc purificado.

EJEMPLO 7

El ARN circular se puede administrar eficazmente in vivo o in vitro mediante nanopartículas lipídicas.

[0517] El ARN circular purificado se formuló en nanopartículas lipídicas (NPL) con el lipidoide ionizable cKK-E12 (Dong *et al.*, 2014; Kauffman *et al.*, 2015). Las partículas formaron estructuras multilamelares uniformes con un tamaño promedio, índice de polidispersidad y eficiencia de encapsulación similar a la de las partículas que contienen ARNm lineal de control modificado con 5 moU.

[0518] El ARNcirc de hEpo purificado mostró una mayor expresión que el ARNm de 5 moU cuando se encapsuló en NPL y se añadió a células HEK293. La estabilidad de la expresión del ARN-NPL en células HEK293 fue similar a la del ARN administrado por el reactivo de transfección, con la excepción de un ligero retraso en la descomposición tanto para el ARNm de 5moU como para el ARNcirc. Tanto el ARNcirc no modificado como el 5moU-ARNm no lograron activar RIG-I/IFN-β1 *in vitro*.

[0519] En ratones, el ARN-NPL se administró mediante inyección local en tejido adiposo visceral o administración intravenosa en el hígado. La expresión sérica de hEpo del ARNcirc fue menor pero comparable con la de 5moU-ARNm 6 horas después del parto en ambos casos. La hEpo sérica detectada después de la inyección en el tejido adiposo de NPL-circRNA no modificado se descompuso más lentamente que la del NPL-5moU-ARNm, con un retraso en la disminución de la expresión presente en el suero que fue similar al observado *in vitro*, pero la hEpo sérica después de la inyección intravenosa de NPL-ARNcirc o NPL-5moU-ARNm se descompuso aproximadamente a la misma velocidad. No hubo aumento en las citocinas séricas ni en la inducción local de la transcripción de RIG-I, TNFα o IL-6 en ninguno de estos casos.

EJEMPLO 8

Ejemplo 8A: Expresión y estabilidad funcional por IRES en células HEK293, HepG2 y 1C1C7.

[0520] Se circularizaron construcciones que incluían regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* e IRES variables. Se transfectaron por separado 100 ng de cada reacción de circularización en 20.000 células HEK293, células HepG2 y células 1C1C7 utilizando Lipofectamine MessengerMax. Se evaluó la luminiscencia en cada sobrenadante después de 24 horas como medida de la expresión de proteínas. En las células HEK293, las construcciones que incluyen Crohivirus B, Salivirus FHB, Virus Aichi, Salivirus HG-J1 y Enterovirus J IRES produjeron la mayor luminiscencia a las 24 horas (Figura 1A). En células de HepG2, las construcciones que incluyen el virus Aichi, Salivirus FHB, EMCV-Cf y CVA3 IRES produjeron una alta luminiscencia a las 24 horas (Figura 1B). En células 1C1C7, construcciones que incluyen Salivirus FHB, Virus Aichi, Salivirus NG-J1 y Salivirus A SZ-1 IRES produjeron una alta luminiscencia a las 24 horas (Figura 1C).

[0521] Se observó una tendencia a que los IRES más grandes produjeran una mayor luminiscencia a las 24 horas. Una longitud total de secuencia más corta tiende a aumentar la eficiencia de la circularización, por lo que seleccionar una expresión alta y un IRES relativamente corto puede dar como resultado una construcción mejorada. En las células HEK293, una construcción que utilizaba Crohivirus B IRES produjo la luminiscencia más alta, especialmente en comparación con otros IRES de longitud similar (Figura 2A). La expresión de construcciones IRES en células HepG2 y 1C1C7 representadas frente al tamaño de IRES se muestra en las Figuras 2B y 2C.

[0522] Se midió la estabilidad funcional de construcciones IRES seleccionadas en células HepG2 y 1C1C7 durante 3 días. La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió cada 24 horas después de la transfección de 20.000 células con 100 ng de cada reacción de circularización, seguido de un reemplazo completo del medio. Salivirus A GUT y Salivirus FHB exhibieron la mayor estabilidad funcional en células HepG2, y Salivirus NJ1 y Salivirus FHB produjeron la expresión más estable en células 1C1C7 (Figuras 3A y 3B).

Ejemplo 8B: Detección de IRES adicionales

[0523] Se midió la estabilidad funcional de construcciones IRES adicionales en células HEK293. Brevemente, se identificaron regiones no traducidas 5' (UTR) de interés a partir de GenBank. Las UTR seleccionadas se truncaron a 675 nt desde el extremo 5' y se insertaron en una construcción de cadena principal de ARN circular que codifica Luciferasa de *Gaussia* (Gluc) y delante de la región codificante de Gluc. Los ARN circulares se transfectaron en células HEK293. Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midió la luminiscencia de la proteína Gluc secretada utilizando reactivos disponibles comercialmente. Los resultados se representan en las Figuras 1D y 1E y en la Tabla 30, lo que sugiere que muchas secuencias IRES naturales mejoran la expresión de proteínas en un contexto de ARN circular.

Tabla 30

SEQ ID NO	IRES	Expresión	SEQ ID NO	IRES	Expresión
413	RhPV	1.10E+05	553	Pestivirus del antílope berrendo	1.35E+06
414	Halastavi arva (1x mut)	9.46E+04	554	Aislamiento de pestivirus porcino Bungowannah	1.10E+07
415	Oscivirus	4.55E+07	555	Pestivirus porcino 1	9.46E+04
416	Cadicivirus B	2.10E+05	556	Pestivirus jirafa-1	4.72E+05
417	PSIV (2x mut para Xba1)	9.70E+04	557	Virus de la peste porcina clásica	3.16E+05
418	PSIV IGR	1.01E+05	558	Aislado de pegivirus humano JD2B 11	6.85E+05
419	PV Mahoney	1.09E+05	559	Aislado de pegivirus humano GBV-CZJ	N/A
420	REV A	9.44E+04	560	Aislado de pegivirus humano JD2B8C	5.36E+05
421	Tropivirus A	9.52E+04	561	Virus de la hepatitis GB A	N/A
422	Symapivirus A	1.27E+05	562	Pegivirus simio	8.56E+04
423	Sakobuvirus A FFUP1 (1x mutación)	8.82E+06	563	Pegivirus I	8.02E+04
424	Rosavirus C NFSM6F	6.84E+05	564	Pegivirus K	8.07E+04
425	Rosavirus 2 GA7403	5.05E+06	565	Virus asociado a la enfermedad de Theiler	7.84E+04
426	Rimavirus A	8.42E+05	566	Pegivirus de roedores	1.79E+05
427	Rafivirus LPXYC222841	2.22E+05	567	Pegivirus humano 2	3.14E+05
428	Rafivirus WHWGGF74766	4.53E+06	568	Virus GB C/virus de la hepatitis G	1.36E+05
429	Poecivirus BCCH-449	3.43E+05	569	Pegivirus equino 1	8.80E+04
430	Megirivirus A LY	1.80E+06	570	Flavivirus Culex theileri	8.52E+04
431	Megirivirus E	1.10E+07	571	Virus bussuquara	8.20E+04
432	Megirivirus C	1.24E+05	572	Virus del Zika	8.61E+04
433	Ludopivirus	1.05E+05	573	Virus Yokose	8.55E+04
434	Livupivirus	2.10E+05	574	Virus de Wesselsbron	N/A
435	Aichivirus A FSS693	6.25E+07	575	hepacivirus equino	8.40E+04
436	Aichivirus KVGH	1.72E+07	576	Hepacivirus B	8.84E+04
437	Aichivirus DV	7.79E+07	577	Hepacivirus I	7.50E+04
438	Kobuvirus murino 1	1.60E+07	578	Hepacivirus J	7.65E+04
439	Kobuvirus Porcino K-30	N/A	579	Hepacivirus K	8.91E+04
440	Kobuvirus porcino XX	1.32E+07	580	Icavirus	4.41E+06
441	Kobuvirus caprino 12Q108	2.87E+08	581	Virus del pingüino antártico A	8.42E+04
442	Kobuvirus del conejo	3.73E+07	582	Arterivirus de la rata gigante con bolsa forestal	N/A
443	Alivirus	2.65E+05	583	Avisivirus Pf-CHK1	1.19E+05
444	Grusopivirus A	1.09E+05	584	Pingüino aviar paramixovirus	9.91E+04
445	Grusopivirus B	2.12E+05	585	Virus de la enfermedad de Newcastle	8.86E+04
446	Picornavirus de la anchoa granadero de Yancheng Osbeck	1.57E+06	586	Murciélago Hp-betacoronavirus	8.47E+04
447	Gallivirus del pavo m176	4.37E+05	587	Endomavirus de Basella alba	7.65E+04
448	Falcovirus A1	1.48E+05	588	Nidovirus de pitón bola	8.25E+04
449	Tremovirus B	1.31E+05	589	sapelovirus del murciélago	8.05E+04
450	Hidrophis aurita VHA	1.38E+05	590	Picornavirus del murciélago 3	N/A
451	Hepatovirus G1	1.41E+05	591	Picornavirus del murciélago 2	7.99E+07

(Continuación)

SEQ ID NO	IRES	Expresión	SEQ ID NO	IRES	Expresión
452	Hepatovirus D	1.47E+06	592	Picornavirus del murciélago 1	1.85E+07
453	Hepatovirus H2	1.08E+05	593	Iflavirus del murciélago	9.76E+04
454	Hepatovirus I	8.79E+05	594	Dicibavirus del murciélago	7.43E+04
455	Hepatovirus C	5.08E+05	595	Betacoronavirus HKU24	8.96E+04
456	Fipivirus A	2.69E+05	596	Betacoronavirus Inglaterra 1	8.74E+04
457	Fipivirus C	1.09E+05	597	Cardiovirus de Boone 1	2.62E+06
458	Fipivirus E	1.10E+05	598	Virus de cría	1.16E+05
459	Aquavirus	4.51E+06	599	Virus de la diarrea viral bovina 3	2.70E+06
460	Avisivirus A	1.91E+05	600	Virus de la rinitis bovina A	3.62E+06
461	Avisivirus B	8.68E+04	601	Aislado de picornavirus bovino TCH6	1.21E+05
462	Crohivirus A	9.96E+04	602	Nidovirus bovino TCH5	1.17E+05
463	Kunsagivirus B	8.01E+04	603	hepacivirus bovino	1.89E+05
464	Limnipivirus A	8.30E+04	604	Botrytis cinerea mitovirus 4 RdRp	9.68E+04
465	Limnipivirus C	1.35E+05	605	Botrytis cinerea mitovirus 2 RdRp	8.73E+04
466	Orivirus	6.09E+05	606	Picodistrovirus canino cepa 209	2.79E+06
467	VHA FH1	1.24E+05	607	Virus del moquillo canino	3.02E+05
468	HAV HM175	4.96E+05	608	Kobuvirus canino	1.48E+08
469	Parechovirus F	6.56E+05	609	Alfacoronavirus del camello	2.48E+05
470	Parechovirus D	3.10E+05	610	Cripavirus	1.95E+05
471	Parechovirus C	1.24E+06	611	Virus coxsackie humano A2	7.75E+07
472	Virus Ljungar 87-012	2.00E+06	612	Coronavirus AcCoV-JC34	1.82E+05
473	Parechovirus A2	1.80E+07	613	Picornavirus del pollo 3	9.13E+04
474	Parechovirus A3	3.58E+06	614	Picornavirus del pollo 1	1.21E+05
475	Parechovirus A8	1.61E+07	615	Orivirus del pollo 1	3.16E+05
476	Parechovirus A17	1.20E+06	616	Gallivirus del pollo 1	1.51E+07
477	Potamipivirus A	8.43E+05	617	Calicivirus del pollo	1.28E+05
478	Potamipivirus B	7.20E+05	618	Picornavirus de la carpa 1	1.13E+05
479	Picornavirus del congrio de Beihai	1.15E+06	619	Picornavirus del halcón	3.08E+06
480	Saplovirus porcino JD2011	N/A	620	Virus B de la rinitis equina 1	1.01E+05
481	Saplovirus Porcino A2	4.34E+06	621	Virus de la rinitis equina A	3.73E+05
482	Saplovirus simio 1	6.55E+07	622	Virus de la arteritis equina	1.89E+05
483	Saplovirus simio 2	4.24E+07	623	Enterovirus sp. aislar CPML	6.83E+07
484	Rabovirus C	2.49E+06	624	Enterovirus AN12	3.87E+06
485	Rabovirus A NYC-B10	1.24E+06	625	Morbilivirus del delfín	1.22E+05
486	Parabovirus C	1.83E+07	626	Virus diáncé	1.35E+05
487	Parabovirus B	7.85E+06	627	Hepacivirus guinea	1.38E+05
488	Parabovirus A3	2.44E+08	628	Namavirus-1 asociado a la vid	1.30E+05
489	Felipivirus 127F	8.92E+06	629	Torovirus caprino	1.19E+05
490	Boosepivirus A	7.07E+07	630	Aislado del virus de la fiebre aftosa O	1.12E+05
491	Boosepivirus B	1.17E+08	631	Virus de la peritonitis infecciosa felina	1.35E+05
492	Facovirus Pf-CHK1	5.87E+06	632	Virus farmington	1.22E+05
493	HRVC3 QPM	1.64E+07	633	Virus de la bronquitis infecciosa aviar	2.84E+05
494	HRVB27	2.04E+08	634	Rinovirus humano 1	7.40E+07
495	HRVA73	1.08E+08	635	EV22	1.95E+07
496	EVL	6.49E+07	636	Cardiovirus humano similar al TMEV	4.48E+07
497	EVK	7.52E+07	637	Coronavirus humano 229E	N/A
498	EV J 1631	9.88E+07	638	Virus similar al zhaovirus de Hubei 1	1.03E+05

(Continuación)

SEQ ID NO	IRES	Expresión	SEQ ID NO	IRES	Expresión
499	EV JN125	2.90E+07	639	Virus tipo tumba de Hubei 9	9.28E+04
500	EV I	1.31E+08	640	Virus parecido a la tumba de Hubei 32	9.23E+04
501	EV F1 BEV 261	1.12E+07	641	Virus tipo sobemo de Hubei 3	1.17E+05
502	EV D94	9.25E+07	642	Virus tipo picoma de Hubei 2	1.95E+05
503	PV3	1.25E+08	643	Hepacivirus P	6.04E+05
504	EV C102	8.85E+07	644	Aguilucho 1	1.47E+05
505	EV 30	5.48E+06	645	Kunsagivirus 1	4.15E+05
506	SA5	1.61E+08	646	Kagoshima-2-24-KoV	9.30E+07
507	EV A114	1.50E+08	647	Virus de las abejas de Cachemira	1.65E+05
508	Mobovirus A	3.44E+06	648	Virus similar al picoma de Jingmen	9.32E+04
509	Virus Burpengary	1.09E+07	649	Virus de las paperas	1.47E+05
510	Hunnivirus A1	1.61E+06	650	Mosavirus del ratón	9.00E+04
511	Hunnivirus A2	6.38E+06	651	Miniopterus schreibersii picornavirus 1	6.05E+06
512	la lo	1.35E+06	652	Lindavirus	7.37E+05
513	Virus del síndrome de Taura	8.30E+05	653	Lesavirus 2	3.67E+07
514	ABPV	6.48E+05	654	Lesavirus 1	6.37E+06
515	BRAV-2	3.98E+06	655	Cepa de Phopivirus Nueva Inglaterra	1.06E+05
516	BRBV-1	3.34E+06	656	Cepa de pestivirus Aydin	3.11E+06
517	ERAV-1 U188	N/A	657	Picornavirus de codorniz QPV1	6.55E+07
518	GFTV	1.23E+06	658	Sapelovirus porcino 1	N/A
519	SAFV V13C	9.32E+07	659	Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino 2	1.29E+05
520	SAV P-113	4.37E+07	660	Enterovirus porcino 9	3.20E+07
521	VHEV	1.74E+08	661	Picornavirus B de paloma	1.24E+05
522	TRVNGS910	3.84E+07	662	Picornavirus HK21	4.09E+05
523	EMCV2 RD1338	1.97E+06	663	Picomavirales Tottori-HG1	9.54E+04
524	EMCV1 JZ1203	N/A	664	Hepatovirus de roedores	1.39E+05
525	EMCV1 AnrB-3741	2.55E+06	665	Virus de la peste bovina	4.26E+05
526	Cosavirus D1	2.11E+06	666	Rabovirus A	2.88E+06
527	Cosavirus B 1	1.91E+06	667	Nidovirus 1 del culebrilla	2.62E+05
528	Cosavirus A SH1	2.16E+06	668	Virus del valle de Séneca	1.46E+07
529	Malgasivirus B	5.05E+06	669	Sclerotinia sclerotiorum micovirus-L de ARNbc	1.69E+05
530	Mosavirus A2 SZAL6	8.27E+06	670	Enterovirus del yak	6.19E+06
531	SVV	1.06E+06	671	Virus de la enfermedad de la zarigüeya tambaleante	2.60E+05
532	PTV A	7.29E+05	672	Segmento S1 del ortoreovirus aviar	4.37E+05
533	PTVB	6.02E+06	673	Kobuvirus caprino d10	2.20E+08
534	totorivirus	2.76E+07	674	Kobuvirus caprino d20	2.00E+08
535	Posavirus 1	1.55E+06	675	Kobuvirus caprino d30	1.87E+08
536	A105-675	2.18E+07	676	Kobuvirus caprino d40	2.15E+08
537	A110-675	1.24E+08	677	Kobuvirus caprino d50	9.65E+07
538	18-675	6.04E+07	678	Picornavirales sp. aislar RtMrufPicoV	2.26E+08
539	A115-675	5.93E+07	679	Apodemus agrarius picornavirus cepa Longquan-Aa118	1.90E+08
540	A73-675	1.30E+08	680	Niviventer confucianus picornavirus	6.10E+07
541	Kobuvirus 16317	2.03E+07	681	Aislado de picornavirus de murciélago BtRsPicoV	1.13E+06

(Continuación)

SEQ ID NO	IRES	Expresión	SEQ ID NO	IRES	Expresión
542	Aichivirus Chshc7	1.87E+07	682	Rhinolophus picornavirus cepa Guizhou-Rr100	N/A
543	Aichivirus Goiania	1.66E+07	683	Cepa de Rhinolophus picornavirus Henan-Rf265	3.85E+05
544	Aichivirus EHP4	1.78E+07	684	Enterovirus humano C105	5.49E+05
545	Aichivirus DVI2169	2.98E+06	685	Poliovirus humano 1 cepa NIE1116623	3.94E+05
546	Aichivirus DVI2321	6.63E+07	686	Enterovirus humano 109	4.92E+05
547	Aichivirus rata08	3.51E+07	687	Poliovirus humano 2 cepa NIE0811460	2.59E+07
548	Aichivirus Rt386	5.71E+07	688	Picornavirus bovino	3.82E+06
549	Pestivirus de la rata noruega	N/A	689	Poliovirus humano 1 cepa EQG1419328	2.44E+05
550	Kobuvirus porcino GS2	44200000	690	Aislado de poliovirus humano 2 IS 061	5.84E+06
551	Kobuvirus SZAL6	98850000	691	Virus Cocksackie B5	N/A
552	Kobuvirus oveja TB3	N/A	692	Virus Cocksackie A10	N/A

EJEMPLO 9

Expresión y estabilidad funcional por IRES en células Jurkat.

[0524] Se circularizaron 2 conjuntos de construcciones que incluyen regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y un subconjunto de IRES previamente probados. Se electroporaron 60.000 células Jurkat con 1 mg de cada reacción de circularización. La luminiscencia de la luciferasa *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 horas después de la electroporación. Se incluyó una construcción IRES CVB3 en ambos conjuntos para comparar entre conjuntos y para la eficacia IRES previamente definida. Las construcciones CVB1 y Salivirus A SZ1 IRES produjeron la mayor expresión a las 24 h. Los datos se pueden encontrar en las Figuras 4A y 4B.

[0525] La estabilidad funcional de las construcciones IRES en cada ronda de células Jurkat electroporadas se midió durante 3 días. La luminiscencia de la luciferasa *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió cada 24 horas después de la electroporación de 60.000 células con 1 mg de cada reacción de circularización, seguida de un reemplazo completo del medio (Figuras 5A y 5B).

[0526] Las construcciones Salivirus A SZ1 y Salivirus A BN2 IRES tenían una alta estabilidad funcional en comparación con otras construcciones.

EJEMPLO 10

Expresión, estabilidad funcional y liberación de citoquinas de ARN circular y lineal en células Jurkat.

[0527] Se circularizó una construcción que incluye regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y un IRES de Salivirus FHB. El ARNm que incluye una secuencia de expresión de *Gaussia* luciferasa y una cola de poliA de aproximadamente 150 nt, y modificado para reemplazar el 100 % de la uridina con 5-metoxiuridina (5 mU), está disponible comercialmente y se adquirió de Trilink. Se ha demostrado que las modificaciones de nucleótidos de 5 mU mejoran la estabilidad y expresión del ARNm (Bioconjug Chem. 16 de marzo de 2016; 27(3):849-53). Se midieron y compararon la expresión de ARNm modificado, reacciones de circularización (no puras) y ARNcirc purificado mediante HPLC de exclusión de tamaño (puro) en células Jurkat (Figura 6A). La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 horas después de la electroporación de 60.000 células con 1 mg de cada especie de ARN.

[0528] La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió cada 24 horas después de la electroporación de 60.000 células con 1 ug de cada especie de ARN, seguido de un reemplazo completo del medio. En la Figura 6B se muestra una comparación de los datos de estabilidad funcional del ARNm modificado y el ARN circular en células Jurkat durante 3 días.

[0529] Se realizó la inducción de la transcripción de IFN γ (Figura 7A), IL-6 (Figura 7B), IL-2 (Figura 7C), RIG-I (Figura 7D), IFN- β 1 (Figura 7E) y TNF α (Figura 7F). medido 18 horas después de la electroporación de 60.000 células Jurkat con 1 mg de cada especie de ARN descrita anteriormente y 3p-hpRNA (ARN en horquilla de trifosfato 5', que es un agonista conocido de RIG-I).

EJEMPLO 11

Expresión de ARN circular y lineal en monocitos y macrófagos.

[0530] Se circularizó una construcción que incluye regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y un IRES de Salivirus FHB. El ARNm que incluye una secuencia de expresión de *Gaussia* luciferasa y una cola de poliA de ~ 150 nt, y modificado para reemplazar el 100 % de la uridina con 5-metoxiuridina (5 mU), se adquirió de Trilink. La expresión de ARNm circular y modificado se midió en monocitos primarios humanos (Figura 8A) y macrófagos primarios humanos (Figura 8B). La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 horas después de la electroporación de 60.000 células con 1 mg de cada especie de ARN. También se midió la luminiscencia 4 días después de la electroporación de macrófagos primarios humanos con cambios de medio cada 24 horas (Figura 8C). Los resultados se pueden encontrar en la Figura 8. La diferencia en luminiscencia fue estadísticamente significativa en cada caso ($p < 0,05$).

EJEMPLO 12

Expresión y estabilidad funcional por IRES en células T primarias.

[0531] Se circularizaron construcciones que incluían regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y un subconjunto de IRES previamente probados y los productos de reacción se purificaron mediante HPLC de exclusión por tamaño. Se electroporaron 150.000 células T CD3+ humanas primarias con 1 mg de cada ARNcirc. La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 horas después de la electroporación (Figura 9A). Las construcciones de virus Aichi y CVB3 IRES tuvieron la mayor expresión a las 24 horas.

[0532] También se midió la luminiscencia cada 24 horas después de la electroporación durante 3 días para comparar la estabilidad funcional de cada construcción (Figura 9B). La construcción con Salivirus A SZ1 IRES fue la más estable.

EJEMPLO 13

Expresión y estabilidad funcional de ARN circular y lineal en células T primarias y PBMC.

[0533] Se circularizaron construcciones que incluían regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y un IRES de Salivirus A SZ1 o IRES de Salivirus FHB. ARNm que incluye una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y una cola de poliA de ~ 150 nt, y se modificó para reemplazar el 100 % de la uridina con 5-metoxiuridina (5 mU) y se adquirió de Trilink. Se midió la expresión de ARNm circular y modificado por HPLC de Salivirus A SZ1 IRES en células T CD3+ primarias humanas. Se midió la expresión de ARNm circular purificado por HPLC, circular no purificado y modificado de Salivirus FHB en PBMC humanas. La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 horas después de la electroporación de 150.000 células con 1 mg de cada especie de ARN. Los datos de las células T humanas primarias se muestran en las Figuras 10A y 10B, y los datos de las PBMC se muestran en la Figura 10C. La diferencia en la expresión entre el ARN circular purificado y el ARN circular o lineal no purificado fue significativa en cada caso ($p < 0,05$).

[0534] La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante de células T primarias se midió cada 24 horas después de la electroporación durante 3 días para comparar la estabilidad funcional de la construcción. Los datos se muestran en la Figura 10B. La diferencia en la luminiscencia relativa de la medición del día 1 entre el ARN circular purificado y el ARN lineal fue significativa tanto en el día 2 como en el día 3 para las células T primarias.

EJEMPLO 14

Eficiencia de circularización por sitio de permutación en el intrón de Anabaena.

[0535] Se produjeron construcciones de ARN que incluyen un CVB3 IRES, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia*, regiones intrón/exón de anabaena, espaciadores, regiones de homología interna y brazos de homología. Se midió mediante HPLC la eficiencia de circularización de las construcciones que utilizan el sitio de permutación de intrones de anabaena tradicional y 5 sitios de permutaciones consecutivas en P9. Los cromatogramas de HPLC para los 5 sitios de permutación consecutivos en P9 se muestran en la Figura 11A.

[0536] La eficiencia de la circularización se midió en una variedad de sitios de permutación. La eficiencia de circularización se define como el área bajo la curva del cromatograma de HPLC para cada uno de: ARNcirc/(circRNA + RNA precursor). La cuantificación clasificada de la eficiencia de la circularización en cada sitio de permutación se encuentra en la Figura 11B. Se seleccionaron 3 sitios de permutación (indicados en la Figura 11B) para una investigación adicional.

[0537] El ARN circular en este ejemplo se circularizó mediante transcripción *in vitro* (IVT) y, a continuación, se purificó mediante columna de centrifugación. La eficiencia de la circularización para todas las construcciones probablemente sería

mayor si se incluyera el paso adicional de incubación con Mg^{2+} y nucleótido de guanosina; sin embargo, la eliminación de este paso permitió la comparación y la optimización de construcciones de ARN circulares. Este nivel de optimización es especialmente útil para mantener una alta eficiencia de circularización con construcciones de ARN grandes, como las que codifican receptores de antígenos quiméricos.

EJEMPLO 15

Eficiencia de circularización de intrones alternativos.

[0538] Se creó ARN precursor que contiene un intrón del grupo 1 permutado de origen de especie variable o sitio de permutación y varios elementos constantes que incluyen: un IRES CVB3, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia*, espaciadores, regiones de homología interna y brazos de homología. Los datos de circularización se pueden encontrar en la Figura 12. La Figura 12A muestra cromatogramas que resuelven precursores, ARNcirc e intrones. La Fig. 12B proporciona una cuantificación clasificada de la eficiencia de la circularización, basada en los cromatogramas mostrados en la Fig. 12A, en función de la construcción del intrón.

[0539] El ARN circular en este ejemplo se circularizó mediante transcripción *in vitro* (IVT) y, a continuación, purificación en columna de centrifugación. La eficiencia de la circularización para todas las construcciones probablemente sería mayor si se incluyera el paso adicional de incubación con Mg^{2+} y nucleótido de guanosina; sin embargo, eliminar este paso permite la comparación y la optimización de construcciones de ARN circulares. Este nivel de optimización es especialmente útil para mantener una alta eficiencia de circularización con construcciones de ARN grandes, como las que codifican receptores de antígenos quiméricos.

EJEMPLO 16

Eficiencia de circularización por presencia o longitud del brazo de homología.

[0540] Se produjeron construcciones de ARN que incluyen un CVB3 IRES, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia*, regiones intrón/exón de anabaena, espaciadores y regiones de homología interna. Se probaron construcciones que representan 3 sitios de permutación de intrones de anabaena con brazos de homología de GC al 25 % y 30 nt o sin brazos de homología ("NA"). Se permitió que estas construcciones circularan sin una etapa de incubación con Mg^{2+} . Se midió y comparó la eficiencia de la circularización. Los datos se pueden encontrar en las Figuras 13A y 13B. La eficiencia de la circularización fue mayor para cada construcción que carecía de brazos de homología. La Figura 13A proporciona una cuantificación clasificada de la eficiencia de la circularización; La Figura 13B proporciona cromatogramas que resuelven precursores, ARNcirc e intrones.

[0541] Para cada uno de los 3 sitios de permutación, se crearon construcciones con longitudes de brazo de 10 nt, 20 nt y 30 nt y 25 %, 50 % y 75 % de contenido de GC. Se midió la eficiencia de empalme de estas construcciones y se comparó con construcciones sin brazos de homología (Figura 14). La eficiencia de empalme se define como la proporción de intrones libres en relación con el ARN total en la reacción de empalme.

[0542] La Figura 15 A (izquierda) muestra cromatogramas de HPLC que indican la contribución de fuertes brazos de homología a una eficiencia de empalme mejorada. Arriba a la izquierda: 75 % de contenido de GC, brazos de homología de 10 nt. Centro izquierda: 75 % de contenido de GC, brazos de homología de 20 nt. Abajo a la izquierda: 75 % de contenido de GC, brazos de homología de 30 nt.

[0543] La Figura 15 A (derecha) muestra cromatogramas de HPLC que muestran una mayor eficiencia de empalme junto con un aumento de melladuras, que aparecen como un hombro en el pico de ARNcirc. Arriba a la derecha: 75 % de contenido de GC, brazos de homología de 10 nt. Centro derecha: 75 % de contenido de GC, brazos de homología de 20 nt. Abajo a la derecha: 75 % de contenido de GC, brazos de homología de 30 nt.

[0544] La Figura 15 B (izquierda) muestra combinaciones seleccionadas de sitios de permutación y brazos de homología que se supone que demuestran una eficiencia de circularización mejorada.

[0545] La Figura 15 B (derecha) muestra combinaciones seleccionadas de sitios de permutación y brazos de homología que se supone que demuestran una eficiencia de circularización mejorada, tratados con polimerasa poliA de *E. coli*.

[0546] El ARN circular en este ejemplo se circularizó mediante transcripción *in vitro* (IVT) y, a continuación, se purificó en columna de centrifugación. La eficiencia de la circularización para todas las construcciones probablemente sería mayor si se incluyera un paso adicional de incubación de Mg^{2+} con nucleótido de guanosina; sin embargo, la eliminación de este paso permitió la comparación y la optimización de construcciones de ARN circulares. Este nivel de optimización es especialmente útil para mantener una alta eficiencia de circularización con construcciones de ARN grandes, como las que codifican receptores de antígenos quiméricos.

EJEMPLO 17

ARN circular que codifica receptores de antígenos quiméricos.

[0547] Se circularizaron construcciones que incluyen regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de receptores de antígeno quimérico (CAR) de Kymriah y un IRES CVB3. Se electroporaron 100.000 células T CD3+ primarias humanas con 500 ng de ARNcirc y se cultivaron conjuntamente durante 24 horas con células Raji que expresaban de manera estable GFP y luciferasa de luciérnaga. Relación efector-objetivo (relación E:T) 0,75:1. Se simuló electroporación y cocultivo de 100.000 células T CD3+ primarias humanas como control (Figura 16).

[0548] Se sometieron a electroporación simulada conjuntos de 100.000 células T CD3+ primarias humanas o se electroporaron con 1 mg de ARNcirc y, a continuación, se cultivaron conjuntamente durante 48 horas con células Raji que expresaban de forma estable GFP y luciferasa de luciérnaga con una relación E:T de 10:1 (Figura 17).

[0549] La cuantificación de la lisis específica de las células diana Raji se determinó mediante la detección de luminiscencia de luciérnaga (Figura 18). 100.000 células T CD3+ primarias humanas, ya sea sometidas a electroporación simulada o electroporadas con ARN circular que codifica diferentes secuencias CAR, se cultivaron conjuntamente durante 48 horas con células Raji que expresaban de forma estable GFP y luciferasa de luciérnaga. % de lisis específica definida como $1 - \frac{\text{luminiscencia en condición CAR}}{\text{luminiscencia en condición simulada}}$. Relación E:T 10:1.

EJEMPLO 18

Expresión y estabilidad funcional de ARN circular y lineal en células Jurkat y células T humanas en reposo.

[0550] Se circularizaron construcciones que incluían regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y un subconjunto de IRES previamente probados y los productos de reacción se purificaron mediante HPLC de exclusión por tamaño. Se electroporaron 150.000 células Jurkat con 1 mg de ARN circular o 5 mU de ARNm. La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 horas después de la electroporación (Figura 19A izquierda). Se electroporaron 150.000 células T CD3+ humanas primarias en reposo (10 días después de la estimulación) con 1 mg de ARN circular o 5 mU de ARNm. La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 horas después de la electroporación (Figura 19A derecha).

[0551] La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió cada 24 horas después de la electroporación, seguido de un reemplazo completo del medio. Los datos de estabilidad funcional se muestran en la Figura 19B. El ARN circular tenía más estabilidad funcional que el ARN lineal en cada caso, con una diferencia más pronunciada en las células Jurkat.

EJEMPLO 19

Inducción de transcripción de IFN- β 1, RIG-I, IL-2, IL-6, IFN γ y TNF α de células electroporadas con ARN lineal o construcciones de ARN circulares variables.

[0552] Se circularizaron construcciones que incluían regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de luciferasa de *Gaussia* y un subconjunto de IRES previamente probados y los productos de reacción se purificaron mediante HPLC de exclusión por tamaño. Se electroporaron 150.000 células T humanas CD3+ con 1 mg de ARN circular, 5 mU de ARNm o poliinosina:citosina de control positivo inmunoestimulante. La inducción del transcrito de IFN- β 1 (Figura 20A), RIG-I (Figura 20B), IL-2 (Figura 20C), IL-6 (Figura 20D), IFN γ (Figura 20E) y TNF α (Figura 20F) se midió durante 18 horas después de la electroporación.

EJEMPLO 20

Lisis específica de células diana e inducción del transcrito de IFN γ mediante células que expresan CAR electroporadas con diferentes cantidades de ARN circular o lineal; lisis específica de células diana y no diana mediante células que expresan CAR en diferentes proporciones E:T.

[0553] Construcciones que incluyen regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de CAR anti-CD19 y un CVB3 IRES se circularizaron y los productos de reacción se purificaron mediante HPLC de exclusión por tamaño. 150.000 células CD3+ T primarios humanos, ya sea sometidas a electroporación simulada o electroporadas con diferentes cantidades de ARN circular que codifica una secuencia CAR anti-CD19, se cultivaron conjuntamente durante 12 horas con células Raji que expresaban de manera estable GFP y luciferasa de luciérnaga en una proporción E:T de 2:1. La lisis específica de las células diana Raji se determinó mediante la detección de luminiscencia de luciérnaga (Figura 21A). El % de lisis específica se definió como $1 - \frac{\text{luminiscencia en condición CAR}}{\text{luminiscencia en condición simulada}}$. La inducción del transcrito de IFN γ se midió 24 horas después de la electroporación (Figura 21B).

[0554] 150.000 células T CD3+ primarias humanas se sometieron a electroporación simulada o a electroporación con 500 ng de ARNcirc o m¹ ψ -ARNm que codifica una secuencia CAR anti-CD19, luego se cultivaron conjuntamente durante 24 horas con células Raji que expresaban establemente luciferasa de luciérnaga en diferentes proporciones E:T. El % de

lisis específica de las células diana Raji se determinó mediante la detección de luminiscencia de luciérnaga (Figura 22A). El % de lisis específica se definió como $1 - [\text{luminiscencia en condición CAR}] / [\text{luminiscencia en condición simulada}]$.

[0555] También se cocultivaron células T que expresan CAR durante 24 horas con células Raji o K562 que expresan de forma estable luciferasa de luciérnaga en diferentes proporciones E:T. La lisis específica de las células diana Raji o de las células no diana K562 se determinó mediante la detección de luminiscencia de luciérnaga (Figura 22B). El % de lisis específica se define como $1 - [\text{luminiscencia en condición CAR}] / [\text{luminiscencia en condición simulada}]$.

EJEMPLO 21

Lisis específica de células diana mediante células T electroporadas con ARN circular o ARN lineal que codifica un CAR.

[0556] Se circularizaron construcciones que incluían regiones intrón/exón de anabaena, una secuencia de expresión de CAR anti-CD19 y un IRES CVB3 y los productos de reacción se purificaron mediante HPLC de exclusión por tamaño. Se electroporaron células T CD3+ primarias humanas con 500 ng de ARN circular o una cantidad equimolar de ARNm $m^1\psi$, cada uno de los cuales codifica un CAR dirigido a CD19. Se agregaron células Raji a cultivos de células CAR-T durante 7 días en una proporción E:T de 10:1. Se midió el % de lisis específica para ambas construcciones a los 1, 3, 5 y 7 días (Figura 23).

EJEMPLO 22

Lisis específica de células Raji por células T que expresan un CAR anti-CD19 o un CAR anti-BCMA.

[0557] Se circularizaron construcciones que incluían regiones intrón/exón de anabaena, secuencia de expresión de CAR anti-CD19 o anti-BCMA y un IRES CVB3 y los productos de reacción se purificaron mediante HPLC de exclusión por tamaño. Se electroporaron 150.000 células T CD3+ humanas primarias con 500 ng de ARNcirc y, a continuación, se cultivaron conjuntamente con células Raji en una proporción E:T de 2:1. El % de lisis específica se midió 12 horas después de la electroporación (Figura 24).

EJEMPLO 23

Ejemplo 23A: Síntesis de compuestos

[0558] La síntesis de lípidos ionizables representativos de la invención se describe en las solicitudes PCT/US2016/052352, PCT/US2016/068300, PCT/US2010/061058, PCT/US2018/058555, PCT/US2018/053569, PCT/US2017/ 028981, PCT/US2019/025246, PCT/US2018/035419, PCT/US2019/015913 y solicitudes de EE. UU. con números de publicación 20190314524, 20190321489 y 20190314284, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

Ejemplo 23B: Síntesis de compuestos

[0559] La síntesis de lípidos ionizables representativos de la invención se describe en la publicación de patente de EE. UU. Número US20170210697A1, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

EJEMPLO 24

Expresión de proteínas por órgano

[0560] La codificación de ARN circular o lineal Fluc se generó y se cargó en vehículos de transferencia con lo siguiente formulación: 50 % de lípido ionizable 15 en la Tabla 10b, 10 % de DSPC, 1,5 % de PEG-DMG, 38,5 % de colesterol. A los ratones CD-1 se les administró una dosis de 0,2 mg/kg y se midió la luminiscencia a las 6 horas (IVIS vivo) y a las 24 horas (IVIS vivo e IVIS ex vivo). Se midió el flujo total (fotones/segundo sobre una región de interés) del hígado, bazo, riñón, pulmón y corazón (Figuras 25 y 26).

EJEMPLO 25

Distribución de la expresión en el bazo

[0561] El ARN circular o lineal que codifica GFP se genera y se carga en vehículos de transferencia con la siguiente formulación: 50 % de lípido ionizable 15 en la Tabla 10b, 10 % de DSPC, 1,5 % de PEG-DMG, 38,5 % de colesterol. La formulación se administra a ratones CD-1. La citometría de flujo se realiza en células del bazo para determinar la distribución de la expresión entre los tipos de células.

EJEMPLO 26

Producción de composiciones de nanopartículas

[0562] Para investigar composiciones de nanopartículas seguras y eficaces para su uso en la administración de ARN circular a las células, se preparan y prueban una variedad de formulaciones. Específicamente, se optimizan los elementos particulares y las proporciones de los mismos en el componente lipídico de las composiciones de nanopartículas.

[0563] Las nanopartículas se pueden preparar en una corriente de fluido o con procesos de mezcla como microfluidos y mezcla de unión en T de dos corrientes de fluido, una de las cuales contiene el ARN circular y la otra tiene los componentes lipídicos.

[0564] Las composiciones lipídicas se preparan combinando un lípido ionizable, opcionalmente un lípido auxiliar (tal como DOPE, DSPC o ácido oleico obtenible de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), un lípido PEG (tal como 1,2-dimiristoil-sn-glicerol metoxipolietilenglicol, también conocido como PEG-DMG, que se puede obtener de Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), y un lípido estructural tal como colesterol en concentraciones de aproximadamente, por ejemplo, 40 o 50 mM en un disolvente, por ejemplo, etanol. Las soluciones deben refrigerarse para su almacenamiento a, por ejemplo, -20 °C. Los lípidos se combinan para producir las relaciones molares deseadas (véanse, por ejemplo, las Tablas 31a y 31b a continuación) y se diluyen con agua y etanol hasta una concentración final de lípidos de, por ejemplo, entre aproximadamente 5,5 mM y aproximadamente 25 mM.

Tabla 31a

Nº de formulación	Descripción
1	Se mezclan alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de C12-200, DOPE, Chol y DMG-PEG2K (40:30:25:5) y se diluyen con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se prepara una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNcirc a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyecta rápidamente en la solución acuosa de ARNcirc y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra, se diafiltra con 1xPBS (pH 7,4), se concentra y se almacena a 2-8°C.
2	Se mezclan alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de DODAP, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K (18:56:20:6) y se diluyen con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se prepara una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNcirc de EPO a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyecta rápidamente en la solución acuosa de ARNcirc y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra, se diafiltra con 1xPBS (pH 7,4), se concentra y se almacena a 2-8 °C. Concentración final = 1,35 mg/ml de ARNcirc de EPO (encapsulado). Zave=75,9 nm (Dv(50)=57,3 nm; Dv(90)=92,1 nm).
3	Se mezclan alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K (50:25:20:5) y se diluyen con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se prepara una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNcirc a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyecta rápidamente en la solución acuosa de ARNcirc y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra, se diafiltra con 1xPBS (pH 7,4), se concentra y se almacena a 2-8°C.
4	Se mezclan alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de ICE, DOPE y DMG-PEG2K (70:25:5) y se diluyen con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se prepara una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNcirc a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyecta rápidamente en la solución acuosa de ARNcirc y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra, se diafiltra con 1xPBS (pH 7,4), se concentra y se almacena a 2-8°C.
5	Se mezclan alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT5000, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K (40:20:35:5) y se diluyen con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se prepara una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNcirc de EPO a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyecta rápidamente en la solución acuosa de ARNcirc y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra, se diafiltra con 1xPBS (pH 7,4), se concentra y se almacena a 2-8 °C. Concentración final = 1,82 mg/ml de ARNm de EPO (encapsulado). Zave=105,6 nm (Dv(50)=53,7 nm; Dv(90)=157 nm).
6	Se mezclan alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT5001, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K (40:20:35:5) y se diluyen con etanol hasta obtener 3 ml de volumen final. Por separado, se prepara una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNcirc de EPO a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyecta rápidamente en la solución acuosa de ARNcirc y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra, se diafiltra con 1xPBS (pH 7,4), se concentra y se almacena a 2-8°C finales.

[0565] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia tiene una formulación como se describe en la Tabla 31a.

Tabla 31b

Composición (% molar)	Componentes
40:20:38.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
45:15:38.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido:Fitosterol*:PEG-DMG
50:10:38.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
55:5:38.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Phytostrol*:PEG-DMG
60:5:33.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitostrol*:PEG-DMG
45:20:33.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Phytostrol*:PEG-DMG
50:20:28.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Phytostrol*:PEG-DMG
55:20:23.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
60:20:18.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Phytostrol*:PEG-DM G
40:15:43.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Phytostrol*:PEG-DMG
50:15:33.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
55:15:28.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
60:15:23.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
40:10:48.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
45:10:43.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
55:10:33.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
60:10:28.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
40:5:53.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
45:5:48.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
50:5:43.5:1.5	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
40:20:40:0	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
45:20:35:0	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
50:20:30:0	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
55:20:25:0	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
60:20:20:0	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG
40:15:45:0	Compuesto: Fosfolípido: Fitosterol*:PEG-DMG

[0566] En algunas formas de realización, el vehículo de transferencia tiene una formulación como se describe en la Tabla 31b.

[0567] Para composiciones de nanopartículas que incluyen ARNcirc, soluciones del ARNcirc en concentraciones de 0,1 mg/ml en agua desionizada se diluyen en un tampón, por ejemplo, tampón citrato de sodio 50 mM a un pH entre 3 y 4 para formar una solución madre. Alternativamente, se diluyen soluciones del ARNcirc en concentraciones de 0,15 mg/ml en agua desionizada en un tampón, por ejemplo, tampón de acetato de sodio 6,25 mM a un pH entre 3 y 4,5 para formar una solución madre.

[0568] Las composiciones de nanopartículas que incluyen un ARN circular y un componente lipídico se preparan combinando la solución lipídica con una solución que incluye el ARN circular en el componente lipídico a proporciones peso:peso de ARN circular entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 50:1. La solución lipídica se inyecta rápidamente usando, por ejemplo, un sistema basado en microfluidos NanoAssemblr a velocidades de flujo entre aproximadamente 10 ml/min y aproximadamente 18 ml/min o entre aproximadamente 5 ml/min y aproximadamente 18 ml/min en la solución de ARNcirc, para producir una suspensión con una relación de agua a etanol entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 4:1.

[0569] Las composiciones de nanopartículas se pueden procesar mediante diálisis para eliminar el etanol y lograr el intercambio de tampón. Las formulaciones se dializan dos veces frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, en volúmenes 200 veces mayores que los del producto primario utilizando casetes Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL) con un límite de peso molecular de 10 kDa. o 20 kDa. A continuación, se dializan las formulaciones durante la noche a 4°C. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra a través de filtros estériles de 0,2 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) en viales de vidrio y se sella con cierres de engarce. Generalmente se obtienen soluciones de composición de nanopartículas de 0,01 mg/ml a 0,15 mg/ml.

[0570] El método descrito anteriormente induce nanoprecipitación y formación de partículas.

[0571] Se pueden utilizar procesos alternativos que incluyen, entre otros, unión en T e inyección directa, para lograr la misma nanoprecipitación. B. Caracterización de composiciones de nanopartículas.

[0572] Puede usarse un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para determinar el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial zeta de las composiciones de nanopartículas en 1xPBS para determinar el tamaño de partícula y 15 mM de PBS en la determinación del potencial zeta.

[0573] La espectroscopia ultravioleta-visible se puede utilizar para determinar la concentración de ARNcirc en composiciones de nanopartículas. Se añaden 100 µL de la formulación diluida en 1xPBS a 900 µL de una mezcla 4:1 (v/v) de metanol y cloroformo. Después de mezclar, se registra el espectro de absorbancia de la solución, por ejemplo, entre 230 nm y 330 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). La concentración de ARNcirc en la composición de nanopartículas se puede calcular basándose en el coeficiente de extinción del ARNcirc usado en la composición y en la diferencia entre la absorbancia a una longitud de onda de, por ejemplo, 260 nm y el valor inicial a una longitud de onda de, por ejemplo, 260 nm. ejemplo, 330 nm.

[0574] Se puede utilizar un ensayo de ARN QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA) para evaluar la encapsulación de ARNcirc por la composición de nanopartículas. Las muestras se diluyen hasta una concentración de aproximadamente 5 µg/mL o 1 µg/mL en una solución tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Se transfieren 50 µl de las muestras diluidas a una placa de poliestireno de 96 pocillos y se añaden a los pocillos 50 µl de tampón TE o 50 µl de una solución Triton X-100 al 2-4 %. La placa se incuba a una temperatura de 37°C durante 15 minutos. El reactivo RIBOGREEN® se diluye 1:100 o 1:200 en tampón TE y se agregan 100 µl de esta solución a cada pocillo. La intensidad de la fluorescencia se puede medir usando un lector de placas de fluorescencia (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) a una longitud de onda de excitación de, por ejemplo, aproximadamente 480 nm y una longitud de onda de emisión de, por ejemplo, aproximadamente 520 nm. Los valores de fluorescencia del blanco de reactivo se restan del de cada una de las muestras y el porcentaje de ARNcirc libre se determina dividiendo la intensidad de fluorescencia de la muestra intacta (sin adición de Triton X-100) por el valor de fluorescencia de la muestra rota. (causado por la adición de Triton X-100). C.

Estudios de formulación in vivo:

[0575] Para controlar la eficacia con la que diversas composiciones de nanopartículas administran ARNcirc a las células diana, se preparan y administran diferentes composiciones de nanopartículas que incluyen ARNcirc a poblaciones de roedores. A los ratones se les administra por vía intravenosa, intramuscular, intraarterial o intratumoral una dosis única que incluye una composición de nanopartículas con una formulación de nanopartículas lipídicas. En algunos casos, se puede obligar a los ratones a inhalar dosis. Los tamaños de las dosis pueden oscilar entre 0,001 mg/kg y 10 mg/kg, donde 10 mg/kg describe una dosis que incluye 10 mg de un ARNcirc en una composición de nanopartículas por cada kg de masa corporal del ratón. También se puede emplear una composición de control que incluya PBS.

[0576] Tras la administración de composiciones de nanopartículas a ratones, los perfiles de administración de dosis, las respuestas a las dosis y la toxicidad de formulaciones particulares y dosis de las mismas se pueden medir mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), imágenes bioluminiscentes u otros métodos. También se pueden evaluar los cursos temporales de expresión de proteínas. Muestras recolectadas de los roedores para evaluación puede incluir sangre y tejido (por ejemplo, tejido muscular del sitio de una inyección intramuscular y tejido interno); La recogida de muestras puede implicar el sacrificio de los animales.

Niveles más altos de expresión de proteínas inducida por la administración de una composición que incluye un ARNcirc serán indicativos de mayores eficiencias de traducción de ARNcirc y/o de entrega de ARNcirc de composición de nanopartículas. Como no se cree que los componentes distintos del ARN afecten a las maquinarias de traducción en sí, un mayor nivel de expresión de proteínas probablemente sea indicativo de una mayor eficiencia de suministro del ARNcirc por una composición de nanopartículas determinada en relación con otras composiciones de nanopartículas o la ausencia de las mismas.

EJEMPLO 27

Caracterización de composiciones de nanopartículas.

[0577] Puede usarse un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para determinar el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial zeta de las composiciones de vehículo de transferencia en 1xPBS para determinar el tamaño de partícula y 15 PBS mM para determinar el potencial zeta.

[0578] Se puede usar espectroscopia ultravioleta-visible para determinar la concentración de un agente terapéutico y/o profiláctico (por ejemplo, ARN) en composiciones de vehículos de transferencia. Se añaden 100 µl de la formulación diluida en 1xPBS a 90 µl de una mezcla 4:1 (v/v) de metanol y cloroformo. Después de mezclar, se registra el espectro de absorbancia de la solución, por ejemplo, entre 230 nm y 330 nm en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). La concentración de terapéutico y/o profiláctico en la composición de vehículo de transferencia se puede calcular basándose en el coeficiente de extinción del terapéutico y/o profiláctico usado en la composición y en la diferencia entre la absorbancia a una longitud de onda de, por ejemplo, 260 nm y el valor de referencia a una longitud de onda de, por ejemplo, 330 nm.

[0579] Para composiciones de vehículo de transferencia que incluyen ARN, se puede usar un ensayo de ARN QUANT-IT™ RIBOGREEN® (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA) para evaluar la encapsulación de ARN mediante la composición de vehículo de transferencia. Las muestras se diluyen hasta una concentración de aproximadamente 5 µg/mL o 1 µg/mL en una solución tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Se transfieren 50 µL de las muestras diluidas a una placa de poliestireno de 96 pocillos y se añaden a los pocillos 50 µL de tampón TE o 50 µL de una solución

Triton X-100 al 2-4 %. La placa se incubó a una temperatura de 37°C durante 15 minutos. El reactivo RIBOGREEN® se diluye 1:100 o 1:200 en tampón TE y se agregan 100 µL de esta solución a cada pocillo. La intensidad de la fluorescencia se puede medir usando un lector de placas de fluorescencia (Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA) a una longitud de onda de excitación de, por ejemplo, aproximadamente 480 nm y una longitud de onda de emisión de, por ejemplo, aproximadamente 520 nm. Los valores de fluorescencia del blanco de reactivo

[0580] se restan del de cada una de las muestras y el porcentaje de ARN libre se determina dividiendo la intensidad de fluorescencia de la muestra intacta (sin adición de Triton X-100) por el valor de fluorescencia de la muestra alterada (provocada por la adición del Tritón X-100).

EJEMPLO 28

Dirección a células T

[0581] Para dirigir los vehículos de transferencia a las células T, se acoplan a la superficie del vehículo de transferencia ligantes de antígenos de células T, por ejemplo, anticuerpos anti-CD8. Los anticuerpos anti-antígeno de células T se reducen ligeramente con un exceso de DTT en presencia de EDTA en PBS para exponer los tioles de la región bisagra libre. Para eliminar la DTT, los anticuerpos se pasan a través de una columna de desalación. El reticulante heterobifuncional SM(PEG)24 se utiliza para anclar anticuerpos a la superficie de vehículos de transferencia cargados con ARNcirc (los grupos amina están presentes en los grupos principales de los lípidos de PEG, los grupos tiol libres en los anticuerpos se crearon mediante enlaces cruzados DTT, SM(PEG)24 entre aminas y grupos tiol). Primero se incuban los vehículos de transferencia con un exceso de SM(PEG)24 y se centrifugan para eliminar el reticulante que no ha reaccionado. A continuación, se incuban vehículos de transferencia activados con un exceso de anticuerpo anti-antígeno de células T reducido. El anticuerpo no unido se elimina utilizando un dispositivo de filtración centrífuga.

EJEMPLO 29

ARN que contiene vehículo de transferencia usando RV88.

[0582] En este ejemplo, el ARN que contiene vehículos de transferencia se sintetiza usando el chip de microfluidos de vórtice 2-D con el lípido catiónico RV88 para la entrega de ARNcirc.

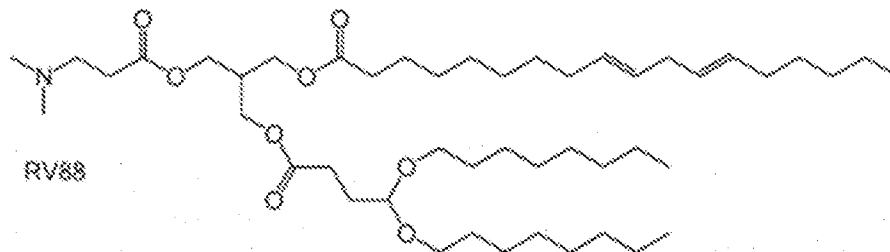


Tabla 32a

Material e Instrumento	Proveedor	Car n°
Tris-HCl 1 M, pH 8,0, estéril	Teknova	T1080
Solución de cloruro de sodio 5M	Teknova	S0250
como tampón citrato, pH 6,0 (100 mM)	Teknova	Q2446
Agua libre de nucleasas	Ambion	AM9937
Tritón X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV88	GVK bio	
DSPC	Lipoid	556500
Colesterol	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
Etanol	Acros Organic	615090010
Viales de vidrio de borosilicato de 5 ml	Thermo Scientific	ST5-20
Columnas Desaladoras PD MiniTrap G-25	GE Healthcare	VWR Cat. #95055-984
Kit de ensayo de ARN Quant-iT RiboGreen	Molecular Probes/Life Technologies	R11490
Microplacas negras de 96 pocillos.	Greiner	655900

[0583] Se prepararon RV88, DSPC y colesterol en etanol a una concentración de 10 mg/ml en viales de borosilice. El lípido 14:0-PEG2K PE se prepara a una concentración de 4 mg/ml también en un vial de vidrio de borosilice. La disolución de los lípidos en concentraciones madre se logra mediante sonicación de los lípidos en etanol durante 2 minutos. A continuación, las soluciones se calientan en un agitador orbital basculante ajustado a 170 rpm a 37 °C durante 10 min. A continuación, los viales se equilibran a 26 °C durante un mínimo de 45 min. A continuación, los lípidos se mezclan añadiendo volúmenes de lípido madre como se muestra en la Tabla 32b. A continuación, se ajusta la solución con etanol de modo que la concentración final de lípidos sea de 7,92 mg/ml.

Tabla 32b

Composición	PM	%	nmoles	mg	Existencias (mg/ml)	ul	Etanol (ul)
RV88	794,2	40 %	7200	5,72	10	571,8	155,3
DSPC	790,15	10 %	1800	1,42	10	142,2	
Colesterol	386,67	48 %	8640	3,34	10	334,1	
PEG2K	2693,3	2 %	360	0,97	4	242,4	

[0584] ARN como una solución madre con tampón citrato 75 mM a pH 6,0 y una concentración de ARN de 1,250 mg/ml. A continuación, se ajusta la concentración del ARN a 0,1037 mg/ml con tampón citrato 75 mM a pH 6,0, equilibrado a 26 °C. A continuación, la solución se incuba a 26 °C durante un mínimo de 25 min.

[0585] La cámara de microfluidos se limpia con etanol y las bombas de jeringa neMYSIS se preparan cargando una jeringa con la solución de ARN y otra jeringa con el lípido etanólico. Ambas jeringas están cargadas y bajo el control del software neMESYS. A continuación, las soluciones se aplican al chip de mezcla en una proporción de fase acuosa a orgánica de 2 y un caudal total de 22 ml/min (14,67 ml/min para ARN y 7,33 ml/min para la solución lipídica. Ambas bombas se inician sincrónicamente). La solución mezcladora que fluyó del chip de microfluidos se recoge en fracciones de 4x1 ml y la primera fracción se desecha como desecho. La solución restante que contiene los liposomas de ARN se intercambia utilizando minicolumnas desalinizadoras G-25 a Tris-HCl 10 mM. EDTA 1 mM, a pH 7,5. Después del intercambio de tampón, los materiales se caracterizan por tamaño y atrapamiento de ARN mediante análisis DLS y ensayos Ribogreen, respectivamente.

EJEMPLO 30

ARN que contiene vehículo de transferencia utilizando RV94.

[0586] En este ejemplo, el ARN que contiene liposomas se sintetiza usando el chip de microfluidos de vórtice 2-D con el lípido catiónico RV94 para la entrega de ARNcirc.



Tabla 33

Materiales e Instrumento	Proveedor	Cat #
Tris-HCl 1 M, pH 8,0, estéril	Teknova	T1080
Solución de cloruro de sodio 5M	Teknova	S0250
Tampón citrato QB, pH 6,0 (100 mM)	Teknova	Q2446
Agua libre de nucleasas	Ambion	AM9937
Tritón X-100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
RV94	GVK bio	
DSPC	Lipoid	556500
Colesterol	Sigma	C3045-5G
PEG2K	Avanti Polar Lipids	880150
Etanol	Acros Organic	615090010
Viales de vidrio de borosilicato de 5 ml	Thermo Scientific	ST5-20
Columnas Desaladoras PD MiniTrap G-25	GE Healthcare	VWR. Cat. #95055-984
Kit de ensayo de ARN Quant-iT RiboGreen	Molecular Probes/Life Technologies	R11490
Microplacas negras de 96 pocillos.	Greiner	655900

[0587] Los lípidos se prepararon como en el Ejemplo 29 usando las cantidades de material mencionadas en la Tabla 34 hasta obtener una concentración de lípido final de 7,92 mg/ml.

Tabla 34

Composición	PM	%	nmoles	mg	Existencias (mg/ml)	ul	Etanol (ul)
RV94	808,22	40 %	2880	2,33	10	232,8	155,3
DSPC	790,15	10 %	720	0,57	10	56,9	
Colesterol	386,67	48 %	3456	1,34	10	133,6	
PEG2K	2693,3	2 %	144	0,39	4	97,0	

[0588] La solución acuosa de ARNcirc se prepara como una solución madre con tampón citrato 75 mM a pH 6,0 y el ARNcirc a 1,250 mg/ml. A continuación, se ajusta la concentración del ARN a 0,1037 mg/ml con tampón citrato 75 mM a pH 6,0, equilibrado a 26 °C. A continuación, la solución se incuba a 26 °C durante un mínimo de 25 min.

[0589] La cámara de microfluidos se limpia con etanol y las bombas de jeringa neMYSIS se preparan cargando una jeringa con la solución de ARN y otra jeringa con el lípido etanólico. Ambas jeringas están cargadas y bajo el control del software neMESYS. A continuación, las soluciones se aplican al chip de mezcla en una proporción de fase acuosa a orgánica de 2 y un caudal total de 22 ml/min (14,67 ml/min para ARN y 7,33 ml/min para la solución lipídica. Ambas bombas se inician sincrónicamente). La solución mezcladora que fluyó del chip de microfluidos se recoge en fracciones de 4x1 ml y la primera fracción se descarta como desecho. La solución restante que contiene los vehículos de transferencia de ARNcirc se intercambia utilizando minicolumnas de desalinización G-25 a Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, a pH 7,5, como se describió anteriormente. Después del intercambio de tampón, los materiales se caracterizan por tamaño y atrapamiento de ARN mediante análisis DLS y ensayos Ribogreen, respectivamente. El análisis biofísico de los liposomas se muestra en la Tabla 35.

Tabla 35

Nombre de muestra	Relación N:P	TFR	Relación	Cantidad de encapsulación de ARN	Rendimiento de encapsulación de ARN	Tamaño	
		ml/min	(fase acuosa/org)	(mg/ml)	%	d.nm	PDI
SAM-RV94	8	22	2	31,46	86,9	113,1	0,12

EJEMPLO 31

Protocolo general para mezcla en línea.

[0590] Soluciones madres individuales y separadas: una que contiene lípidos y la otra ARNcirc. La reserva lipídica que contiene un lípido o una mezcla de lípidos deseada, DSPC, colesterol y lípido PEG se prepara solubilizada en etanol al 90 %. El 10 % restante es tampón citrato de pH bajo. La concentración de la reserva lipídica es de 4 mg/ml. El pH de este tampón citrato puede oscilar entre pH 3 y pH 5, dependiendo del tipo de lípido empleado. El ARNcirc también se solubiliza en tampón citrato a una concentración de 4 mg/ml. Se preparan 5 ml de cada solución madre.

[0591] Las soluciones madre son completamente transparentes y se garantiza que los lípidos estén completamente solubilizados antes de combinarlos con ARNcirc. Las soluciones madre pueden calentarse para solubilizar completamente los lípidos. Los ARNcirc utilizados en el proceso pueden ser oligonucleótidos modificados o no modificados y pueden conjugarse con restos lipófilos como el colesterol.

[0592] Las reservas individuales se combinan bombeando cada solución a una unión en T. Se utilizó una bomba Watson-Marlow de doble cabezal para controlar simultáneamente el inicio y la parada de las dos corrientes. Un tubo de polipropileno de 1,6 mm se reduce aún más a un tubo de 0,8 mm para aumentar el caudal lineal. La línea de polipropileno (ID = 0,8 mm) está unida a cada lado de una unión en T. La T de polipropileno tiene un borde lineal de 1,6 mm para un volumen resultante de 4,1 mm³. Cada uno de los extremos grandes (1,6 mm) de la línea de polipropileno se coloca en tubos de ensayo que contienen una solución lipídica solubilizada o un ARNcirc solubilizado. Después de la unión en T, se coloca un solo tubo por donde salió la corriente combinada. A continuación, el tubo se extiende a un recipiente con 2x volumen de PBS, que se agita rápidamente. El caudal de la bomba está ajustado a 300 rpm o 110 ml/min. El etanol se elimina y se intercambia por PBS mediante diálisis. A continuación, las formulaciones lipídicas se concentran mediante centrifugación o diafiltración hasta una concentración de trabajo adecuada.

[0593] Los ratones C57BL/6 (Charles River Labs, MA) reciben solución salina o ARN circular formulado mediante inyección en la vena de la cola. En diversos momentos después de la administración, se recolectan muestras de suero mediante sangrado retroorbitario. Los niveles séricos de proteína del factor VII se determinan en muestras utilizando un ensayo cromogénico (Biophen FVTI, Ania Corporation, OH). Para determinar los niveles de ARN hepático del factor VII,

se sacrifican los animales y se recolectan los hígados y se congelan en nitrógeno líquido. Se preparan lisados de tejido a partir de tejidos congelados y los niveles de ARN hepático del factor VII se cuantifican utilizando un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

[0594] La actividad de FVII se evalúa en animales tratados con ARNip de FVTI 48 horas después de la inyección intravenosa (bolo) en ratones C57BL/6. El FVII se mide utilizando un kit disponible comercialmente para determinar los niveles de proteína en suero o tejido, siguiendo las instrucciones del fabricante a escala de microplaca. La reducción de FVII se determina frente a ratones de control no tratados y los resultados se expresan como % de FVII residual. En la selección de cada nueva composición de liposomas se utilizan dos niveles de dosis (0,05 y 0,005 mg/kg de ARNip de FVII).

EJEMPLO 32

Formulación de ARNcirc utilizando vesículas preformadas.

[0595] Vehículos de transferencia que contienen lípidos catiónicos se elaboran utilizando el método de vesículas preformadas. Los lípidos catiónicos, DSPC, colesterol y lípidos PEG se solubilizan en etanol en una proporción molar de 40/10/40/10, respectivamente. La mezcla de lípidos se añade a un tampón acuoso (citrate 50 mM, pH 4) mezclando hasta una concentración final de etanol y lípidos del 30 % (vol/vol) y 6,1 mg/ml respectivamente y se deja equilibrar a temperatura ambiente durante 2 min. antes de la extrusión. Los lípidos hidratados se extruyen a través de dos filtros apilados de tamaño de poro de 80 nm (Nuclepore) a 22°C usando un extrusor Lipex (Northern Lipids, Vancouver, BC) hasta que se obtiene un diámetro de vesícula de 70-90 nm, según se determina mediante análisis Nicomp. obtenido. Para mezclas de lípidos catiónicos que no forman vesículas pequeñas, hidratar la mezcla de lípidos con un tampón de pH más bajo (citrate 50 mM, pH 3) para protonar el grupo fosfato en el grupo principal de DSPC ayuda a formar vesículas estables de 70 a 90 nm.

[0596] Se añade el ARNcirc de FVII (solubilizado en una solución acuosa de citrate 50 mM, pH 4 que contiene etanol al 30 %) a las vesículas, preequilibradas a 35 °C, a una velocidad de ~5 ml/min con mezcla. Después de alcanzar una proporción final de ARNcirc/lípido objetivo de 0,06 (peso peso), la mezcla se incuba durante 30 minutos más a 35 °C para permitir la reorganización de las vesículas y la encapsulación del ARN FVII. A continuación, se retira el etanol y se reemplaza el tampón externo con PBS (NaCl 155 mM, Na₂HPO₄ 3 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH 7,5) mediante diálisis o diafiltración de flujo tangencial. La relación final entre ARN circular y lípidos encapsulados se determina después de la eliminación del ARN no encapsulado utilizando columnas de centrifugación de exclusión de tamaño o columnas de centrifugación de intercambio iónico.

EJEMPLO 33

Expresión de proteínas de unión a antígenos triespecíficas a partir de ARN circular diseñado

[0597] ARN circulares están diseñados para incluir: (1) un fragmento de intrón del grupo I posterior al empalme en 3'; (2) un sitio de entrada interno a los ribosomas (IRES); (3) una región codificante de proteína de unión a antígeno triespecífica; y (4) una región de homología 3'. Las regiones de proteína de unión a antígeno triespecífica se construyen para producir una proteína de unión a antígeno triespecífica ejemplar que se unirá a un antígeno diana, por ejemplo, GPC3.

Generación de un dominio de unión a scFv CD3.

[0598] El número de acceso de Uniprot P07766. La secuencia canónica de la cadena gamma CD3 humana es el número de acceso de Uniprot P09693. La secuencia canónica de la cadena CD3delta humana es el número de acceso de Uniprot P043234. Los anticuerpos contra CD3epsilon, CD3gamma o CD3delta se generan mediante tecnologías conocidas, como la maduración por afinidad. Cuando se utilizan anticuerpos anti-CD3 murinos como material de partida, se desea la humanización de los anticuerpos anti-CD3 murinos para el entorno clínico, donde los residuos específicos de ratón pueden inducir una respuesta del antígeno anti-ratón humano (HAMA) en sujetos que reciben tratamiento de una proteína de unión a antígeno triespecífica descrita en el presente documento. La humanización se logra injertando regiones CDR de anticuerpo anti-CD3 murino en estructuras aceptoras de línea germinal humana apropiadas, incluyendo opcionalmente otras modificaciones a las CDR y/o regiones estructurales.

[0599] Por lo tanto, se usan anticuerpos anti-CD3 humanos o humanizados para generar secuencias scFv para dominios de unión a CD3 de una proteína de unión a antígeno triespecífica. Se obtienen secuencias de ADN que codifican los dominios VL y VH humanos o humanizados y, opcionalmente, los codones para las construcciones se optimizan para la expresión en células de Homo sapiens. El orden en el que aparecen los dominios VL y VH en el scFv varía (es decir, orientación VL-VH o VH-VL), y tres copias de la subunidad "G4S" o "G4S" (G4S)₃ conectan los dominios variables. para crear el dominio scFv. Las construcciones de plásmido scFv anti-CD3 pueden tener etiquetas Flag, His u otras etiquetas de afinidad opcionales, y se electroporan en HEK293 u otras líneas celulares humanas o de mamíferos adecuadas y se purifican. Los ensayos de validación incluyen análisis de unión mediante FACS, análisis cinético utilizando Proteon y tinción de células que expresan CD3.

Generación de un dominio de unión scFv Glypican-3 (GPC3)

[0600] Glypican-3 (GPC3) es una de las proteínas de la superficie celular presente en el carcinoma hepatocelular pero no en células sanas tejido hepático normal. Con frecuencia se observa elevado en el carcinoma hepatocelular y se asocia con malo pronóstico para los pacientes con CHC. Se sabe que activa la señalización Wnt. Se han generado anticuerpos GPC3, incluidos MDX-1414, HN3, GC33 e YP7.

[0601] Se genera un scFv que se une a GPC-3 u otro antígeno diana de manera similar al método anterior para la generación de un dominio de unión de scFv a CD3.

Expresión de proteínas de unión a antígenos triespecíficas in vitro.

[0602] Un sistema de expresión de células CHO (Flp-In®, Life Technologies), un derivado de células de ovario de hámster chino CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao y Puck, Proc. Natl. Acad Sci USA 1968; 60 (4): 1275-81), se utiliza. Las células adherentes se subcultivan según protocolos de cultivo celular estándar proporcionados por Life Technologies.

[0603] Para la adaptación al crecimiento en suspensión, las células se separan de los matraces de cultivo de tejidos y se colocan en un medio libre de suero. Las células adaptadas a suspensión se criopreservan en medio con DMSO al 10 %.

[0604] Se generan líneas celulares CHO recombinantes que expresan de forma estable proteínas de unión a antígeno triespecíficas secretadas mediante transfección de células adaptadas a suspensión. Durante la selección con el antibiótico higromicina B, las densidades de células viables se miden dos veces por semana, y las células se centrifugan y se resuspenden en medio de selección nuevo a una densidad máxima de 0,13106 células viables/ml. Los grupos de células que expresan de manera estable proteínas de unión a antígeno triespecíficas se recuperan después de 2 a 3 semanas de selección, momento en el que las células se transfieren a un medio de cultivo estándar en matraces agitados. La expresión de proteínas secretadas recombinantes se confirma realizando electroforesis en gel de proteínas o citometría de flujo. Los grupos de células estables se criopreservan en medio que contiene DMSO.

[0605] Las proteínas de unión a antígenos triespecíficas se producen en cultivos discontinuos alimentados de 10 días de líneas celulares CHO transfectadas de forma estable mediante secreción en el sobrenadante del cultivo celular. Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recolectan después de 10 días con viabilidades de cultivo típicamente >75 %. Se recogen muestras de los cultivos de producción cada dos días y se evalúan la densidad y viabilidad celular. El día de la recolección, los sobrenadantes del cultivo celular se eliminan mediante centrifugación y filtración al vacío antes de su uso posterior.

[0606] Los títulos de expresión de proteínas y la integridad del producto en sobrenadantes de cultivos celulares se analizan mediante SDS-PAGE.

Purificación de proteínas de unión a antígenos triespecíficas.

[0607] Las proteínas de unión a antígeno triespecíficas se purifican a partir de sobrenadantes de cultivos de células CHO en un procedimiento de dos pasos. Las construcciones se someten a cromatografía de afinidad en un primer paso, seguida de cromatografía de exclusión por tamaño preparativa (SEC) en Superdex 200 en un segundo paso. Las muestras se intercambian con tampón y se concentran mediante ultrafiltración hasta una concentración típica de >1 mg/ml. La pureza y la homogeneidad (normalmente >90 %) de las muestras finales se evalúan mediante SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, seguido de inmunotransferencia utilizando un anti -(dominio de extensión de vida media) o anticuerpo antiidiotipo así como mediante SEC analítica, respectivamente. Las proteínas purificadas se almacenan en alícuotas a -80 °C hasta su uso.

EJEMPLO 34

La expresión de ARN circular diseñado con un dominio de extensión de vida media ha mejorado los parámetros farmacocinéticos que sin un dominio de extensión de vida media

[0608] La proteína de unión a antígeno triespecífica codificada en una molécula de ARNcirc del ejemplo 23 se administra a cynomolgus monos como inyección en bolo de 0,5 mg/kg por vía intramuscular. Otro grupo de monos cynomolgus recibe una proteína comparable codificada en una molécula de ARNcirc en tamaño con dominios de unión a CD3 y GPC-3, pero que carece de un dominio de extensión de vida media. Un tercer y cuarto grupo reciben una proteína codificada en una molécula de ARNcirc con CD3 y dominios de unión al dominio de extensión de vida media y una proteína con GPC-3 y dominios de extensión de vida media, respectivamente. Ambas proteínas codificadas por ARNcirc son comparables en tamaño a la proteína triespecífica de unión a antígeno. Cada grupo de prueba consta de 5 monos. Se toman muestras de suero en los momentos indicados, se diluyen en serie y se determina la concentración de las proteínas usando un ELISA de unión a CD3 y/o GPC-3.

[0609] El análisis farmacocinético se realiza utilizando las concentraciones plasmáticas del artículo de prueba. Los datos de plasma medios del grupo para cada artículo de prueba se ajustan a un perfil multiexponencial cuando se representan en comparación con el tiempo posterior a la dosificación. Los datos se ajustan a un modelo estándar de dos compartimentos con entrada en bolo y constantes de velocidad de primer orden para las fases de distribución y eliminación. La ecuación general para el mejor ajuste de los datos para la administración iv es: $c(t) = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$, donde $c(t)$ es la concentración plasmática en el momento t , A y B son intersecciones en el eje Y , y α y β son las constantes de velocidad aparentes de primer orden para las fases de distribución y eliminación, respectivamente. La fase α es la fase inicial del aclaramiento y refleja la distribución de la proteína en todo el líquido extracelular del animal, mientras que la segunda parte de la curva de desintegración o fase β representa el aclaramiento plasmático verdadero. Los métodos para ajustar dichas ecuaciones son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, $A = D/V(\alpha - k_{21})/(\alpha \rho)$, $B = D/V(\beta - k_{21})/(\beta \rho)$, y α y β (para $\alpha > \beta$) son raíces de la ecuación cuadrática: $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ usando los parámetros estimados de V =volumen de distribución, k_{10} =tasa de eliminación, k_{12} =tasa de transferencia del compartimento 1 al compartimento 2 y k_{21} =tasa de transferencia del compartimento 2 al compartimento 1, y D = la dosis administrada.

[0610] Análisis de datos: Se realizan gráficos de perfiles de concentración versus tiempo usando KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09 Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, Pa.). Los valores informados como inferiores a lo reportable (LTR) no se incluyen en el análisis farmacocinético y no se representan gráficamente. Los parámetros farmacocinéticos se determinan mediante análisis compartimental utilizando el software WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™ Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, California). Los parámetros farmacocinéticos se calculan como se describe en Ritschel WA y Kearns GL, 1999, EST: Handbook Of Basic Pharmacokinetics Include Clinical Applications, 5ª edición, American Pharmaceutical Assoc., Washington, D C.

[0611] Se espera que la proteína de unión a antígeno triespecífica codificada en una molécula de ARNcirc del Ejemplo 23 tenga parámetros farmacocinéticos mejorados tales como un aumento en el tiempo medio de eliminación en comparación con las proteínas que carecen de un dominio de extensión de vida media.

EJEMPLO 35

Citotoxicidad de la proteína triespecífica de unión a antígeno

[0612] La proteína de unión a antígeno triespecífica codificada en una molécula de ARNcirc del Ejemplo 23 se evalúa in vitro en su mediación de la citotoxicidad dependiente de células T para células diana GPC-3+.

[0613] Se incuban células diana GPC3 marcadas con fluorescencia con PBMC aisladas de donantes aleatorios o células T como células efectoras en presencia de la proteína de unión a antígeno triespecífica del Ejemplo 23. Después de la incubación durante 4 h a 37 °C. En una incubadora humidificada, se determina en un espectrofluorímetro la liberación del colorante fluorescente de las células diana al sobrenadante. Las células diana incubadas sin la proteína triespecífica de unión a antígeno del Ejemplo 23 y las células diana totalmente lisadas mediante la adición de saponina al final de la incubación sirven como controles negativos y positivos, respectivamente.

[0614] En base a las células diana vivas restantes medidas, el porcentaje de lisis celular específica se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula: $[1 - (\text{número de dianas vivas (muestra)} / \text{número de dianas vivas (espontáneas)})] \times 100 \%$. Las curvas sigmoideas de respuesta a la dosis y los valores de EC50 se calculan mediante regresión no lineal/ajuste logístico de 4 parámetros utilizando el software GraphPad. Los valores de lisis obtenidos para una concentración de anticuerpo determinada se utilizan para calcular curvas sigmoideas de dosis-respuesta mediante un análisis de ajuste logístico de 4 parámetros utilizando el software Prism.

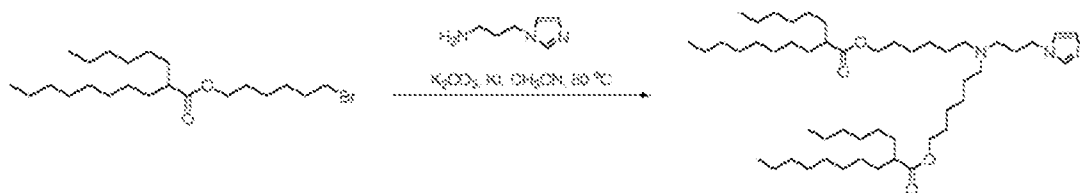
EJEMPLO 36

Síntesis de lípidos ionizables

38.1 Síntesis de ((3-(2-metil-1H-imidazol-1-il)propil)azanediil)bis(hexano-6,1-diilo)bis(2-hexildecanoato) (Lípido 27, Tabla 10a) y ((Bis(2-hexildecanoato) de 3-(1H-imidazol-1-il)propil)azanediil)bis(hexano-6,1-diilo) (Lípido 26, Tabla 10a)

[0615] En un matraz de fondo redondo de 100 ml conectado con un condensador, se añadió 3-(1H-imidazol-1-il)propan-1-amina (100 mg, 0,799 mmol) o 3-(2-metil-1H-imidazol-il)propan-1-amina (0,799 mmol), 2-hexildecanoato de 6-bromohexilo (737,2 mg, 1,757 mmol), carbonato de potasio (485 mg, 3,515 mmol) y yoduro de potasio (13 mg, 0,08 mmol) se mezclaron en acetonitrilo (30 ml) y la mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 48 h. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró a través de un lecho de Celite. El filtrado se diluyó con acetato de etilo. Después de lavar con agua, salmuera y secar sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó y el residuo bruto se purificó mediante cromatografía flash (SiO_2 : CH_2Cl_2 = 100 % a 10 % de metanol en CH_2Cl_2) y se obtuvo un producto oleoso incoloro (92 mg, 15 %). La fórmula molecular de ((3-(1H-imidazol-1-il)propil)azanediil)bis(hexano-6,1-diil)bis(2-hexildecanoato)) es $\text{C}_{50}\text{H}_{95}\text{N}_3\text{O}_4$ y el peso molecular (M_w) es 801,7.

[0616] Esquema de reacción para la síntesis de ((3-(1H-imidazol-1-il)propil)azanediil)bis(hexano-6,1-diilo)bis(2-hexildecanoato)) (Lípido 26, Tabla 10a).



[0617] La caracterización del lípido 26 se realizó mediante LC-MS. La Figura 27A-C muestra la caracterización del Lípido 26. La Figura 27A muestra la RMN de protones observada para el Lípido 26. La Figura 27B es una traza de LC/MS representativa para el Lípido 26 con cromatogramas de iones totales y UV mostrados.

38.2 Síntesis del lípido 22-S14

38.2.1 Síntesis de 2-(tetradecilthio)etan-1-ol

[0618] A una mezcla de 2-sulfaniletanol (5,40 g, 69,11 mmol, 4,82 ml, 0,871 eq) en acetonitrilo (200 ml) se le añadió 1-bromotetradecano (22 g, 79,34 mmol, 23,66 ml, 1 eq) y carbonato de potasio (17,55 g, 126,95 mmol, 1,6 eq) a 25°C. La mezcla de reacción se calentó a 40°C y se agitó durante 12 h. La TLC (acetato de etilo/éter de petróleo = 25/1, R_f = 0,3, teñido con I₂) mostró que el material de partida se consumió por completo y se generó una nueva mancha principal. La mezcla de reacción se filtró y la torta de filtración se lavó con acetonitrilo (50 ml) y, a continuación, el filtrado se concentró al vacío para obtener un residuo que se purificó mediante columna sobre gel de sílice (acetato de etilo/éter de petróleo = 1/100 a 1/25) para proporcionar 2-(tetradecilthio)etan-1-ol (14 g, rendimiento 64,28 %) como un sólido blanco.

[0619] RMN ¹H (ET36387-45-P1A, 400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ 0,87 - 0,91 (m, 3 H) 1,27 (s, 20 H) 1,35 - 1,43 (m, 2 H) 1,53 - 1,64 (m, 2 H) 2,16 (br s, 1 H) 2,49 - 2,56 (m, 2 H) 2,74 (t, *J* = 5,93 Hz, 2 H) 3,72 (br d, *J* = 4,89 Hz, 2 H). La Figura 28 muestra el espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) correspondiente.

38.2.2 Síntesis de acrilato de 2-(tetradecilthio)etilo

[0620] A una solución de 2-(tetradecilthio)etan-1-ol (14 g, 51,00 mmol, 1 eq) en diclorometano (240 ml) se le añadió trietilamina (7,74 g, 76,50 mmol, 10,65 ml, 1,5 eq) y cloruro de prop-2-enoilo (5,54 g, 61,20 mmol, 4,99 ml, 1,2 eq) gota a gota a 0°C en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó a 25°C y se agitó durante 12 h. La TLC (acetato de etilo/éter de petróleo = 25/1, R_f = 0,5, teñido con I₂) mostró que el material de partida se consumió por completo y se generó una nueva mancha principal. La solución de reacción se concentró al vacío para obtener un producto bruto que se purificó mediante columna sobre gel de sílice (acetato de etilo/éter de petróleo = 1/100 a 1/25) para proporcionar acrilato de 2-(tetradecilthio)etilo (12 g, rendimiento 71,61 %) como un aceite incoloro.

[0621] RMN ¹H (ET36387-49-P1A, 400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ 0,85 - 0,93 (m, 3 H) 1,26 (s, 19 H) 1,35 - 1,43 (m, 2 H) 1,53 - 1,65 (m, 2 H) 2,53 - 2,62 (m, 2 H) 2,79 (t, *J* = 7,03 Hz, 2 H) 4,32 (t, *J* = 7,03 Hz, 2 H) 5,86 (dd, *J* = 10,39, 1,47 Hz, 1 H) 6,09 - 6,19 (m, 1 H) 6,43 (dd, *J* = 17,30, 1,41 Hz, 1 H). La Figura 29 muestra el espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) correspondiente.

38.2.3 Síntesis de 3,3'-((3-(2-metil-¹H-imidazol-1-il)propil)azanediil)dipropionato de bis(2-(tetradecilthio)etil) (lípido 22-S14)

[0622] Se cargó un matraz con 3-(2-metil-¹H-imidazol-1-il)propan-1-amina (300 mg, 2,16 mmol) y acrilato de 2-(tetradecilthio)etilo (1,70 g, 5,17 mmol). La mezcla de reacción pura se calentó a 80°C y se agitó durante 48 h. La TLC (acetato de etilo, R_f = 0,3, teñido con I₂, se añadió una gota de hidróxido de amonio) mostró que el material de partida se consumió por completo y se formó una nueva mancha principal. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (4 ml) y se purificó en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 3/1 a 0/1, se añadió hidróxido de amonio al 0,1 %) para obtener bis(2-(tetradecilthio)etil) Dipropionato de 3,3'-((3-(2-metil-¹H-imidazol-1-il)propil)azanodiil) (501 mg, rendimiento 29,1 %) como un aceite incoloro.

[0623] RMN ¹H (ET36387-51-P1A, 400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ 0,87 (t, *J* = 6,73 Hz, 6 H) 1,25 (s, 40 H) 1,33 - 1,40 (m, 4 H) 1,52 - 1,61 (m, 4 H) 1,81 - 1,90 (m, 2 H) 2,36 (s, 3 H) 2,39 - 2,46 (m, 6 H) 2,53 (t, *J* = 7,39 Hz, 4 H) 2,70 - 2,78 (m, 8 H) 3,84 (t, *J* = 7,17 Hz, 2 H) 4,21 (t, *J* = 6,95 Hz, 4 H) 6,85 (s, 1 H) 6,89 (s, 1 H). La Figura 30 muestra el espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) correspondiente.

38.3 Síntesis de 3,3'-((3-(¹H-imidazol-1-il)propil)azanediil)dipropionato de bis(2-(tetradecilthio)etil) (lípido 93-S14)

[0624] Se cargó un matraz con 3-(¹H-imidazol-1-il)propan-1-amina (300 mg, 2,40 mmol, 1 eq) y acrilato de 2-(tetradecilthio)etilo (1,89 g, 5,75 mmol, 2,4 eq). La mezcla de reacción pura se calentó a 80°C y se agitó durante 48 h. La

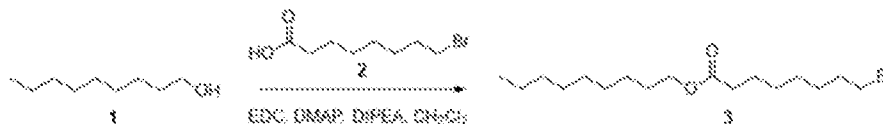
TLC (acetato de etilo, $R_f = 0,3$, teñido con I_2 , se añadió una gota de hidróxido de amonio) mostró que el material de partida se consumió por completo y se formó una nueva mancha principal. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (4 ml) y se purificó en columna sobre gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 1/20 - 0/100, se añadió hidróxido de amonio al 0,1 %) para obtener bis(2-(tetradecil)etil) Dipropionato de 3,3'-((3-(1H-imidazol-1-il)propil)azanediil) (512 mg, rendimiento 27,22 %) como un aceite incoloro.

[0625] RMN ^1H (ET36387-54-P1A, 400 MHz, CLOROFORMO- d) δ 0,89 (t, $J = 6,84$ Hz, 6 H) 1,26 (s, 40 H) 1,34 - 1,41 (m, 4 H) 1,58 (br t, $J = 7,50$ Hz, 4 H) 1,92 (t, $J = 6,62$ Hz, 2 H) 2,36 - 2,46 (m, 6 H) 2,55 (t, $J = 7,50$ Hz, 4 H) 2,75 (q, $J = 6,84$ Hz, 8 H) 3,97 (t, $J = 6,95$ Hz, 2 H) 4,23 (t, $J = 6,95$ Hz, 4 H) 6,95 (s, 1 H) 7,06 (s, 1 H) 7,51 (s, 1 H). La Figura 31 muestra el espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) correspondiente.

38.4 Síntesis de 8-((3-(2-metil-1H-imidazol-1-il)propil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoato de heptadecan-9-ilo (Lípido 54, Tabla 10a)

38.4.1 Síntesis de 8-bromooctanoato de nonilo (3)

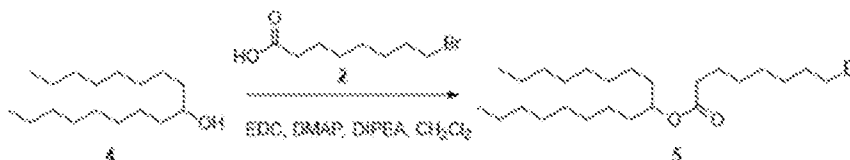
[0626]



[0627] A una mezcla de ácido 8-bromooctanoico (2) (18,6 g, 83,18 mmol) y nonan-1-ol (1) (10 g, 69,32 mmol) en CH_2Cl_2 (500 ml) se le añadió DMAP (1,7 g, 13,86 mmol), DIPEA (48 ml, 277,3 mmol) y EDC (16 g, 83,18 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de concentrar la mezcla de reacción, el residuo bruto se disolvió en acetato de etilo (500 ml), se lavó con HCl 1 N, solución sat. $NaHCO_3$, agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó y el residuo bruto se purificó mediante cromatografía flash (SiO_2 : hexano = 100 % a 30 % de EtOAc en hexano) y se obtuvo el producto oleoso incoloro 3 (9 g, 37 %).

38.4.2 Síntesis de 8-bromooctanoato de heptadecan-9-ilo (5)

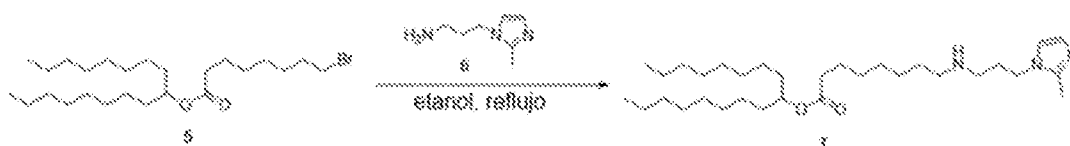
[0628]



[0629] A una mezcla de ácido 8-bromooctanoico (2) (10 g, 44,82 mmol) y heptadecan-9-ol (4) (9,6 g, 37,35 mmol) en CH_2Cl_2 (300 ml) se añadió DMAP (900 mg, 7,48 mmol), DIPEA (26 ml, 149,7 mmol) y EDC (10,7 g, 56,03 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de concentrar la mezcla de reacción, el residuo bruto se disolvió en acetato de etilo (300 ml), se lavó con HCl 1 N, solución sat. $NaHCO_3$, agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó y el residuo bruto se purificó mediante cromatografía flash (SiO_2 : hexano = 100 % a 30 % de EtOAc en hexano) y se obtuvo el producto oleoso incoloro 5 (5 g, 29 %).

38.4.3 Síntesis de 8-((3-(2-metil-1H-imidazol-1-il)propil)amino)octanoato de heptadecan-9-ilo (7)

[0630]

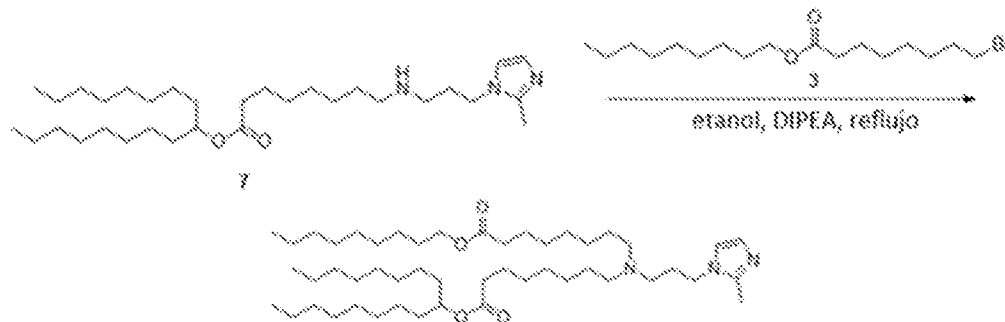


[0631] En un matraz de fondo redondo de 100 ml conectado con un condensador, 8-bromooctanoato de heptadecan-9-ilo (5) (860 mg, 1,868 mmol) y 3-(2-metil-1H-imidazol-1-il)propan-1-amina (6) (1,3 g, 9,339 mmol) se mezcló en etanol (10 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante la noche. MS (APCI) mostró el producto esperado. La mezcla se

enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía flash (SiO₂:CH₂Cl₂= 100 % a 10 % de metanol + 1 %NH₄OH en CH₂Cl₂) y se obtuvo el producto oleoso incoloro **7** (**665 mg, 69 %**).

38.4.4 Síntesis de 8-((3-(2-metil-1H-imidazol-1-il)propil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoato de heptadecan-9-ilo (Lípido 54, Tabla 10 a)

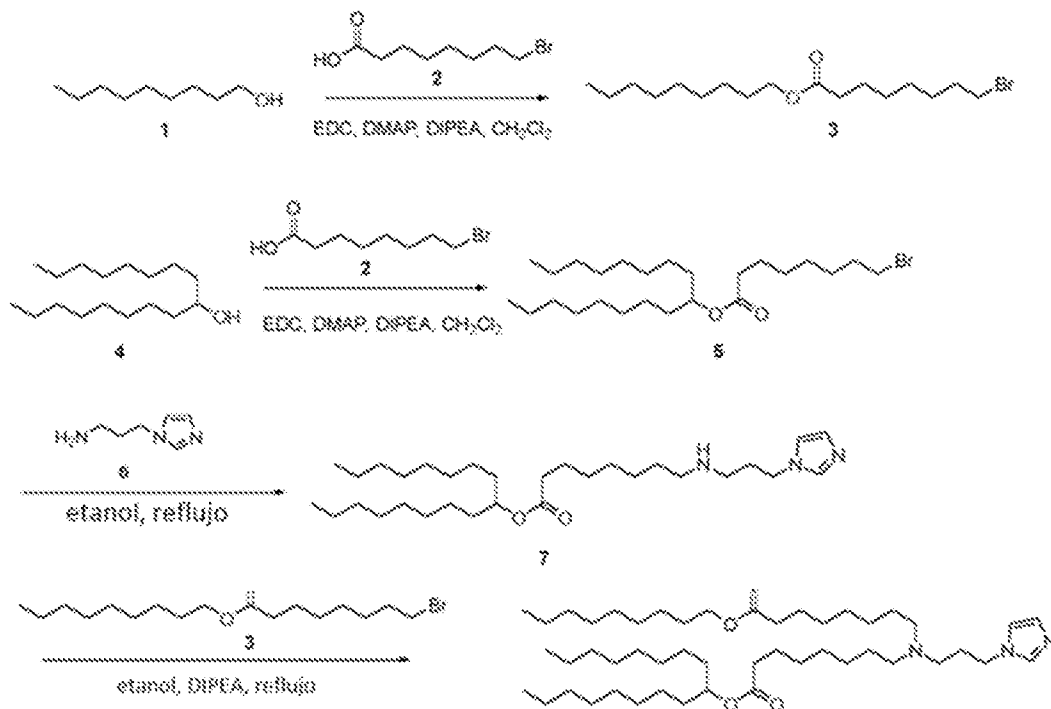
[0632]



[0633] En un matraz de fondo redondo de 100 ml conectado con un condensador, 8-((3-(2-metil-1H- imidazol -1-il)propil)amino)octanoato de heptadecan-9-ilo (**7**) (**665 mg, 1,279 mmol**) y 8-bromooctanoato de nonilo (**3**) (**536 mg, 1,535 mmol**) se mezclaron en etanol (10 ml), después se añadió DIPEA (0,55 ml, 3,198 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante la noche. Tanto la MS (APCI) como la TLC (10 %MeOH + 1 %NH₄OH en CH₂Cl₂) mostraron el producto y algo de material de partida sin reaccionar. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía flash (SiO₂:CH₂Cl₂= 100 % a 10 % de metanol + 1 %NH₄OH en CH₂Cl₂) y se obtuvo un aceite incoloro (170 mg, 17 %).

38.5 Síntesis de 8-((3-(1H-imidazol-1-il)propil)(8-(noniloxi)-8-oxooctil)amino)octanoato de heptadecan-9-ilo (Lípido 53, Tabla 10a)

[0634]



[0635] Lípido 53 de la Tabla 10a se sintetiza según el esquema anterior. Las condiciones de reacción son idénticas a Lípido 54 con la excepción de 3-(1H-imidazol-1-il)propan-1-amina como imidazol amina.

EJEMPLO 37*Formulación de nanopartículas lipídicas con ARN circular.*

[0636] Se formaron nanopartículas lipídicas (NPL) utilizando un instrumento Precision Nanosystems Ignite con una cámara de mezcla 'NextGen'. La fase de etanol contenía lípido 26 ionizable de la Tabla 10a, se combinó DSPC, colesterol y DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en una relación en peso de 16:1:4:1 o 62:4:33:1. con una fase acuosa que contiene ARN circular y tampón de acetato de sodio 25 mM a pH 5,2. Se utilizó una proporción de mezcla de agua a etanol de 3:1. A continuación, los NPL formulados se dializaron en 1 litro de agua y se intercambiaron 2 veces durante 18 horas. Las NPL dializadas se filtraron utilizando un filtro de 0,2 mm. Antes de la dosificación *in vivo*, las NPL se diluyeron en PBS. Los tamaños de NPL se determinaron mediante dispersión dinámica de luz. Se midió el promedio Z en una cubeta con 1 ml de NPL de 20 mg/ml en PBS (pH 7,4) utilizando el Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Se registraron el promedio Z y el índice de polidispersidad.

39.1 *Formulación de los lípidos 26 y 27 de la Tabla 10a*

[0637] Se formaron nanopartículas lipídicas (NPL) utilizando un instrumento Precision Nanosystems Ignite con una cámara de mezcla 'NextGen'. La fase de etanol contenía Lípido 26 o Lípido 27 ionizable de la Tabla 10a, DOPE, Colesterol y DSPEPEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en una relación en peso de 16:1:4:1 o 62:4:33:1. combinado con una fase acuosa que contiene ARN circular y tampón de acetato de sodio 25 mM a pH 5,2. Se utilizó una proporción de mezcla de agua a etanol de 3:1. A continuación, las NPL formuladas se dializaron en 1 litro de agua y se intercambiaron 2 veces durante 18 horas. Las NPL dializadas se filtraron utilizando un filtro de 0,2 mm. Antes de la dosificación *in vivo*, las NPL se diluyeron en PBS. Los tamaños de NPL se determinaron mediante dispersión dinámica de luz. Se midió el promedio Z en una cubeta con 1 ml de NPL de 20 mg/ml en PBS (pH 7,4) utilizando el Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Se registraron el promedio Z y el índice de polidispersidad.

39.2 *Formulación de los lípidos 53 y 54 de la Tabla 10a*

[0638] Se formaron nanopartículas lipídicas (NPL) usando un instrumento Precision Nanosystems Ignite con una cámara de mezcla 'NextGen'. La fase de etanol contenía el Lípido ionizable 53 o 54 de la Tabla 10a, DOPE, Colesterol y DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc.) en una relación molar de 50:10:38,5:1,5 se combinó con una fase acuosa que contenía ARN circular y Tampón de acetato de sodio 25 mM a pH 5,2. Se utilizó una proporción de mezcla de agua a etanol de 3:1. A continuación, las NPL formuladas se dializaron en 1 litro de PBS 1x y se intercambiaron 2 veces durante 18 horas. Las NPL dializadas se filtraron utilizando un filtro de 0,2 µm. Antes de la dosificación *in vivo*, las NPL se diluyeron en PBS. Los tamaños de NPL se determinaron mediante dispersión dinámica de luz. Se midió el promedio Z en una cubeta con 1 ml de NPL de 20 µg/ml en PBS (pH 7,4) utilizando el Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Se registraron el promedio Z y el índice de polidispersidad.

[0639] El potencial zeta de NPL usando el Malvern Panalytical Zetasizer Pro. Se cargó en una celda capilar Zetasizer para su análisis una mezcla que contenía 200 µl de la solución de partículas en agua y 800 µl de agua destilada libre de ARNasa con una concentración final de partículas de 400 µg/ml.

[0640] La encapsulación de ARN se determinó usando un ensayo Ribogreen. Las soluciones de nanopartículas se diluyeron en tampón de ácido trisetilendiaminotetraacético (TE) a una concentración teórica de ARNo de 2 µg/ml. Se prepararon soluciones estándar de ARNo diluidas en tampón TE en un rango de 2 µg/ml a 0,125 µg/ml. Las partículas y los estándares se agregaron a todos los pocillos y se realizó una segunda incubación (37 °C a 350 rpm durante 3 minutos). La fluorescencia se midió utilizando un espectrofluorómetro de microplacas SPECTRAmax® GEMINI XS. La concentración de ARN circular en cada solución de partículas se calculó utilizando la curva estándar. La eficiencia de encapsulación se calculó a partir de la proporción de ARNo detectado entre partículas lisadas y no lisadas.

Tabla 36a. Caracterización de NPL

Lípido ionizable	Tamaño (nm)	PDI	Eficiencia de encapsulación (%)	Potencial de datos Zeta (mV)
22-T14	88	0,09	96	3,968
93-S14	119	0,02	96	-6,071
Lípido 26, Tabla 10a	86	0,08	92	-15,24

Tabla 36b. Caracterización de NPL

Lípido ionizable	Promedio Z (nm)	PDI	Atrapamiento de ARN (%)
22-T14	64	0,05	97
93-S14	74	0,04	95
Lípido 26, Tabla 10a	84	0,04	96

EJEMPLO 38*Análisis en vivo*

[0641] Se administraron dosis de 0,5 mg/kg de ARN por vía intravenosa a ratones CD-1 hembra o c57BL/6J_hembra que oscilaban entre 22 y 25 g. Seis horas después de la inyección, a los ratones se les inyectaron por vía intraperitoneal 200 ml de D-luciferina a una concentración de 15 mg/ml. 5 minutos después de la inyección, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se colocaron dentro del sistema de imágenes in vivo IVIS Spectrum (Perkin Elmer) con el lado dorsal hacia arriba. El flujo IVIS total de lípidos 22-S 14, 93-S 14, lípido 26 (Tabla 10a) de todo el cuerpo se presenta en la Figura 32A. Después de 10 minutos de inyección, se escanearon los ratones en busca de luminiscencia. Los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los órganos dentro de los 25 minutos posteriores a la inyección de luciferina para buscar luminiscencia en el hígado, el bazo, los riñones, los pulmones y el corazón. Las imágenes (Figuras 33A-B, 34A-B, 35A-B) se analizaron utilizando el software Living Images (Perkin Elmer). Se dibujaron regiones de interés para obtener flujo y radiancia promedio y se analizaron para determinar la biodistribución de la expresión de proteínas (Figura 32A-B).

[0642] Figura 32A ilustra el aumento del flujo total en todo el cuerpo observado a partir del ARN de luciferasa con NPL del lípido 26 (Tabla 10a) en comparación con los NPL elaborados con lípidos 22-S14 y 93-S14. La Figura 32B muestra el análisis IVIS ex vivo de tejidos destacando aún más la expresión general aumentada con el lípido 26 (Tabla 10a) mientras se mantienen las proporciones deseadas de bazo a hígado observadas con los lípidos 22-S14 y 93-S 14 a pesar de los cambios estructurales significativos diseñados para mejorar la expresión. Estos datos resaltan las mejoras proporcionadas por el Lípido 26 (Tabla 10a) en comparación con los lípidos informados anteriormente.

[0643] También se realizó un análisis similar al descrito anteriormente con ARN encapsulado en LNP formados con lípidos 15 de la Tabla 10b o Lípido 53 o 54 de la Tabla 10a. Las Figuras 36A-C muestran el análisis IVIS ex vivo de tejidos, resaltando respectivamente la expresión general con el Lípido 15, 53 y 54 mientras se mantienen las proporciones deseadas de bazo a hígado a pesar de los cambios estructurales significativos diseñados para mejorar la expresión. La Figura 36D muestra los resultados para el control de PBS. Estos datos demuestran las mejoras proporcionadas por los lípidos 15, 53 y 54 de la Tabla 10a en comparación con los lípidos informados anteriormente, como 93-S 14 y 22-S 14.

EJEMPLO 39*Entrega de luciferasa*

[0644] Se transfectaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (Stemcell Technologies) con nanopartículas lipídicas (NPL) que encapsulaban ARN circular de luciferasa de luciérnaga (*fluc*) y se examinaron para determinar la expresión de luciferasa. Se incubaron PBMC de dos donantes diferentes *in vitro* con cinco composiciones de NPL diferentes, que contenían ARN circular que codifica la luciferasa de luciérnaga (200 ng), a 37 °C en RPMI, suero humano al 2 %, IL-2 (10 ng/ml) y BME de 50 µM. Se utilizaron PBMC incubadas sin NPL como control negativo. Después de 24 horas, las células se lisaron y se analizaron para determinar la expresión de luciferasa de luciérnaga basada en bioluminiscencia (Promega BrightGlo).

[0645] Se presentan datos representativos en las Figuras 37A y 37B, que muestran que los NPL probados son capaces de administrar ARN circular en células inmunes humanas primarias dando como resultado la expresión de proteínas.

EJEMPLO 40*Entrega in vitro de proteína fluorescente verde (GFP) o receptor de antígeno quimérico (CAR)*

[0646] Se transfectaron PBMC humanas (Stemcell Technologies) con NPL que encapsulaba GFP y se examinaron mediante citometría de flujo. Se incubaron PBMC de cinco donantes diferentes (PBMC AE) *in vitro* con una composición de NPL, que contenía ARN circular que codifica GFP o CD19-CAR (200 ng), a 37 °C en RPMI, suero humano al 2 %, IL-2 (10 ng/mL) y 50 µM BME. Se utilizaron PBMC incubadas sin NPL como control negativo. Después de 24, 48 o 72 horas después de la incubación con NPL, se analizaron las células en busca de CD3, CD19, CD56, CD14, CD11b, CD45, muertos vivos reparables y carga útil (GFP o CD19-CAR).

[0647] Los datos representativos se presentan en las Figuras 38A y 38B, que muestran que el NPL probado es capaz de entregar ARN circular en células inmunes humanas primarias, lo que da como resultado la expresión de proteínas.

EJEMPLO 41

Múltiples variantes de IRES pueden mediar en la expresión del CAR CD19 murino in vitro

5 **[0648]** Múltiples construcciones de ARN circular, que codifican CAR CD19 anti-murino, contienen secuencias IRES únicas y se lipotransfectaron en líneas celulares 1C1C7. Antes de la lipotransfección, las células 1C1C7 se expanden durante varios días en RPMI completo. Una vez que las células se expandieron a números apropiados, las células 1C1C7 se lipotransfectaron (Invitrogen RNAiMAX) con cuatro construcciones de ARN circulares diferentes. Después de 24 horas, las células 1C1C7 se incubaron con proteína CD19 murina recombinante marcada con His (Sino Biological) y, a continuación, se tiñeron con un anticuerpo anti-His secundario. Posteriormente, las células se analizaron mediante citometría de flujo.

10 **[0649]** Se presentan datos representativos en las Figuras 39, que muestran que los IRES procedentes del virus indicado (apodemus agrarius picornavirus, kobuvirus caprino, parabovirus y salivirus) son capaces de impulsar la expresión de un CAR CD 19 anti-ratón en células T murinas.

EJEMPLO 42

El CAR CD19 murino media la destrucción de células tumorales in vitro

20 **[0650]** Se electroporaron ARN circular que codifica CAR anti-CD19 de ratón en células T murinas para evaluar la citotoxicidad mediada por CAR. Para la electroporación, las células T se electroporaron con ARN circular que codifica el CAR CD19 anti-ratón utilizando el sistema de transfección de neón de ThermoFisher y, a continuación, se dejaron reposar durante la noche. Para el ensayo de citotoxicidad, las células T electroporadas se cultivaron conjuntamente con células diana y no objetivo Fluc+ en una proporción de 1:1 en RPMI completo que contenía FBS al 10 %, IL-2 (10 ng/ml) y BME 25 50 uM y se incubaron durante la noche, a 37°C. La citotoxicidad se midió utilizando un sistema de ensayo de luciferasa 24 horas después del cocultivo (Promega Brightglo Luciferase System) para detectar la lisis de células diana y no diana de Fluc+. Los valores mostrados se calculan en relación con la señal simulada no transfectada.

30 **[0651]** Se presentan datos representativos, que muestran que un CAR CD19 anti-ratón expresado a partir de ARN circular es funcional en células T murinas *in vitro*.

EJEMPLO 43

35 *Agotamiento funcional de células B con un ARN circular encapsulado en lípidos que codifica el CAR CD19 murino*

[0652] A ratones C57BL/6J se les inyectó NPL formado con el Lípido 15 en la Tabla 10b, que encapsula ARN circular que codifica el CAR CD19 anti-murino. Como control, se inyectó el lípido 15 de la Tabla 10b que encapsula el ARN circular que codifica la luciferasa de luciérnaga (*f.Luc*) en diferentes grupos de ratones. A hembras C57BL.6J, que pesaban entre 40 20 y 25 g, se les inyectaron por vía intravenosa 5 dosis de 0,5 mg/kg de NPL, en días alternos. Entre inyecciones, las extracciones de sangre se analizaron mediante citometría de flujo para detectar vivos/muertos reparables, CD45, TCRvb, B220, CD11b y CAR antimurino. Dos días después de la última inyección, se recogieron los bazo y se procesaron para análisis de citometría de flujo. Los esplenocitos se tiñeron con CD45, TCRvb, B220, CD11b, NK1.1, F4/80, CD1 1c y CAR anti-murino reparables vivos/muertos. Los datos de ratones inyectados con CD19 CAR NPL anti-murino se normalizaron 45 con respecto a ratones que recibieron *f.Luc* NPL.

[0653] Se presentan datos representativos en las Figuras 41A, 41B y 41C, que muestran que un CAR CD19 anti-ratón expresado a partir de ARN circular administrado *in vivo* con NPL es funcional en células T murinas *in vivo*.

EJEMPLO 44

CD19 CAR expresado a partir de ARN circular tiene mayor rendimiento y mayor efecto citotóxico en comparación con el expresado a partir de ARNm

55 **[0654]** ARN circular que codifica el receptor de antígeno del antígeno quimérico anti-CD19, que incluye, desde el extremo N al extremo C, un scFv derivado de FMC63, un dominio transmembrana CD8, un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio intracelular CD3ζ, se electroporaron en células T periféricas humanas para evaluar la expresión en superficie y la citotoxicidad mediada por CAR. A modo de comparación, en este experimento se compararon células T electroporadas con ARN circular con células T electroporadas con ARNm. Para la electroporación, se aislaron células T CD3+ de PBMC humanas utilizando kits de aislamiento de células T disponibles comercialmente (Miltenyi Biotec) de PBMC humanas de donantes. Después del aislamiento, las células T se estimularon con anti-CD3/antiCD28 (Stemcell Technologies) y se expandieron durante 5 días a 37 °C en RPMI completo que contenía FBS al 10 %, IL-2 (10 ng/ml) y BME 50 uM. Cinco días después de la estimulación, las células T se sometieron a electroporación con ARN circular que codifica CD19 CAR anti-humano utilizando el sistema de transfección de neón de ThermoFisher y, a continuación, reposó durante la noche. 60 Para el ensayo de citotoxicidad, las células T electroporadas se cultivaron conjuntamente con células diana y no objetivo Fluc+ en una proporción de 1:1 en RPMI completo que contenía FBS al 10 %, IL-2 (10 ng/ml) y BME 50 uM y se incubaron

durante la noche. a 37°C. La citotoxicidad se midió utilizando un sistema de ensayo de luciferasa 24 horas después del cocultivo (Promega Brightglo Luciferase System) para detectar la lisis de células diana y no diana de Fluc+. Además, se tomó una alícuota de células T electroporadas y se tiñeron para detectar tinción reparable de muertos vivos, CD3, CD45 y receptores de antígenos quiméricos (FMC63) en el día del análisis.

[0655] Los datos representativos se presentan en las Figuras 42 y 43. Las Figuras 42A y 42B muestran que un CAR CD19 antihumano expresado a partir de ARN circular se expresa a niveles más altos y durante más tiempo que un CAR CD19 antihumano expresado a partir de ARNm lineal. Las Figuras 43A y 43B muestran que un CAR CD19 antihumano expresado a partir de ARN circular ejerce un efecto citotóxico mayor en relación con el CAR CD19 antihumano expresado a partir de ARNm lineal.

EJEMPLO 45

Expresión funcional de dos CAR a partir de un único ARN circular

[0656] Se electroporaron ARN circular que codifica receptores de antígenos quiméricos en células T periféricas humanas para evaluar la expresión superficial y la citotoxicidad mediada por CAR. El propósito de este estudio es evaluar si el ARN circular que codifica dos CAR se puede expresar estocásticamente con una secuencia 2A (P2A) o IRES. Para la electroporación, se adquirieron comercialmente células T CD3+ (Cellero) y se estimularon con anti-CD3/anti-CD28 (Stemcell Technologies) y se expandieron durante 5 días a 37°C en RPMI completo que contenía 10 % de FBS, IL-2 (10 ng/ml) y 50 uM de BME. Cuatro días después de la estimulación, las células T se sometieron a electroporación con ARN circular que codificaba CD19 CAR antihumano, CD19 CAR-2A antihumano-BCMA CAR antihumano y CD19 CAR-IRES antihumano-BCMA CAR antihumano usando ThermoFisher's Neon. A continuación, el sistema de transfección reposó durante la noche. Para el ensayo de citotoxicidad, se cultivaron conjuntamente células T electroporadas con células Fluc+ K562 que expresaban antígenos CD19 o BCMA humanos en una proporción de 1:1 en RPMI completo que contenía FBS al 10 %, IL-2 (10 ng/ml) y BME 50 uM y Se incubaron durante la noche a 37°C. La citotoxicidad se midió usando un sistema de ensayo de luciferasa 24 horas después del cocultivo (Promega BrightGlo Luciferase System) para detectar la lisis de las células diana Fluc+.

[0657] En la Figura 44 se presentan datos representativos, que muestran que dos CAR pueden expresarse funcionalmente a partir de la misma construcción de ARN circular y ejercer una función efectora citotóxica.

EJEMPLO 46

Transfección de ARN circular in vivo utilizando ratones reporteros Cre

[0658] Los ARN circulares que codifican la Cre recombinasa (Cre) se encapsulan en nanopartículas lipídicas como se describió anteriormente. A ratones hembra B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J (Ai9) de 6-8 semanas de edad se les administraron nanopartículas lipídicas a 0,5 mg/kg de ARN por vía intravenosa. La proteína tdTomato fluorescente se transcribió y tradujo en ratones Ai9 tras la recombinación Cre, lo que significa que los ARN circulares se entregaron y tradujeron en células tdTomato+. Después de 48 horas, se sacrificaron los ratones y se recogieron los bazo, se procesaron en una suspensión de células individuales y se tiñeron con varios anticuerpos conjugados con fluoróforos para inmunofenotipado mediante citometría de flujo.

[0659] Figura 45A muestra gráficos FACS representativos con frecuencias de expresión de tdTomato en diversos subconjuntos de células inmunitarias del bazo (CD45+, vivas), incluyendo mieloides totales (CD11b+), células B (CD19+) y células T (TCR-B+) después del tratamiento con NPL formados con el Lípido 27 o 26 de la Tabla 10a o el Lípido 15 de la Tabla 10b. Los ratones Ai9 inyectados con PBS representaron la fluorescencia de fondo de tdTomato. La Figura 45B cuantifica la proporción de células mieloides, células B y células T que expresan tdTomato (media + desviación estándar, n = 3), que es equivalente a la proporción de cada población de células que se ha transfectado con éxito con ARN circular Cre. Las NPL elaboradas con los lípidos 27 y 26 de la Tabla 10a exhiben una transfección de células mieloides y T significativamente mayor en comparación con el lípido 93-S 14, lo que destaca las mejoras conferidas por las modificaciones estructurales de los lípidos.

[0660] Figura 45C ilustra la proporción de poblaciones de células inmunes esplénicas adicionales que expresan tdTomato con Lípidos 27 y 26 de la Tabla 10a (media + desv. estándar, n = 3), que también incluyen células NK (NKp46+, TCR-B-), monocitos clásicos (CD11b+, Ly-6G-, Ly-6C_{hi}), monocitos no clásicos (CD11b+, Ly-6G-, Ly-6C_{lo}), neutrófilos (CD11b+, Ly-6G+) y células dendríticas (CD11c+, MHC-II+). Estos experimentos demuestran que los NPL elaborados con los lípidos 27 y 26 de la Tabla 10a y el lípido 15 de la Tabla 10b son eficaces para administrar ARN circulares a muchos subconjuntos de células inmunitarias esplénicas en ratones y conducen a una expresión exitosa de proteínas a partir del ARN circular en esas células.

EJEMPLO 47

Ejemplo 47A: Secuencias poliA incorporadas y purificación por afinidad para producir ARN circular inmunosilencioso

[0661] Se insertaron secuencias PolyA (20-30 nt) en los extremos 5' y 3' de la construcción de ARN (ARN precursor con secuencias poliA incorporadas en los intrones). Alternativamente, el ARN precursor y los intrones se pueden poliadenilar postranscripcionalmente usando, por ejemplo, *E. coli*. poliA polimerasa o poliA polimerasa de levadura, que requiere el uso de una enzima adicional.

[0662] El ARN circular en este ejemplo se circularizó mediante transcripción *in vitro* (IVT) y se purificó por afinidad lavando sobre una resina oligo-dT disponible comercialmente para eliminar selectivamente secuencias marcadas con poliA (incluidos intrones libres y ARN precursor) de la reacción de empalme. La IVT se realizó con un kit IVT comercial (New England Biolabs) o una mezcla IVT personalizada (Orna Therapeutics), que contenía monofosfato de guanosina (GMP) y trifosfato de guanosina (GTP) en diferentes proporciones (GMP:GTP = 8, 12,5 o 13,75). En algunas formas de realización, se puede incluir preferentemente GMP en una proporción alta de GMP:GTP como primer nucleótido, produciendo una mayoría de ARN precursores protegidos con monofosfato. A modo de comparación, el producto de ARN circular se purificó alternativamente mediante tratamiento con Xrn1, Rnase R y Dnase I (purificación enzimática).

[0663] A continuación, se evaluó la inmunogenicidad de los ARN circulares preparados usando el proceso de purificación por afinidad o purificación enzimática. Brevemente, los ARN circulares preparados se transfectaron en células A549. Después de 24 horas, las células se lisaron y se midió mediante qPCR la inducción de interferón beta-1 en relación con las muestras simuladas. Se utilizó 3p-hpRNA, un ARN trifosforilado, como control positivo.

[0664] Figuras 46B y 46C muestran que la purificación por afinidad de selección negativa elimina productos no circulares de reacciones de corte y empalme cuando se incluyen secuencias poliA en elementos que se eliminan durante el corte y empalme y están presentes en moléculas precursoras no empalmadas. La Figura 46D muestra ARN circulares preparados con condiciones IVT probadas y los métodos de purificación son todos inmunoquiescentes. Estos resultados sugieren que la purificación por afinidad de selección negativa es equivalente o superior a la purificación enzimática para la purificación de ARN circular y que las condiciones personalizadas de síntesis de ARN circular (condiciones IVT) pueden reducir la dependencia del exceso de GMP para lograr la máxima immunoquiescencia.

Ejemplo 47B: Sitio de unión dedicado y purificación por afinidad para la producción de ARN circular

[0665] En lugar de etiquetas poliA, se pueden incluir secuencias de diseño específico (DBS, sitio de unión dedicado).

[0666] En lugar de una etiqueta poliA, se puede usar un sitio de unión dedicado (DBS), tal como un oligonucleótido complementario diseñado específicamente que puede unirse a una resina, para agotar selectivamente el ARN precursor y los intrones libres. En este ejemplo, se insertaron secuencias DBS (30 nt) en los extremos 5' y 3' del ARN precursor. Se transcribió el ARN y el producto transcrito se lavó sobre un oligonucleótido complementario personalizado unido a una resina.

[0667] Las Figuras 47B y 47C demuestran que incluir la secuencia DBS diseñada en elementos que se eliminan durante el corte y empalme permite la eliminación de ARN precursor no cortado y componentes de intrones libres en una reacción de corte y empalme, mediante purificación por afinidad negativa.

Ejemplo 47C: Producción de un ARN circular que codifica distrofina

[0668] Se produjo un ARN circular de 12 kb y 12 000 nt que codifica distrofina mediante transcripción *in vitro* de precursores de ARN seguido de purificación enzimática usando una mezcla de Xrn1, DNasa 1 y RNasa R para degradar los componentes lineales restantes. La Figura 48 muestra que el ARN circular que codifica la distrofina se produjo con éxito.

EJEMPLO 48

El espaciador 5' entre el fragmento de intrón 3' y el IRES mejora la expresión del ARN circular

[0669] Se comparó el nivel de expresión de ARNcirc purificados con diferentes espaciadores 5' entre el fragmento de intrón 3' y el IRES en células Jurkat. Brevemente, se midió la luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante 24 horas después de la electroporación de 60.000 células con 250 ng de cada ARN.

[0670] Además, se comparó la estabilidad de los ARNcirc purificados con diferentes espaciadores 5' entre el fragmento de intrón 3' y el IRES en células Jurkat. Brevemente, se midió la luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante durante 2 días después de la electroporación de 60.000 células con 250 ng de cada ARN y se normalizó a la expresión del día 1.

[0671] Los resultados se muestran en las Figuras 49A y 49B, lo que indica que agregar un espaciador puede mejorar la función IRES y la importancia de la identidad de secuencia y la longitud del espaciador agregado. Una posible explicación es que el espaciador se agrega justo antes del IRES y probablemente funcione permitiendo que el IRES se pliegue de forma aislada de otros elementos estructurados, como los fragmentos de intrones.

EJEMPLO 49

[0672] Este ejemplo describe la exploración de deleciones desde el extremo 5' o 3' del kobuvirus caprino IRES. Los límites IRES generalmente están mal caracterizados y requieren un análisis empírico, y este ejemplo se puede utilizar para localizar las secuencias funcionales centrales necesarias para impulsar la traducción. Brevemente, se generaron construcciones de ARN circular con elementos IRES truncados unidos operativamente a una secuencia codificante de *Gaussia* luciferasa. Los elementos IRES truncados tenían secuencias de nucleótidos de las longitudes indicadas eliminadas del extremo 5' o 3'. La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 y 48 horas después de la electroporación de células T humanas primarias con ARN. La estabilidad de la expresión se calculó como la relación entre el nivel de expresión en el momento de las 48 horas y el del momento de las 24 horas.

[0673] Como se muestra en la Figura 50, la eliminación de más de 40 nucleótidos del extremo 5' del IRES redujo la expresión y alteró la función del IRES. La estabilidad de la expresión no se vio relativamente afectada por el truncamiento del elemento IRES, pero el nivel de expresión se redujo sustancialmente mediante la eliminación de 141 nucleótidos del extremo 3' del IRES, mientras que la eliminación de 57 o 122 nucleótidos del extremo 3' tuvo un impacto positivo en el nivel de expresión.

[0674] También se observó que la eliminación de la secuencia previa al inicio de 6 nucleótidos reducía el nivel de expresión del indicador de luciferasa. La sustitución de la secuencia de 6 nucleótidos por una secuencia de Kozak clásica (GCCACC) no tuvo un impacto significativo, pero al menos mantuvo la expresión.

EJEMPLO 50

[0675] Este ejemplo describe modificaciones (por ejemplo, truncamientos) de secuencias IRES seleccionadas, incluyendo Kobuvirus Caprino (CKV) IRES, Parabovirus IRES, Apodemus Picornavirus (AP) IRES, Kobuvirus SZAL6 IRES, Crohivirus B (CrVB) IRES, CVB3 IRES, y SAFV IRES. Las secuencias de los elementos IRES se proporcionan en SEQ ID NO: 348-389. Brevemente, se generaron construcciones de ARN circular con elementos IRES truncados unidos operativamente a una secuencia codificante de *Gaussia* luciferasa. Se transfectaron células HepG2 con los ARN circulares. La luminiscencia del sobrenadante se evaluó 24 y 48 horas después de la transfección. La estabilidad de la expresión se calculó como la relación entre el nivel de expresión en el momento de las 48 horas y el del momento de las 24 horas.

[0676] Como se muestra en la Figura 51, los truncamientos tuvieron efectos variables dependiendo de la identidad del IRES, que puede depender del mecanismo de iniciación y de los factores proteicos utilizados para la traducción, que a menudo difiere entre los IRES. Las deleciones 5' y 3' pueden combinarse eficazmente, por ejemplo, en el contexto de CKV IRES. La adición de una secuencia Kozak canónica en algunos casos mejoró significativamente la expresión (como en SAFV, Full vs Full+K) o disminuyó la expresión (como en CKV, 5d40/3d122 vs 5d40/3d122+K).

EJEMPLO 51

[0677] Este ejemplo describe modificaciones de secuencias IRES de CK-739, AP-748 y PV-743, incluidas mutaciones en sitios de inicio de traducción alta. Brevemente, se generaron construcciones de ARN circular con elementos IRES modificados unidos operativamente a una secuencia codificante de *Gaussia* luciferasa. La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 y 48 horas después de la transfección de células 1C1C7 con ARN.

[0678] CUG fue el sitio de inicio alternativo encontrado más comúnmente, pero también se caracterizaron muchos otros. Estos tripletes pueden estar presentes en el tracto de exploración IRES antes del codón de inicio y pueden afectar la traducción de los polipéptidos correctos. Se crearon cuatro mutaciones en el sitio de inicio alternativo, con las secuencias IRES proporcionadas en SEQ ID NO: 378-380. Como se muestra en la Figura 52, las mutaciones de sitios de iniciación de la traducción alternativos en el IRES CK-739 afectaron la traducción de los polipéptidos correctos, positivamente en algunos casos y negativamente en otros casos. La mutación de todos los sitios alternativos de inicio de traducción redujo el nivel de traducción.

[0679] Las secuencias de Kozak alternativas, 6 nucleótidos antes del codón de inicio, también pueden afectar los niveles de expresión. La secuencia de 6 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio era gTcacG, aaagtc, gTcacG, gtcattg, gcaaac y acaacc, respectivamente, en CK-739 IRES y las muestras números 1 a 5 en el grupo "6nt Pre-Start". Como se muestra en la Figura 52, la sustitución de ciertas secuencias de 6 nucleótidos antes del codón de inicio afectó la traducción.

[0680] También se observó que las deleciones terminales 5' y 3' en las secuencias IRES de AP-748 y PV-743 redujeron la expresión. Sin embargo, en el CK-739 IRES, que tenía un tracto de escaneo largo, la traducción no se vio relativamente afectada por las eliminaciones en el tracto de escaneo.

EJEMPLO 52

[0681] Este ejemplo describe modificaciones de secuencias IRES seleccionadas insertando regiones no traducidas (UTR) 5' y/o 3' y creando híbridos IRES. Brevemente, se generaron construcciones de ARN circular con elementos IRES

modificados unidos operativamente a una secuencia codificante de *Gaussia* luciferasa. La luminiscencia de la luciferasa de *Gaussia* secretada en el sobrenadante se midió 24 y 48 horas después de la transfección de células HepG2 con ARN.

[0682] Las secuencias IRES con UTR insertadas se proporcionan en SEQ ID NO: 390-401. Como se muestra en la Figura 53, la inserción de 5' UTR justo después del extremo 3' del IRES y antes del codón de inicio aumentó ligeramente la traducción del IRES del Kobuvirus Caprino (CK) pero en algunos casos anuló la traducción del IRES del Salivirus SZ1. La inserción de 3'UTR justo después del casete de parada no tuvo impacto en ambas secuencias IRES.

[0683] Las secuencias híbridas de CK IRES se proporcionan en las SEQ ID NO: 390-401. Se usó CK IRES como base y regiones específicas de CK IRES se reemplazaron con estructuras de aspecto similar de otras secuencias de IRES, por ejemplo, SZ1 y AV (Aichivirus). Como se muestra en la Figura 53, ciertas secuencias híbridas sintéticas de IRES eran funcionales, lo que indica que el IRES híbrido se puede construir usando partes de distintas secuencias de IRES que muestran estructuras predichas similares, mientras que la eliminación de estas estructuras anula completamente la función de IRES.

EJEMPLO 53

[0684] Este ejemplo describe modificaciones de ARN circulares mediante la introducción de codón de parada o variantes de casete. Brevemente, se generaron construcciones de ARN circular con elementos IRES unidos operativamente a una secuencia codificante de *Gaussia* luciferasa seguida de casetes de codones de parada variables, que incluían un codón de parada en cada marco y dos codones de parada en el marco de lectura de la secuencia codificante de *Gaussia* luciferasa. Se transfectaron células 1C1C7 con los ARN circulares. La luminiscencia del sobrenadante se evaluó 24 y 48 horas después de la transfección.

[0685] Las secuencias de los casetes de codones de parada se exponen en las SEQ ID NO: 406-412. Como se muestra en la Figura 54, ciertos casetes de codones de parada mejoraron los niveles de expresión, aunque tuvieron poco impacto en la estabilidad de la expresión. En particular, un casete de parada con dos codones de parada del marco 1 (el marco de lectura de la secuencia codificante de la luciferasa de *Gaussia*), siendo el primero TAA, seguido de un codón de parada del marco 2 y un codón de parada del marco 3, es eficaz para promover la traducción funcional.

EJEMPLO 54

[0686] Este ejemplo describe modificaciones de ARN circulares mediante la inserción de variantes 5'UTR. Brevemente, se generaron construcciones de ARN circular con elementos IRES con variantes 5' UTR insertadas entre el extremo 3' del IRES y el codón de inicio, estando el IRES operativamente unido a una secuencia codificante de *Gaussia* luciferasa. Se transfectaron células 1C1C7 con los ARN circulares. La luminiscencia del sobrenadante se evaluó 24 y 48 horas después de la transfección.

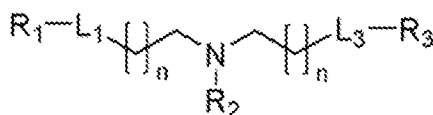
[0687] Las secuencias de las variantes 5' UTR se exponen en las SEQ ID NO: 402-405. Como se muestra en la Figura 55, una CK IRES con una secuencia Kozak canónica (UTR4) fue más efectiva cuando se agregó una secuencia espaciadora de GC baja/no estructurada de 36 nucleótidos (UTR2), lo que sugiere que las secuencias Kozak ricas en GC pueden interferir con el IRES central. plegable. El uso de un espaciador estructurado/GC superior con una secuencia de Kozak no mostró el mismo beneficio (UTR3), posiblemente debido a la interferencia con el plegamiento de IRES por parte del propio espaciador. La mutación de la secuencia Kozak a gTcacG (UTR1) mejoró la traducción al mismo nivel que la alternativa Kozak+espaciador sin necesidad de un espaciador.

EJEMPLO 55

[0688] Este ejemplo describe el impacto de los sitios diana de miARN en ARN circulares en los niveles de expresión. Brevemente, se generaron construcciones de ARN circular con elementos IRES unidos operativamente a una secuencia codificante de eritropoyetina humana (hEPO), donde se insertaron 2 sitios objetivo miR-122 en tándem en la construcción. Se transfectaron células Huh7 que expresan miR-122 con los ARN circulares. La expresión de hEPO en el sobrenadante se evaluó 24 y 48 horas después de la transfección mediante ELISA tipo sándwich.

[0689] Como se muestra en la Figura 56, el nivel de expresión de hEPO se anuló cuando los sitios diana de miR-122 se insertaron en el ARN circular. Este resultado demuestra que la expresión del ARN circular puede regularse mediante miARN. Como tal, la expresión específica de tipo celular o de tejido se puede lograr incorporando sitios diana de los miARN expresados en los tipos de células en los que la expresión de la proteína recombinante no es deseable.

a. un polinucleótido de ARN circular, y
b. un vehículo de transferencia que comprende un lípido ionizable representado por la Fórmula (1):

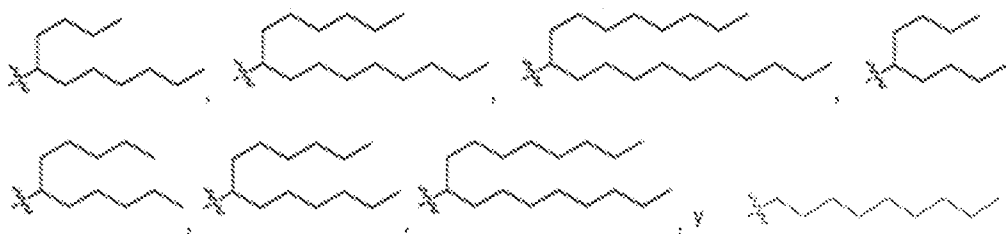


donde:

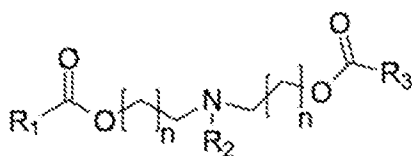
L₁ y L₃ son cada uno independientemente -OC(O)-* o -C(O)O-*, en donde "*" indica el punto de unión a R₁ o R₃; R₁ y R₃ son cada uno independientemente un alquilo C₉-C₂₀ o alquenilo C₉-C₂₀ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados de un grupo que consiste en oxo, halo, hidroxi, ciano, alquilo, alquenilo, aldehído, heterociclilalquilo, hidroxialquilo, dihidroxialquilo, hidroxialquilaminoalquilo, aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo, (heterocicli)(alquil)aminoalquilo, heterocicilo, heteroarilo, alquilheteroarilo, alquinilo, alcoxi, amino, dialquilamino, aminoalquilcarbonilamino, aminocarbonilalquilamino, (aminocarbonilalquil)(alquil)amino, alquenilcarbonilamino, hidroxicarbonilo, alquiloxicarbonilo, aminocarbonilo, aminoalquilaminocarbonilo, alquilaminoalquilaminocarbonilo, dialquilaminoalquilaminocarbonilo, heterociclilalquilaminocarbonilo, (alquilaminoalquil)(alquil)aminocarbonilo, alquilaminoalquilcarbonilo, dialquilaminoalquilcarbonilo, heterocicilicarbonilo, alquenilcarbonilo, alquilnilcarbonilo, alquilsulfóxido, alquilsulfóxidoalquilo, alquilsulfonilo y alquilsulfonaalquilo; y

Chemical structures of the three polyols used in the study:

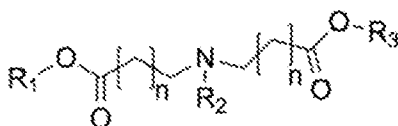
- 1**: 1,3-bis(2-ethylhexyloxy)propan-2-ol
- 2**: 1,3-bis(2-octyloxy)propan-2-ol
- 3**: 1,3-bis(2-nonyloxy)propan-2-ol



3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el lípido ionizable está representado por la Fórmula (1-1) o Fórmula (1-2):

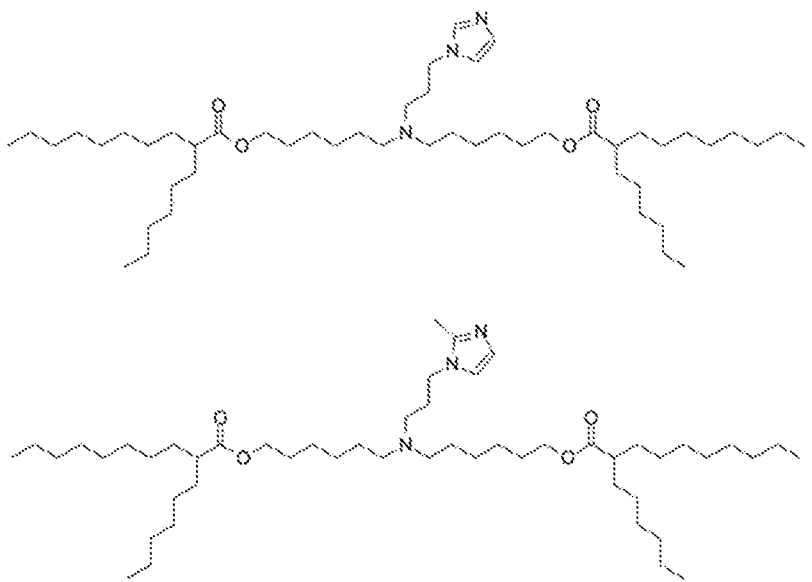


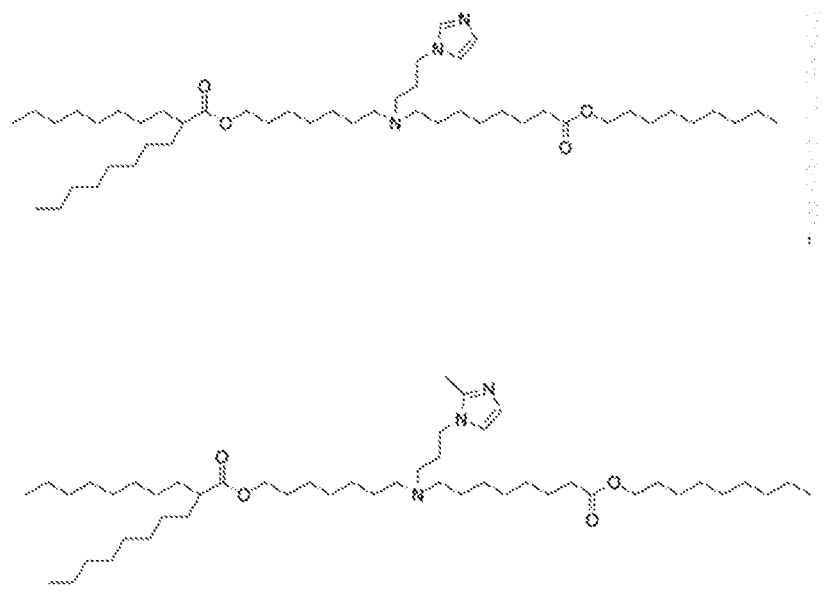
Formula (1-1);



Formula (1-2);

y/o en el que el lípido ionizable se selecciona del grupo que consiste en:





4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el polinucleótido de ARN circular comprende, en el siguiente orden:

- a. un fragmento de intrón post-empalme de un fragmento de intrón del grupo I en 3',
b. un IRES,
C. una secuencia de expresión, y
d. un fragmento de intrón post-empalme de un fragmento de intrón del grupo I en 5';
opcionalmente comprende además un primer espaciador antes del fragmento de intrón posterior al empalme del fragmento de intrón del grupo I en 3', y un segundo espaciador después del fragmento de intrón posterior al empalme del fragmento de intrón del grupo I en 5'; opcionalmente en donde el primer y segundo espaciadores tienen cada uno una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos.

5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden:

- (i)

- a. un fragmento de intrón del grupo I en 3',
b. un IRES,
c. una secuencia de expresión, y
d. un fragmento de intrón del grupo I en 5'; o

- (ii)

- a. una región de formación dúplex externa de 5',
- b. un fragmento de intrón del grupo I en 3',
- C. un espaciador interno 5' que comprende opcionalmente una región de formación dúplex interna 5',
- d. un IRES,
- e. una secuencia de expresión,
- f. un espaciador interno 3' que comprende opcionalmente una región formadora de dúplex interna 3',
- g. un fragmento de intrón del grupo I en 5', y
- h. una región de formación dúplex externa de 3'.

6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden:

- (i)

- a. una región de formación dúplex externa de 5',
- b. un espaciador externo de 5',
- c. un fragmento de intrón del grupo I en 3',

- d. un espaciador interno 5' que comprende opcionalmente una región de formación dúplex interna 5',
- e. un IRES,
- f. una secuencia de expresión,
- g. un espaciador interno 3' que comprende opcionalmente una región formadora de dúplex interna 3',
- h. un fragmento de intrón del grupo I en 5',
- i. un espaciador externo de 3', y
- j. una región formadora de dúplex externa en 3'; o

(ii)

- a. un fragmento de intrón del grupo I en 3',
- b. un espaciador interno 5' que comprende una región de formación dúplex interna 5',
- c. un IRES,
- d. una secuencia de expresión,
- e. un espaciador interno 3' que comprende una región formadora de dúplex interna 3', y
- f. un fragmento de intrón del grupo I en 5'.

7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el polinucleótido de ARN circular se elabora mediante circularización de un polinucleótido de ARN que comprende, en el siguiente orden:

(i)

- a. una primera secuencia poliA,
- b. una región de formación dúplex externa de 5',
- c. un espaciador externo de 5',
- d. un fragmento de intrón del grupo I en 3',
- e. un espaciador interno 5' que comprende una región de formación dúplex interna 5',
- f. un IRES,
- g. una secuencia de expresión,
- h. un espaciador interno 3' que comprende una región formadora de dúplex interna 3',
- i. un fragmento de intrón del grupo I en 5',
- j. un espaciador externo de 3',
- k. una región de formación dúplex externa de 3', y
- l. una segunda secuencia poliA;

(ii)

- a. una primera secuencia poliA
- b. un espaciador externo de 5',
- c. un fragmento de intrón del grupo I en 3',
- d. un espaciador interno 5' que comprende una región de formación dúplex interna 5',
- e. un IRES,
- f. una secuencia de expresión,
- g. un espaciador interno 3' que comprende una región formadora de dúplex interna 3',
- h. un fragmento de intrón del grupo I en 5',
- i. un espaciador externo de 3', y
- j. una segunda secuencia poliA o DBS; o

(iii)

- a. una primera secuencia poliA,
- b. un espaciador externo de 5',
- c. un fragmento de intrón del grupo I en 3',
- d. un espaciador interno 5' que comprende una región de formación dúplex interna 5',
- e. un IRES,
- f. una secuencia de expresión,
- g. un casete de condón de parada,
- h. un espaciador interno 3' que comprende una región formadora de dúplex interna 3',
- i. un fragmento de intrón del grupo I en 5',
- j. un espaciador externo de 3', y
- k. una segunda secuencia poliA.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 o 7, en la que el IRES tiene una secuencia de un IRES del virus del síndrome de Taura, virus Triatoma, virus de la encefalomiелitis de Theiler, virus simio 40, virus Solenopsis invicta 1, virus de Rhopalosiphum padi, virus de la reticuloendoteliosis, poliovirus humano 1, virus del intestino Plautia stali, virus de la abeja de Cachemira, rinovirus humano 2, virus Homalodisca coagulata-1, virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, virus

Homalodisca coagulata-1, virus Himetobi P, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis GB, virus de la fiebre aftosa, enterovirus humano 71, virus de la rinitis equina, virus similar a Ectropis obliqua picorna, virus de la encefalomiocarditis, Virus de Drosophila C, Coxsackievirus B3 humano, Tobamovirus crucífero, Virus de la parálisis del grillo, Virus de la diarrea viral bovina 1, virus negro de la célula reina, virus de la parálisis letal del pulgón, virus de la encefalomiелitis aviar, virus de la parálisis aguda de las abejas, virus hibisco de la mancha anular clorótica, virus de la peste porcina clásica, FGF2 humano, SFTPA1 humano, AML1/RUNX1 humano, antenapedia de Drosophila, AQP4 humano, AT1R humano, BAG-1 humano, BCL₂ humano, BIP humano, c-IAP1 humano, c-myc humano, eIF4G humano, NDST4L de Ratón, LEF1 Humano, HIF1 alfa de Ratón, n.myc Humano, Gtx de Ratón, p27kipl Humano, PDGF2/c-sis humano, p53 humano, Pim-1 humano, Rbm3 de ratón, Reaper de Drosophila, Scamper canino, Drosophila Ubx, UNR humano, UtrA de ratón, VEGF-A humano, XIAP humano, Drosophila sin pelo, S. cerevisiae TFID, S. cerevisiae YAP1, virus del grabado del tabaco, virus del arrugado del nabo, EMCV-A, EMCV-B, EMCV-Bf, EMCV-Cf, EMCV pEC9, Picobirnavirus, VHC QC64, Cosavirus humano E/D, Cosavirus humano F, Cosavirus humano JMY, Rinovirus NAT001, HRV14, HRV89, HRVC-02, HRV-A21, Salivirus A SH1, Salivirus FHB, Salivirus NG-J1, Parechovirus humano 1, Crohivirus B, Yc-3, Rosavirus M-7, Shanbavirus A, Pasivirus A, Pasivirus A 2, Ecovirus E14, Parechovirus 5 Humano, virus de Aichi, virus de la hepatitis A HA16, fopivirus, CVA10, enterovirus C, enterovirus D, Pegivirus humano 2, GBV-C GT110, GBV-C K1737, GBV-C Iowa, Pegivirus A 1220, Pasivirus A3, Sapelovirus, Rosavirus B, Virus Bakunsa, Tremovirus A, Pasivirus 1 porcino, PLV-CHN, Pasivirus A, Sicinivirus, Hepacivirus K, Hepacivirus A, BVDV1, virus de la enfermedad fronteriza, BVDV2, CSFV-PK15C, dicistrovirus SF573, virus similar a la picorna de Hubei, CRPV, Apodemus Agrarius Picornavirus, Kobuvirus Caprino, Parabovirus, Salivirus A BN5, Salivirus A BN2, Salivirus A 02394, Salivirus A GUT, Salivirus A CH, Salivirus A SZ1, Salivirus FHB, CVB3, CVB1, Echovirus 7, CVB5, EVA71, CVA3, CVA12, EV24 o un aptámero de eIF4G.

9. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la composición tiene una duración de efecto terapéutico *in vivo* en humanos mayor que el de una composición que comprende un polinucleótido de ARN lineal de referencia que tiene la misma secuencia de expresión que el polinucleótido de ARN circular; y/o en donde la composición tiene una duración de efecto terapéutico *in vivo* en humanos de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 horas; y/o

en donde la composición tiene una vida media funcional en una célula humana mayor o igual a la de un valor umbral predeterminado; y/o
 en donde la composición tiene una vida media funcional *in vivo* en humanos mayor que la de un valor umbral predeterminado;
 opcionalmente en el que la vida media funcional se determina mediante un ensayo de proteína funcional;
 opcionalmente, en el que el ensayo de proteína funcional comprende medir niveles de proteína codificada por la secuencia de expresión del polinucleótido de ARN circular en una muestra de suero o tejido de un paciente.

10. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además un lípido estructural y un lípido modificado con PEG; opcionalmente en donde el lípido estructural se une a C1q y/o promueve la unión del vehículo de transferencia que comprende dicho lípido a C1q en comparación con un vehículo de transferencia de control que carece del lípido estructural y/o aumenta la absorción del vehículo de transferencia unido a C1q en una célula inmune en comparación con un vehículo de transferencia de control que carece del lípido estructural.

11. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en medicina.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 que está dirigida a hepatocitos, células epiteliales, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células pulmonares, células óseas, células madre, células mesenquimales, células neurales, fotorreceptores células epiteliales pigmentadas de la retina, células secretoras, células cardíacas, adipocitos, células del músculo liso vascular, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células beta, células pituitarias, células del revestimiento sinovial, células ováricas, células testiculares, fibroblastos, células B, células T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos, células tumorales, células NK, células NKT, macrófagos o neutrófilos.

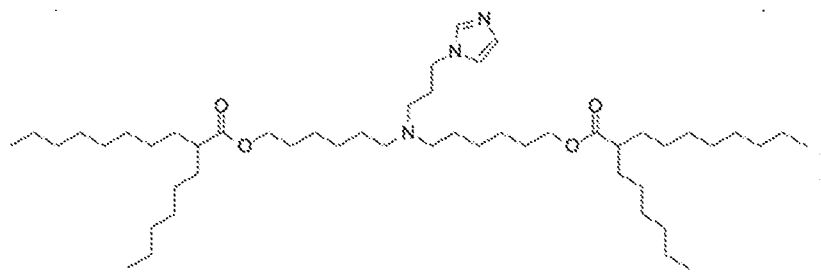
13. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 11, en la que el polinucleótido de ARN codifica una proteína terapéutica, citoquina o fragmento funcional, inhibidor del punto de control inmunológico, agonista, acoplador de células T secretadas, enzima inmunosupresora, GvHD o un factor de transcripción;
 opcionalmente en donde la proteína terapéutica es un receptor de antígeno quimérico.

14. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 13, en la que el receptor de antígeno quimérico, cuando está presente, comprende un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno seleccionado del grupo CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, tipo C, molécula similar a la lectina-1, CD33, variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFRvIII), gangliósido G2 (GD2), gangliósido e GD3, maduración de células B del miembro de la familia del receptor de TNF (BCMA), antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAcSer/Thr)), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor huérfano tipo tirosina quinasa 1 (ROR1), tirosina quinasa 3 similar a Fms (FLT3), glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG72), CD38, CD44v6, carcinoembrionario antígeno (CEA), molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM), B7H3 (CD276), KIT (CD117), subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13, mesotelina, receptor alfa de interleucina 11 (IL-11Ra), antígeno de células madre de próstata (PSCA), proteasa serina 21, receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), antígeno de Lewis (Y), CD24, receptor beta del factor de

- crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta), antígeno embrionario 4 específico de la etapa (SSEA-4), CD20, receptor alfa de folato, HER2, HER3, mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), molécula de adhesión de células neurales (NCAM), prostasa, fosfatasa ácida prostática (PAP), factor de elongación 2 mutado (ELF2M), Efrina B2, proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP), receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (receptor IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX), subunidad del proteasoma (prosoma, macropaina), tipo Beta, 9 (LMP2), glicoproteína 100 (gp100), proteína de fusión de oncogén que consta de una región de grupo de punto de interrupción (BCR) y homólogo 1 del oncogén viral de la leucemia murina de Abelson (Abl) (bcr-abl), tirosinasa, receptor 2 de efrina tipo A (EphA2), fucosil GM1, molécula de adhesión de sialil Lewis (sLe), gangliósido GM3, transglutaminasa 5 (TGS5), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA), gangliósido o-acetil-GD2 (OAcGD2), receptor beta de folato, marcador endotelial tumoral 1 (TEM1/ CD248), marcador endotelial tumoral relacionado con 7 (TEM7R), claudina 6 (CLDN6), receptor de hormona estimulante de la tiroides (TSHR), receptor acoplado a proteína G clase C grupo 5, miembro D (GPRC5D), marco de lectura abierto 61 del cromosoma X (CXORF61), CD97, CD179a, linfoma quinasa anaplásico (ALK), ácido polisialílico, específico de placenta 1 (PLAC1), parte de hexasacárido de glicoceramida globoH (GloboH), antígeno de diferenciación de glándula mamaria (NY-BR-1), uroplaquina 2 (UPK2), Receptor celular 1 del virus de la hepatitis A (HAVCR1), adrenoceptor beta 3 (ADRB3), panexina 3 (PANX3), receptor acoplado a proteína G 20 (GPR20), complejo de antígeno linfocitario 6, locus K 9 (LY6K), receptor olfativo 51E2 (OR51 E2), proteína del marco de lectura alternativo gamma TCR (TARP), proteína del tumor de Wilms (WT1), antígeno 1 de cáncer/testículo (NY-ESO-1), antígeno 2 de cáncer/testículo (LAGE-1a), miembros de la familia MAGE (incluido MAGE -A1, MAGE-A3 y MAGE-A4), gen variante de translocación 6 de ETS, ubicado en el cromosoma 12p (ETV6-AML), proteína de esperma 17 (SPA17), familia de antígeno X, miembro 1A (XAGE1), célula de unión a angiopoyetina receptor de superficie 2 (Tie 2), antígeno 1 del cáncer de melanoma testicular (MAD-CT-1), antígeno 2 del cáncer de melanoma testicular (MAD-CT-2), antígeno 1 relacionado con Fos, proteína tumoral p53 (p53), p53 mutante, prosteína, sobreviviente, telomerasa, antígeno 1 del tumor del carcinoma de próstata, antígeno de melanoma reconocido por las células T 1, mutante del sarcoma de rata (Ras), transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), puntos de interrupción de la translocación del sarcoma, inhibidor de la apoptosis del melanoma (ML-IAP)), ERG (proteasa transmembrana, serina 2 (TMPRSS2) gen de fusión ETS), N-acetil glucosaminil-transferasa V (NA17), proteína de caja emparejada Pax-3 (PAX3), receptor de andrógenos, ciclina B1, mielocitomatosis viral aviar v-myc homólogo derivado del oncogén neuroblastoma (MYCN), miembro C de la familia homólogo de Ras (RhoC), proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2), citocromo P450 1B1 (CYP1B1), factor de unión a CCCTC (proteína de dedo de zinc), carcinoma de células escamosas Antígeno reconocido por las células T 3 (SART3), proteína de caja emparejada Pax-5 (PAX5), proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES1), proteína tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK), proteína de anclaje de quinasa A 4 (AKAP-4), sarcoma sinovial, punto de interrupción X 2 (SSX2), receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE-1), renal ubicuo 1 (RU1), renal ubicuo 2 (RU2), leguminosa, virus del papiloma humano E6 (VPH E6), virus del papiloma humano E7 (HPV E7), carboxil esterasa intestinal, proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2), CD79a, CD79b, CD72, receptor 1 similar a inmunoglobulina asociado a leucocitos (LAIR1), fragmento Fc del receptor de IgA (FCAR o CD89), miembro 2 de la subfamilia A del receptor similar a inmunoglobulina leucocitaria (LILRA2), miembro f de la familia similar a una molécula CD300 (CD300LF), miembro A de la familia 12 del dominio de lectina tipo C (CLEC12A), antígeno 2 de células estromales de médula ósea (BST2), Módulo similar a EGF que contiene receptor de hormona similar a mucina tipo 2 (EMR2), antígeno de linfocitos 75 (LY75), Glypican-3 (GPC3), receptor tipo Fc 5 (FCRL5), MUC16, 5T4, 8H9, integrina $\alpha v \beta 6$, integrina $\alpha v \beta 6$, alfafetoproteína (AFP), B7-H6, ca-125, CA9, CD44, CD44v7/8, CD52, E-cadherina, EMA (antígeno de membrana epitelial), glicoproteína epitelial-2 (EGP-2), glicoproteína epitelial- 40 (EGP-40), ErbB4, antígeno de tumor epitelial (ETA), proteína de unión a folato (FBP), receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR), cadena ligera k, molécula de adhesión celular L1, MUC18, NKG2D, antígeno oncofetal (h5T4), antígeno tumoral/testicular 1B, GAGE, GAGE-1, BAGE, SCP-1, CTZ9, SAGE, CAGE, CT10, MART-1, polipéptido tipo lambda 1 de inmunoglobulina (IGLL1), proteína de unión al antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), antígeno de la cápside viral (VCA), antígeno temprano (EA), antígeno nuclear del VEB (EBNA), HHV-6 p41 antígeno temprano, antígeno latente HHV-6B U94, antígeno tardío HHV-6B p98, antígeno de citomegalovirus (CMV), antígeno T grande, antígeno T pequeño, antígeno de adenovirus, antígeno del virus respiratorio sincitial (VSR), hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), antígeno de parainfluenza tipo 1, antígeno de parainfluenza tipo 2, antígeno de parainfluenza tipo 3, antígeno de parainfluenza tipo 4, antígeno del metapneumovirus humano (HMPV), antígeno central del virus de la hepatitis C (VHC), antígeno p24 del VIH, virus linfotrófico de células T humanas (HTLV-1) antígeno, antígeno T pequeño del virus del polio de células de Merkel, antígeno T grande del virus del polio de células de Merkel, antígeno nuclear lítico del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV) y antígeno nuclear latente del KSHV.
15. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 12, o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 11 o 13, en la que el vehículo de transferencia comprende un resto de dirección conectado operativamente al vehículo de transferencia.
16. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y 12, o una composición farmacéutica para uso de la reivindicación 11 o 13, en la que el lípido ionizable es:

5

10

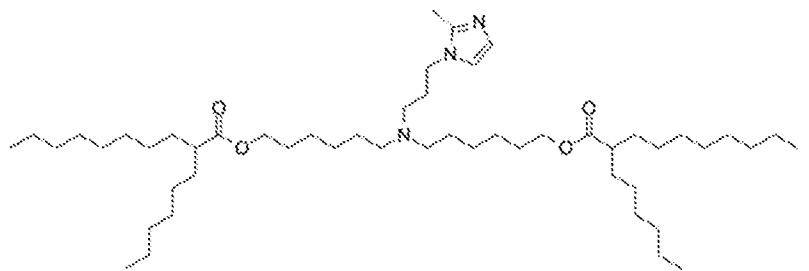


15

17. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 12, o una composición farmacéutica para uso de la reivindicación 11 o 13, en la que el lípido ionizable es:

20

25



18. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 o 7, en la que la secuencia IRES es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NOS: 1-72, 348-389 y 413-692.

30

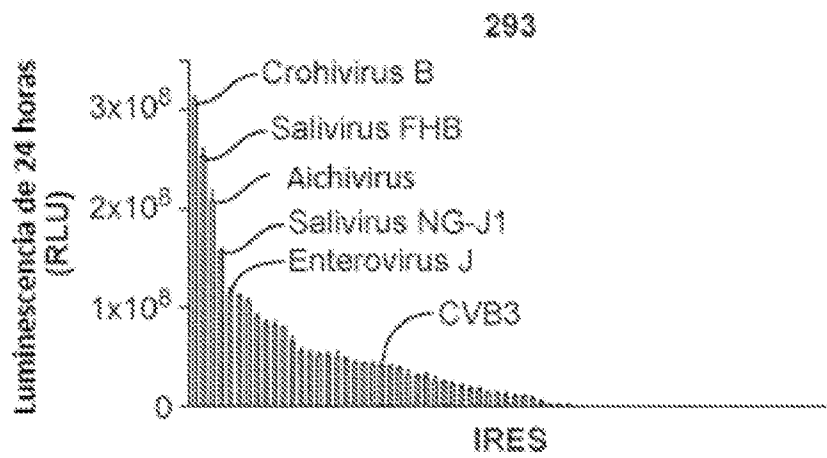


FIG. 1A

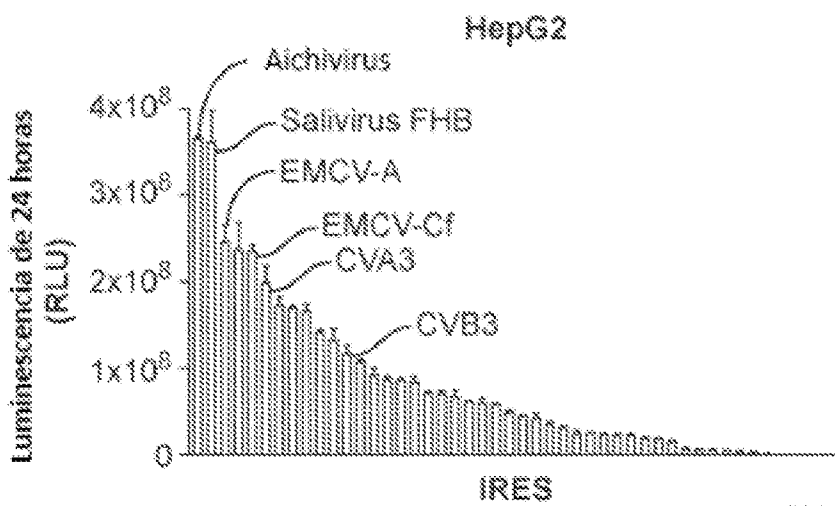


FIG. 1B

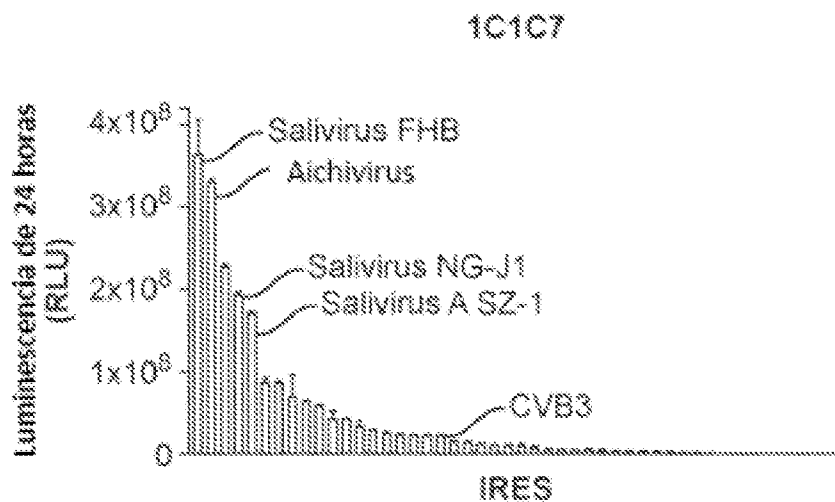


FIG. 1C

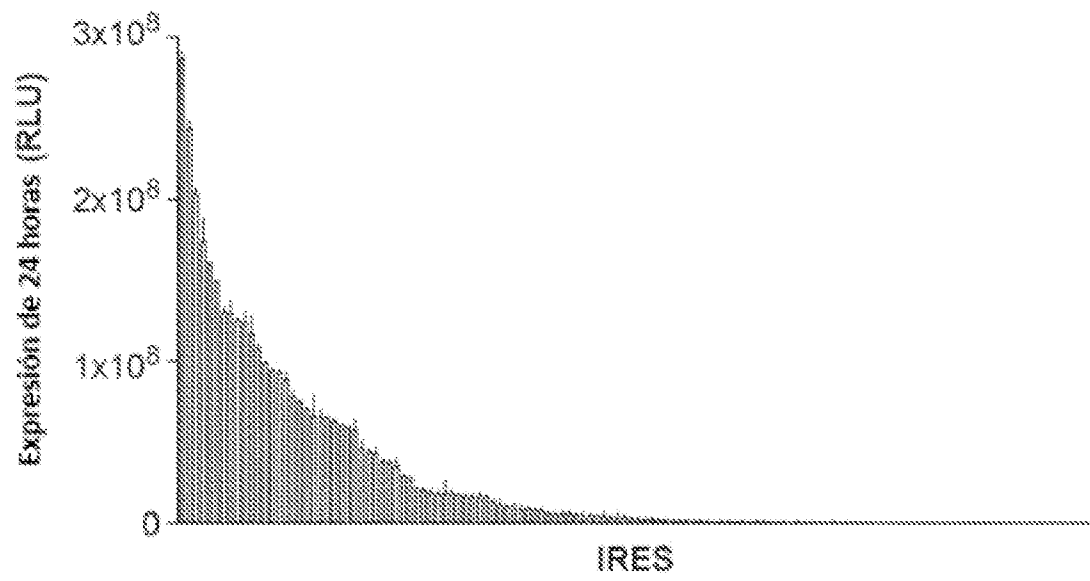


FIG. 1D

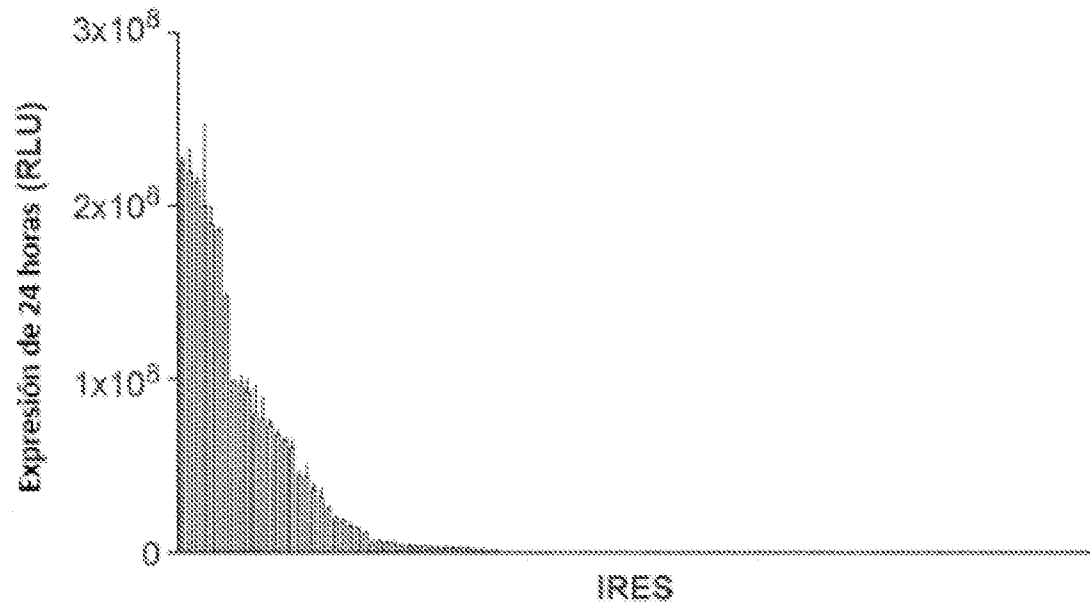


FIG. 1E

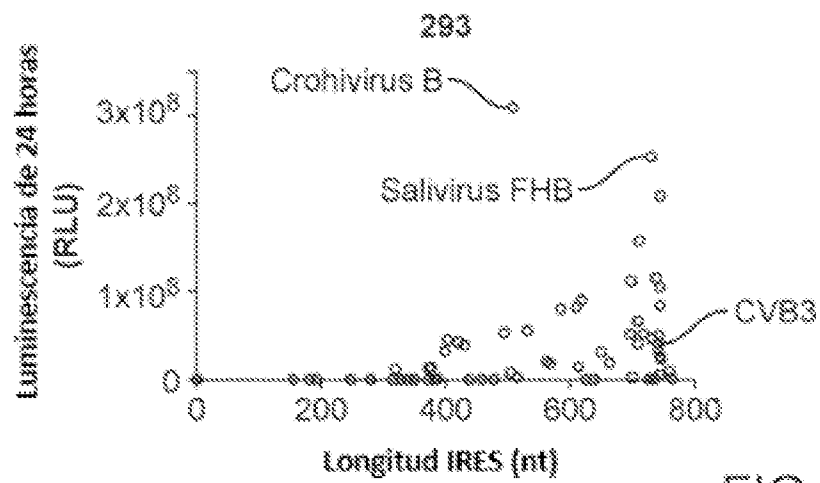


FIG. 2A

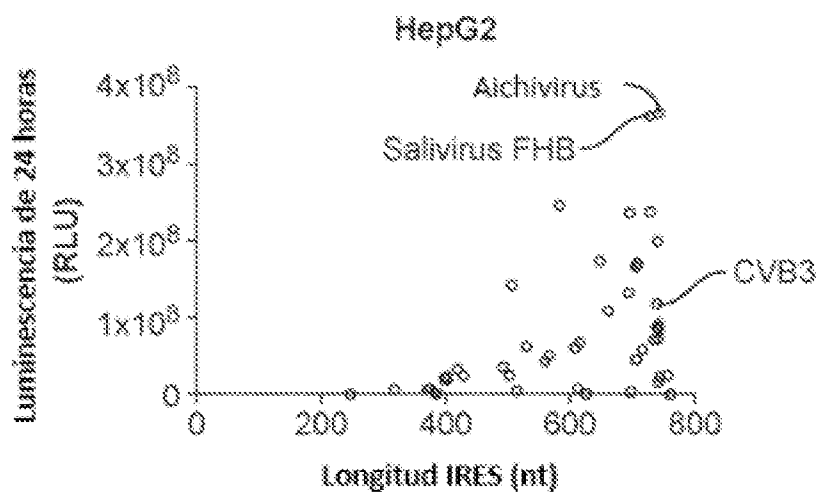


FIG. 2B

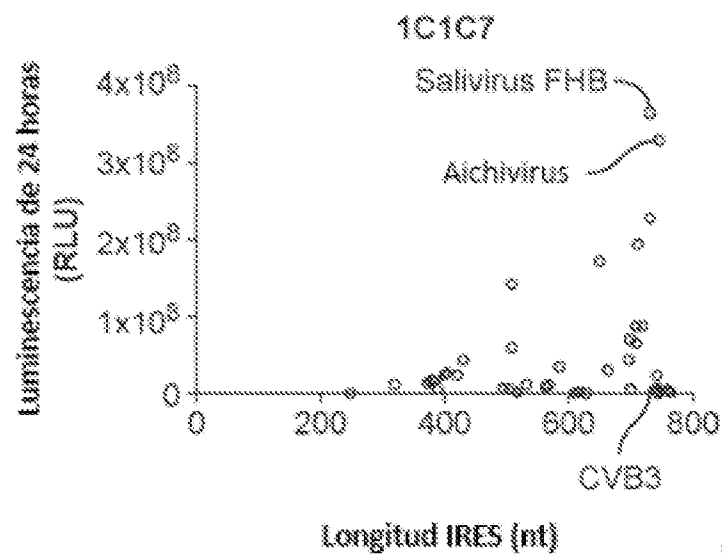


FIG. 2C

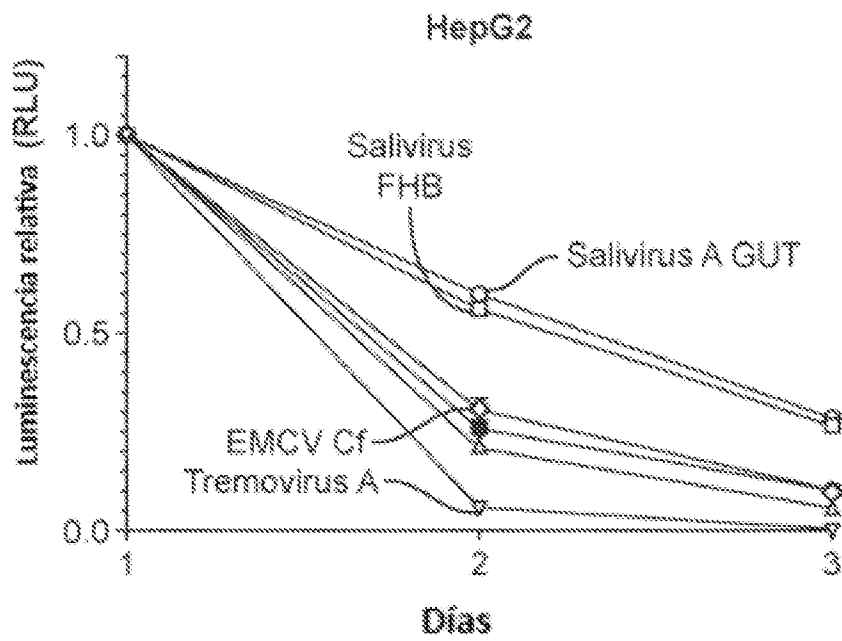


FIG. 3A

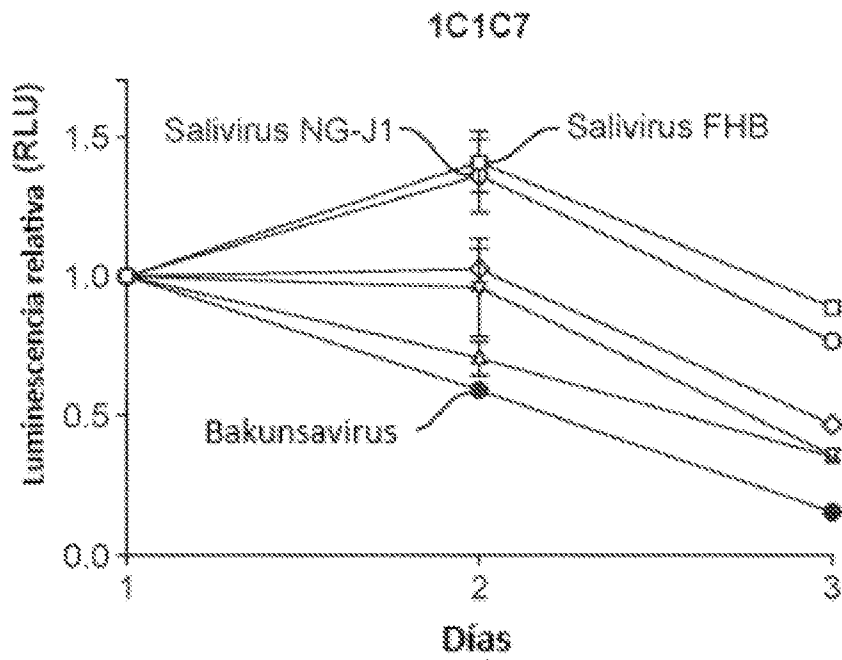


FIG. 3B

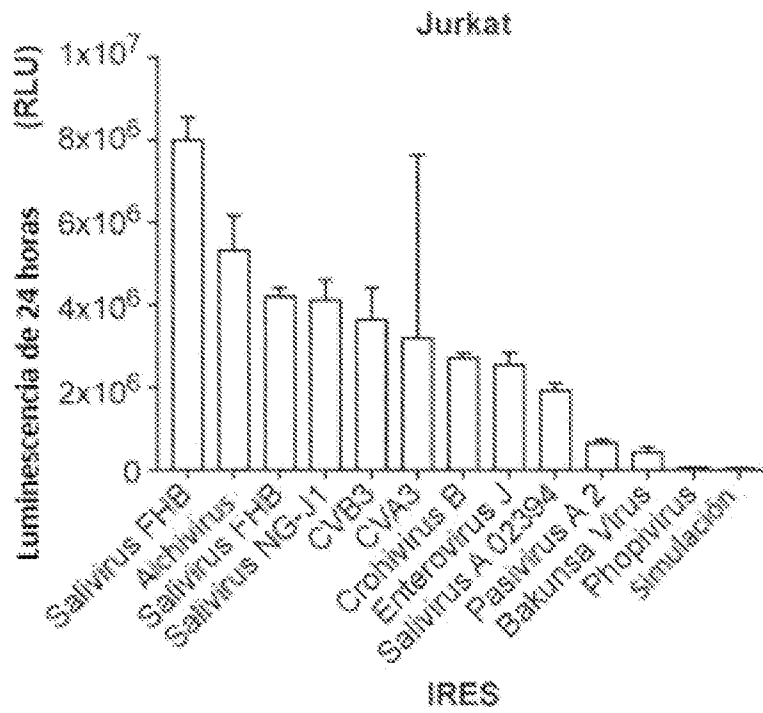


FIG. 4A

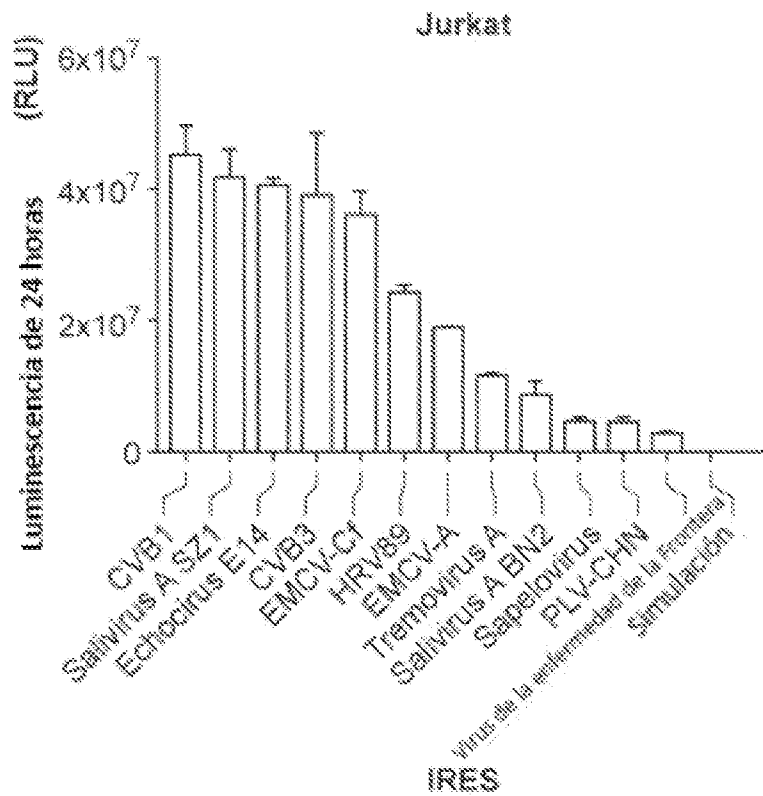


FIG. 4B

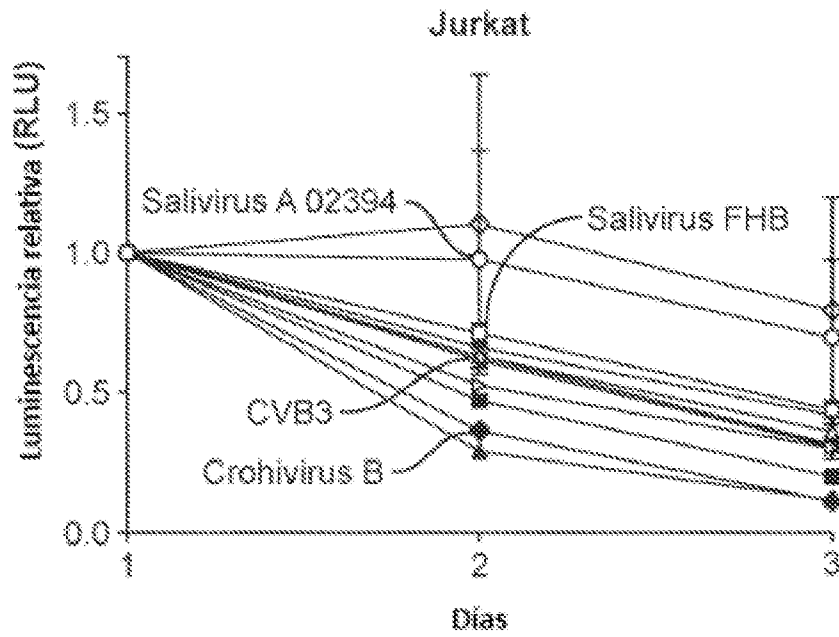


FIG. 5A

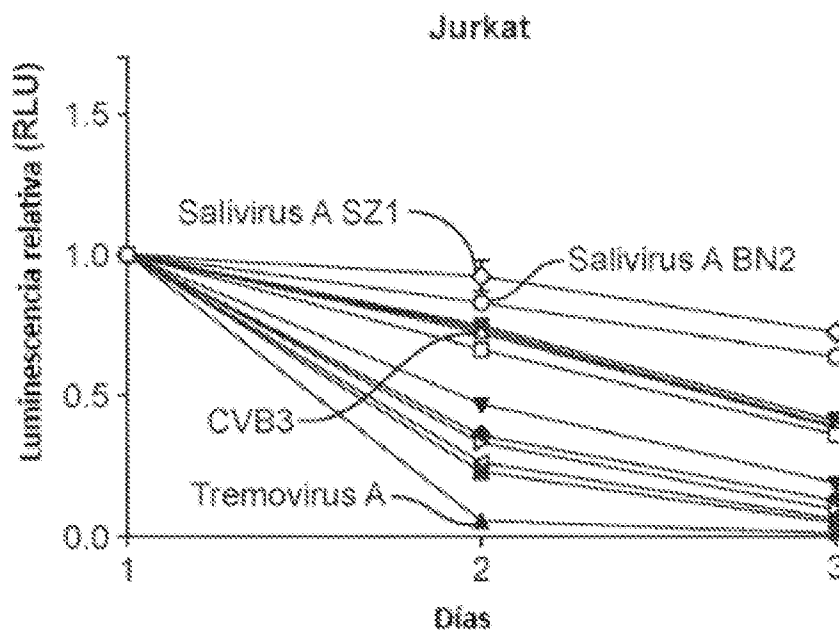


FIG. 5B

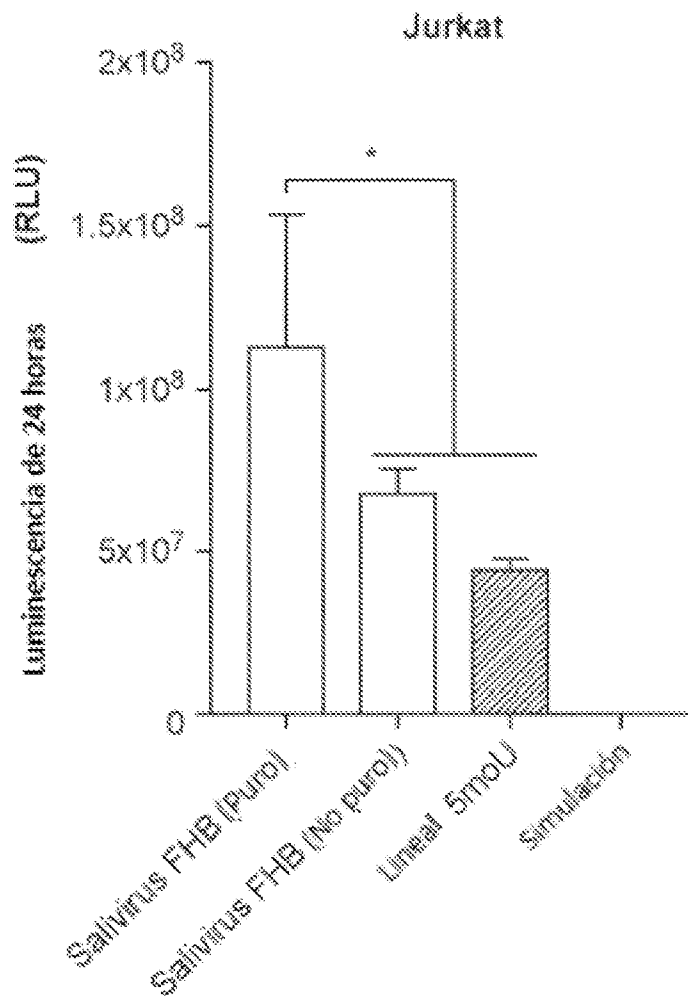


FIG. 6A

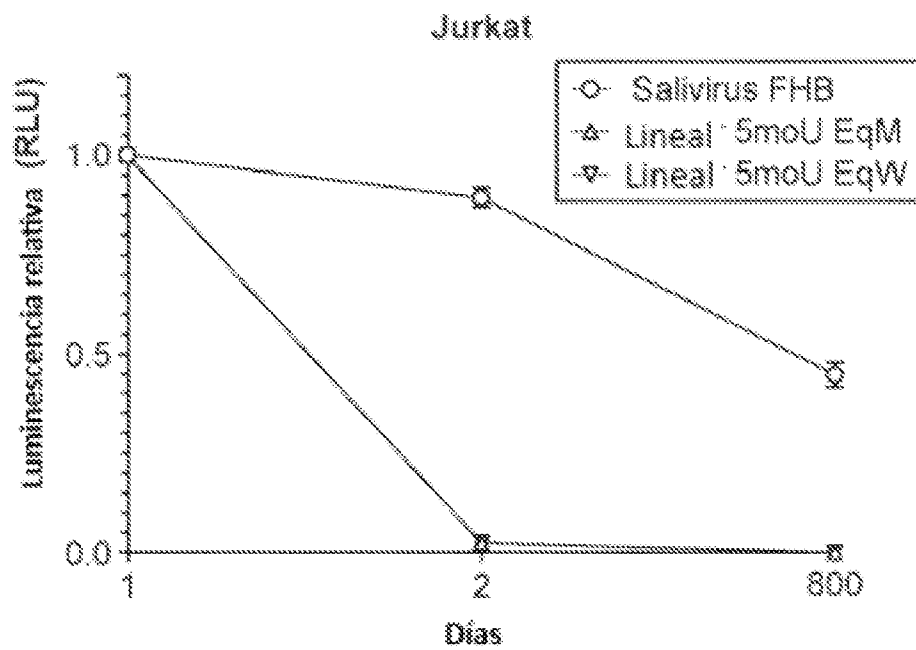


FIG. 6B

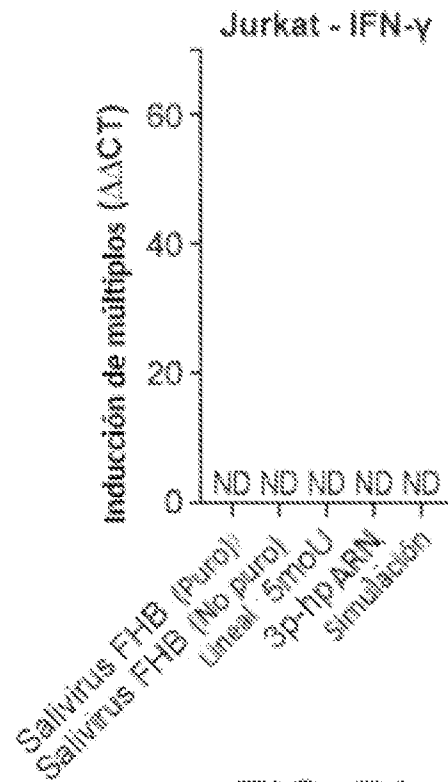


FIG. 7A

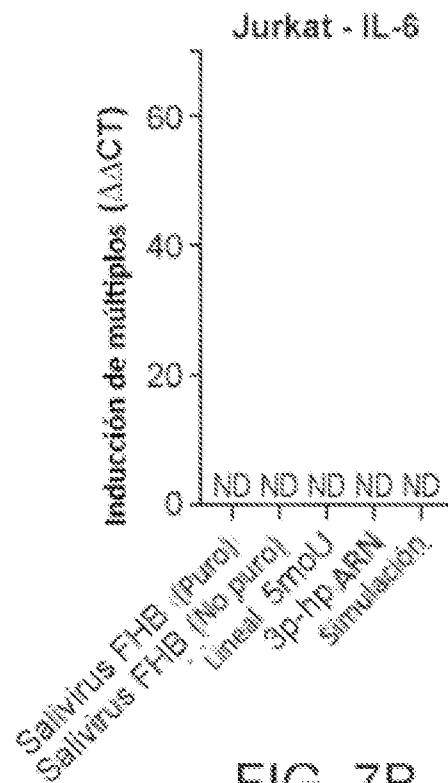


FIG. 7B

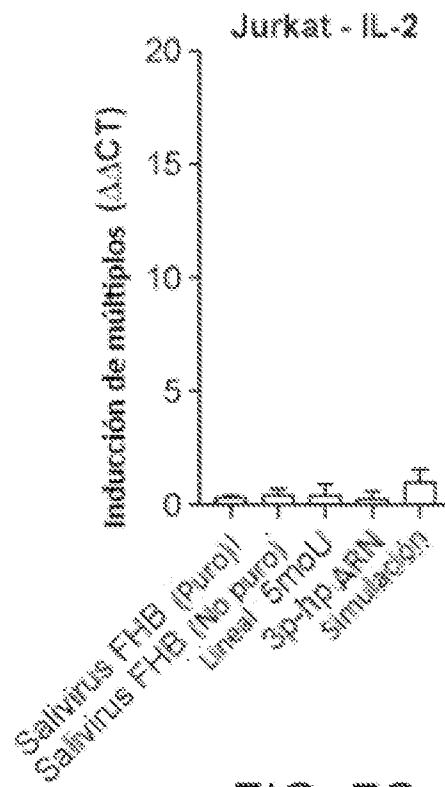


FIG. 7C

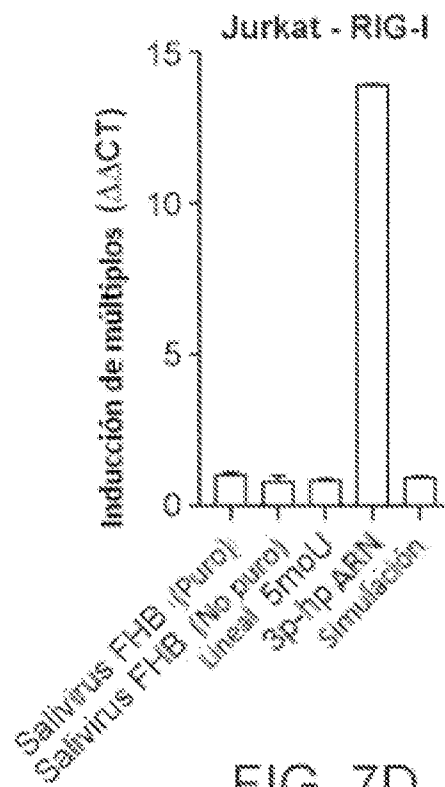


FIG. 7D

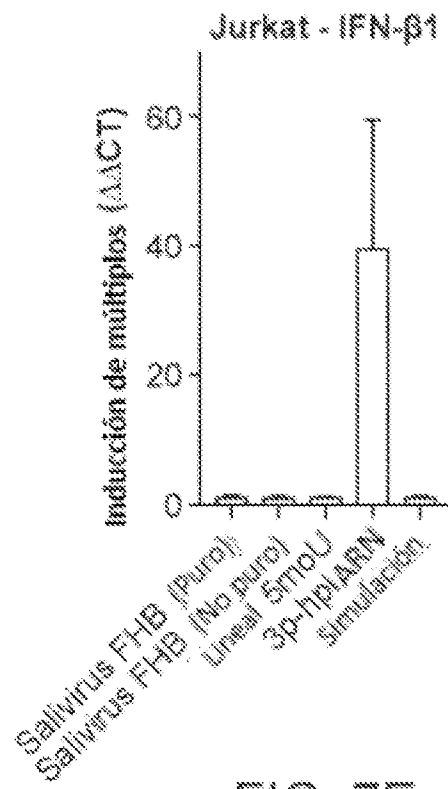


FIG. 7E

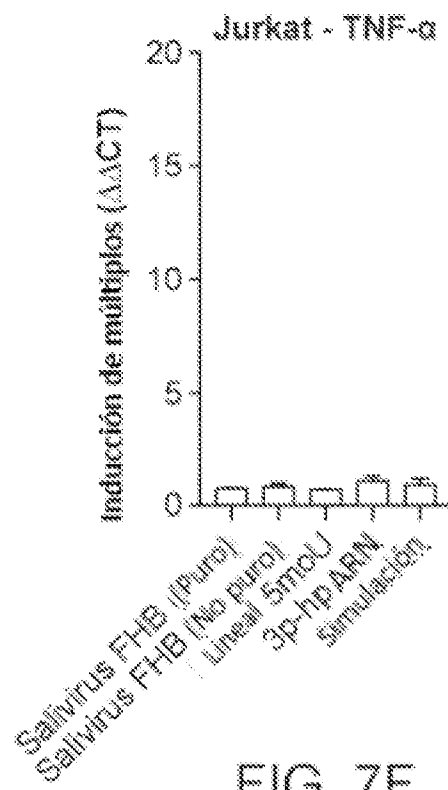


FIG. 7F

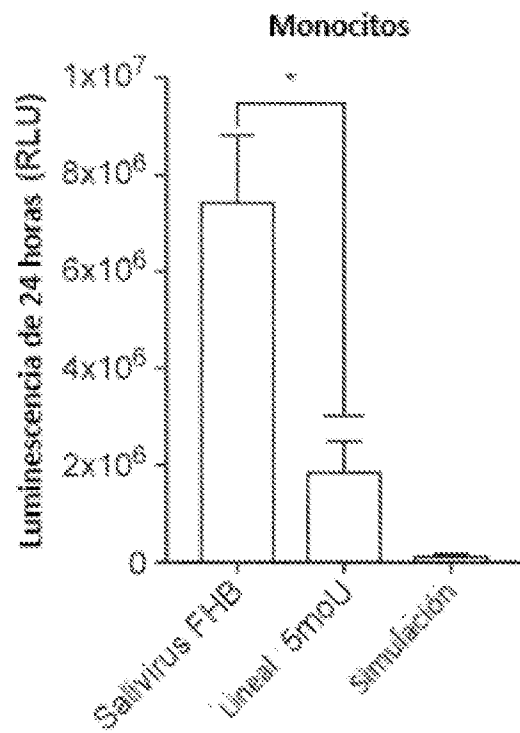


FIG. 8A

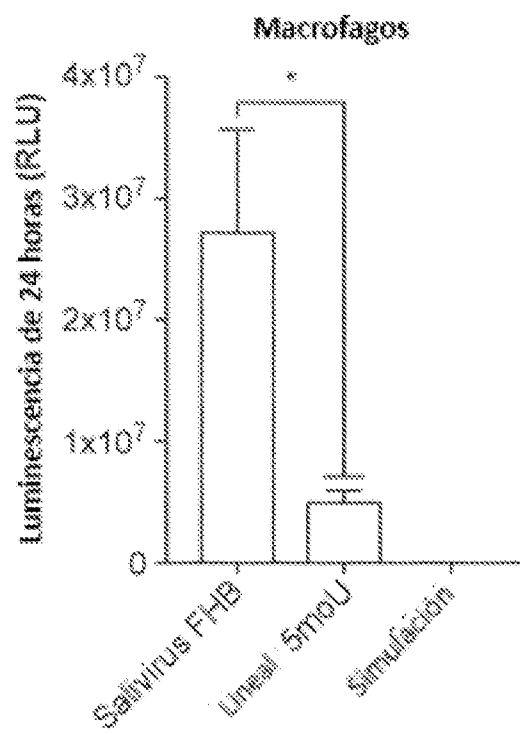


FIG. 8B

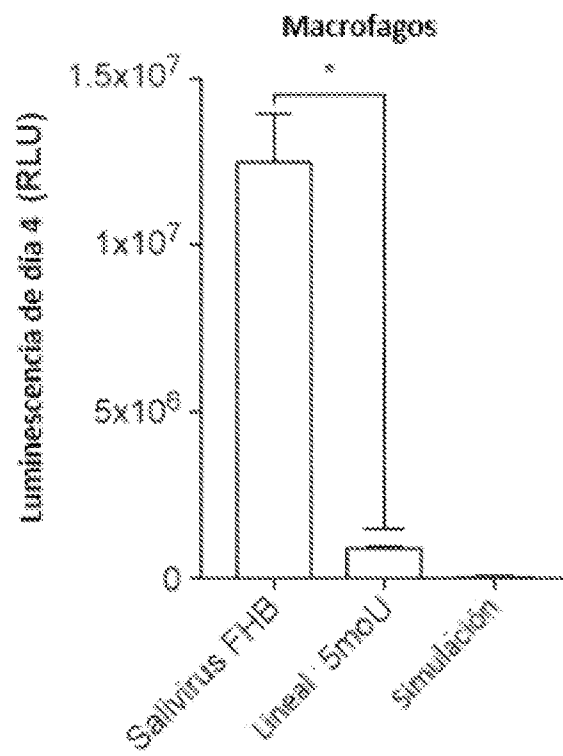


FIG. 8C

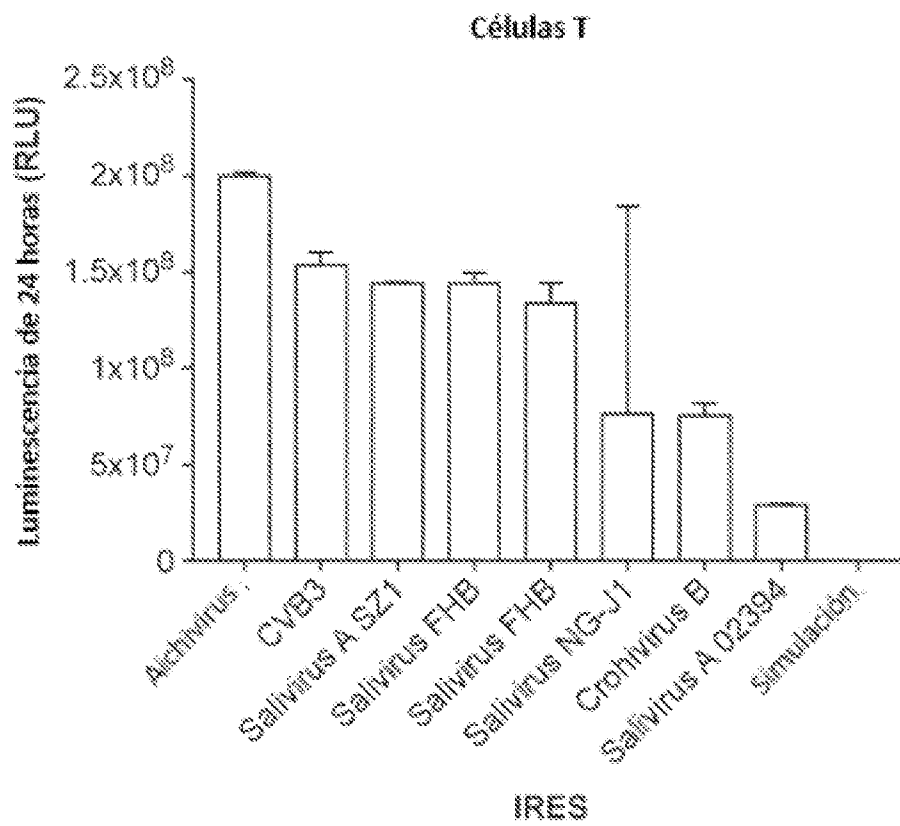


FIG. 9A

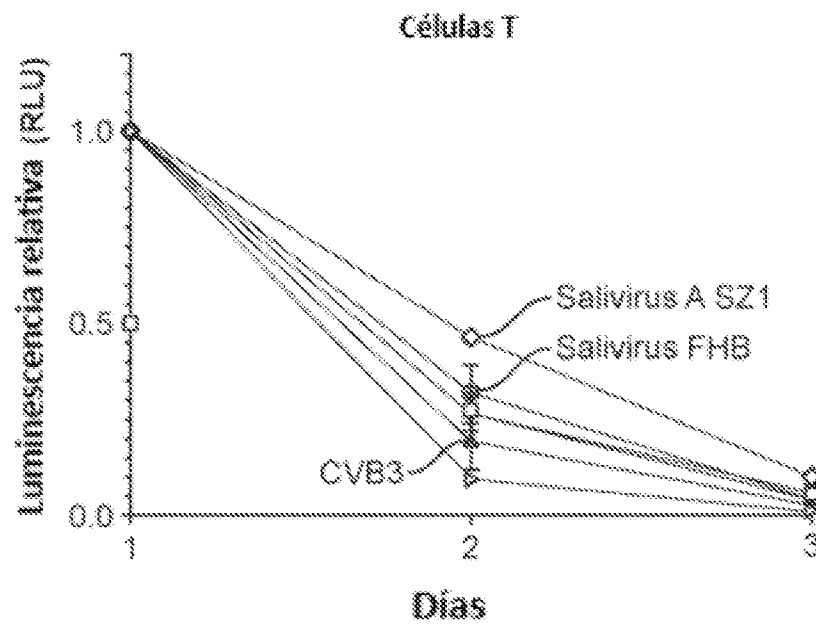


FIG. 9B

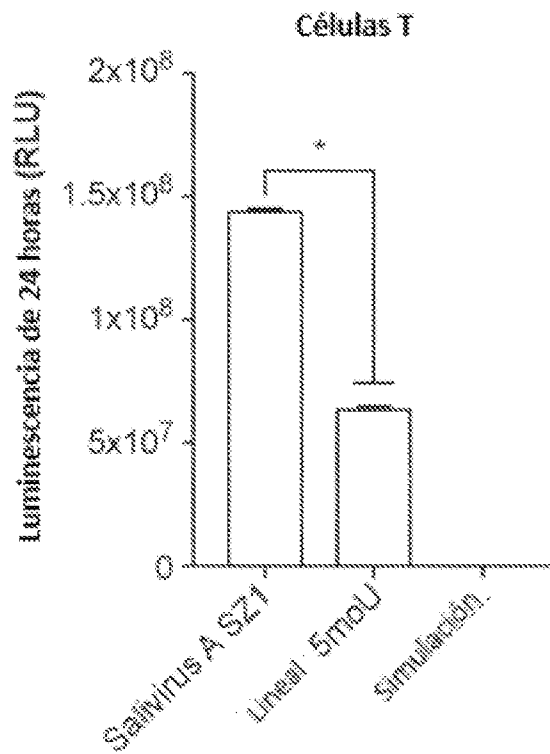


FIG. 10A

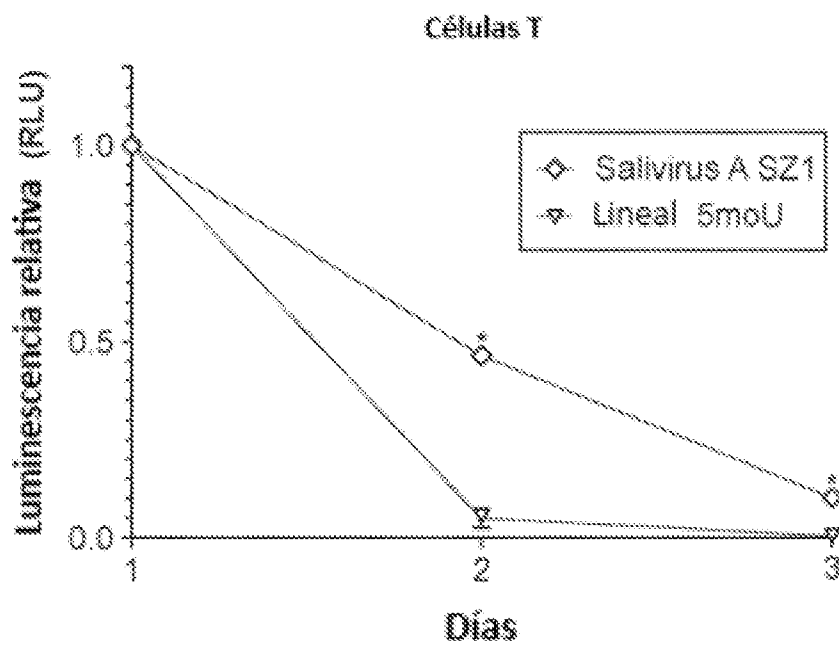


FIG. 10B

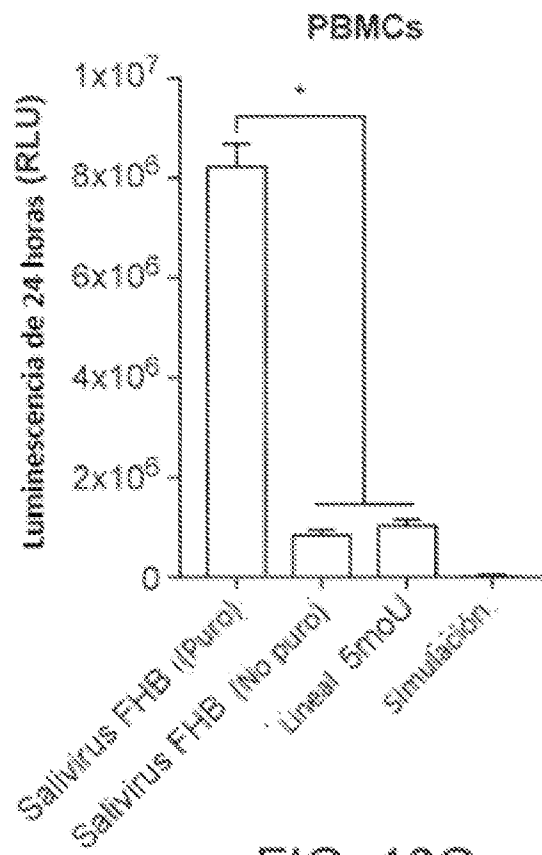


FIG. 10C

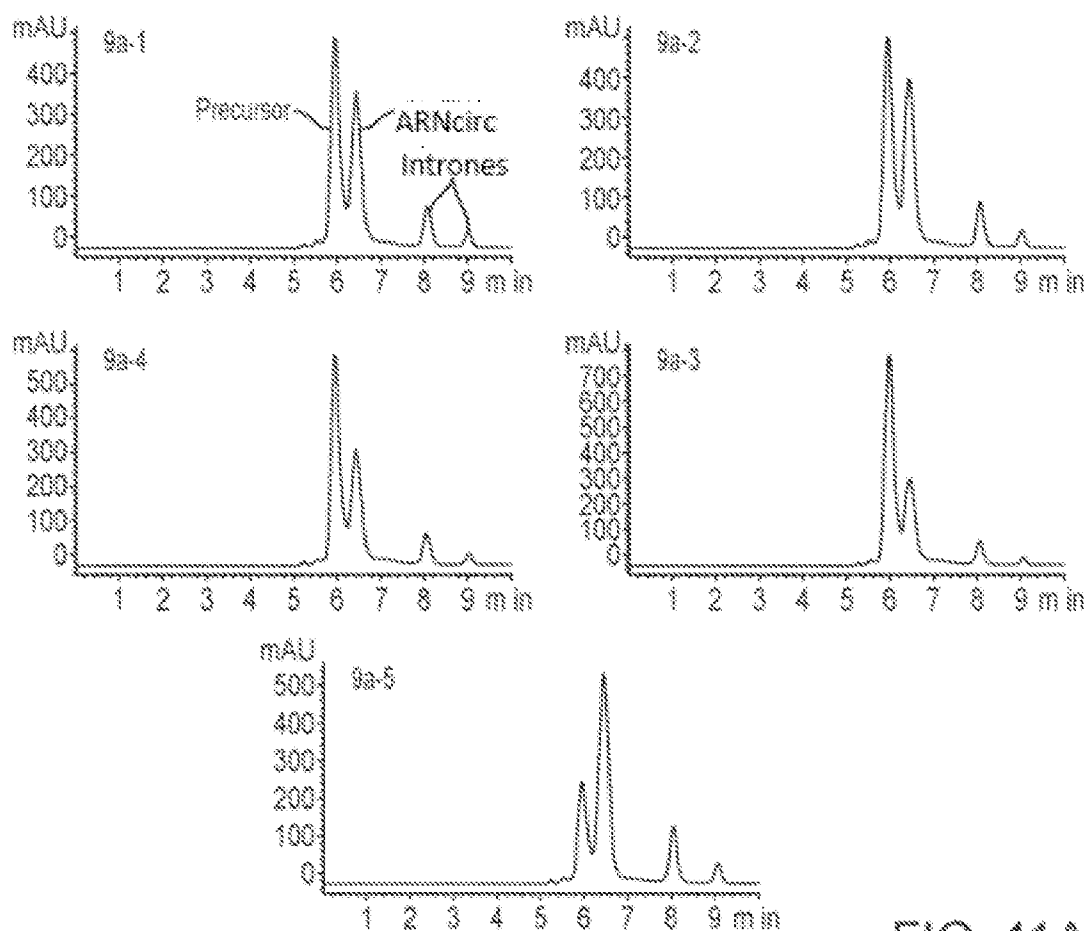


FIG. 11A

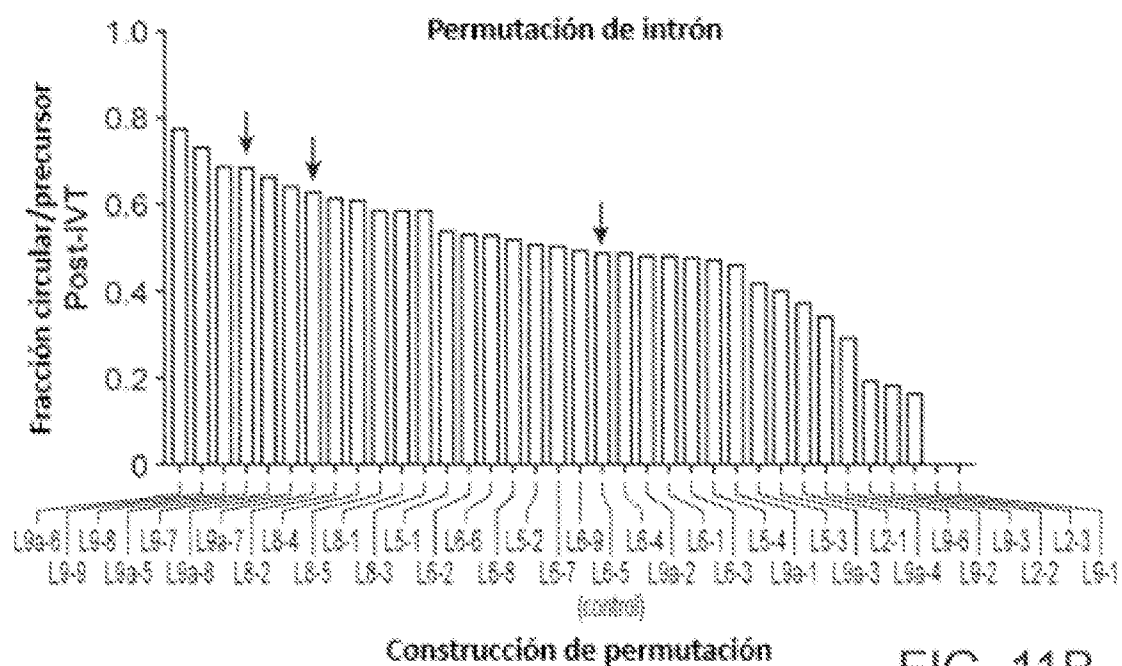


FIG. 11B

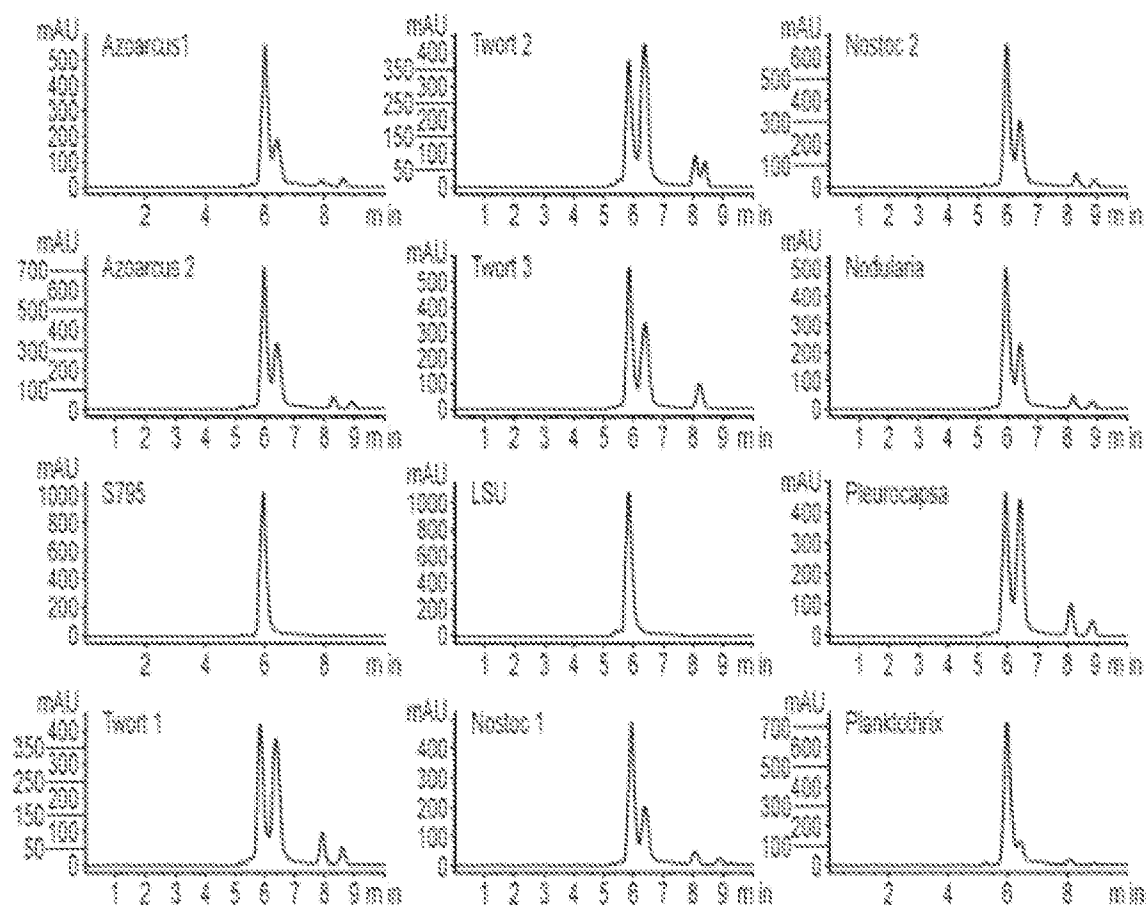


FIG. 12A

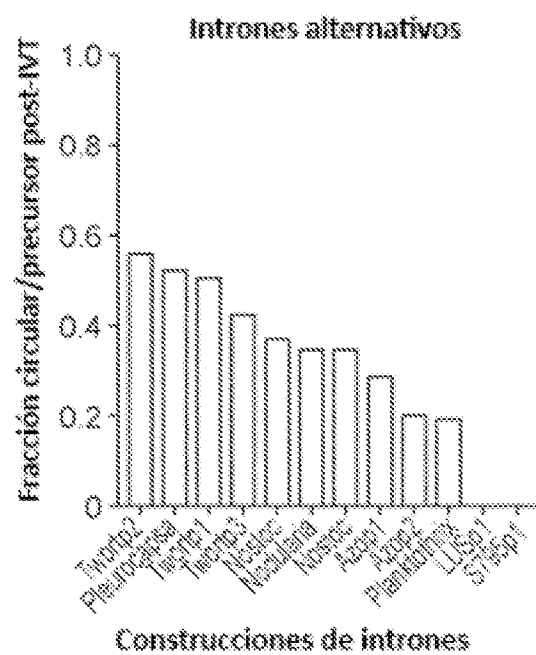


FIG. 12B

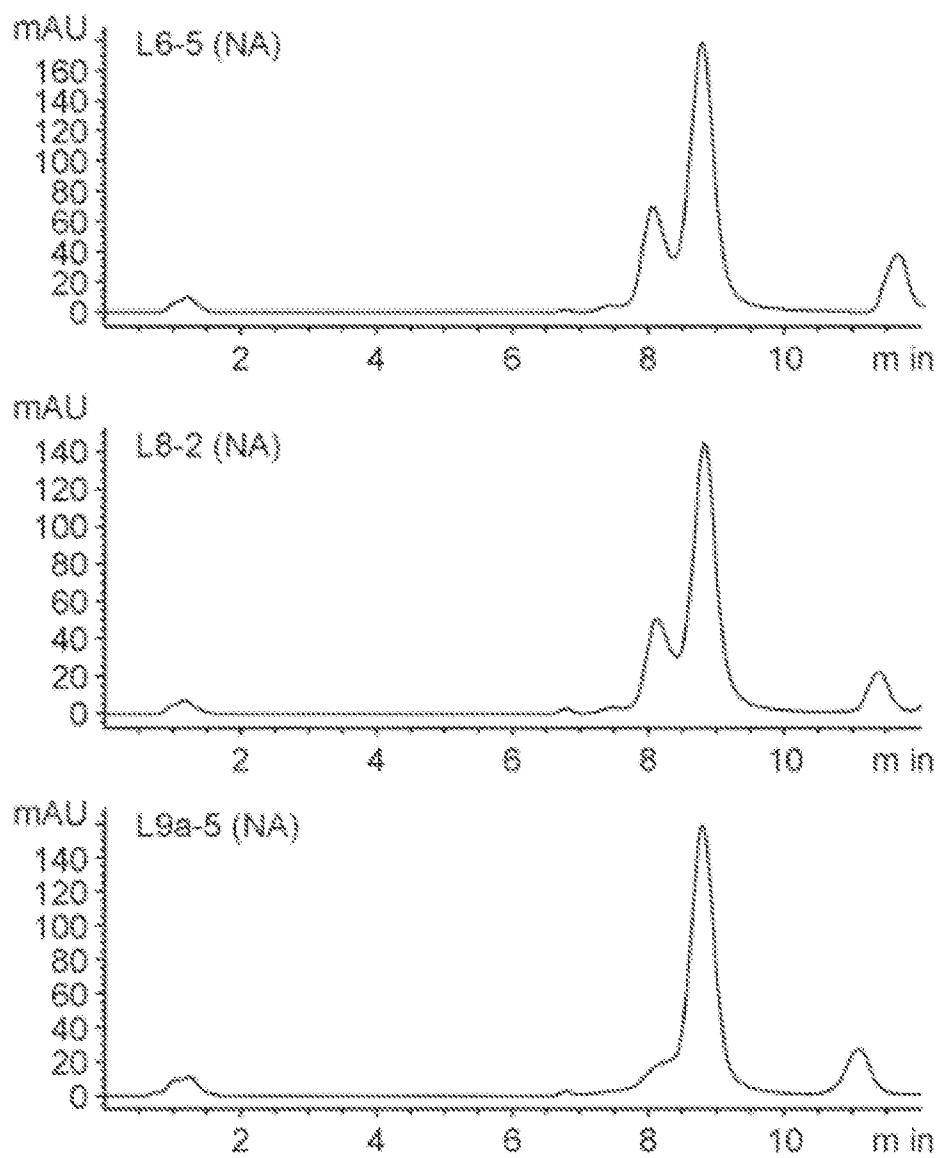


FIG. 13A

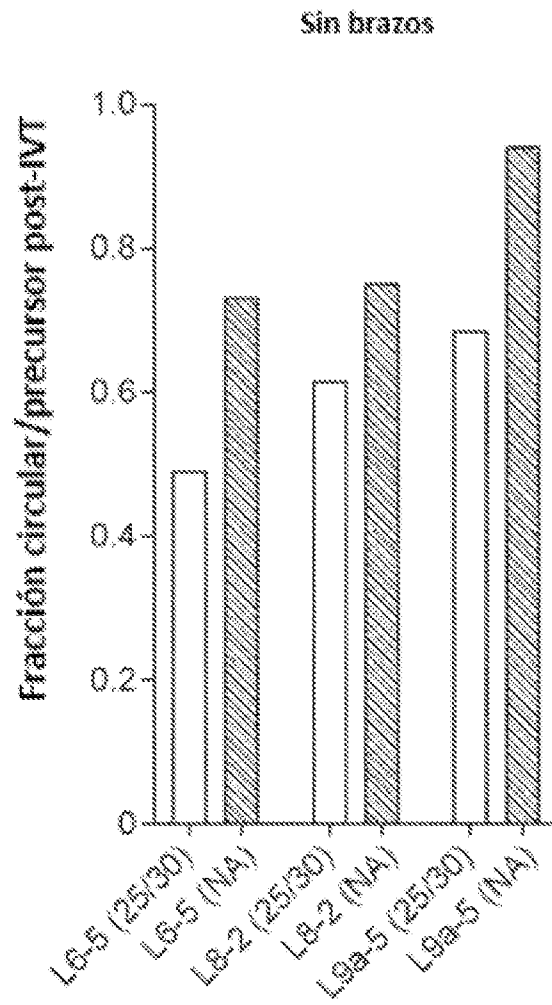


FIG. 13B

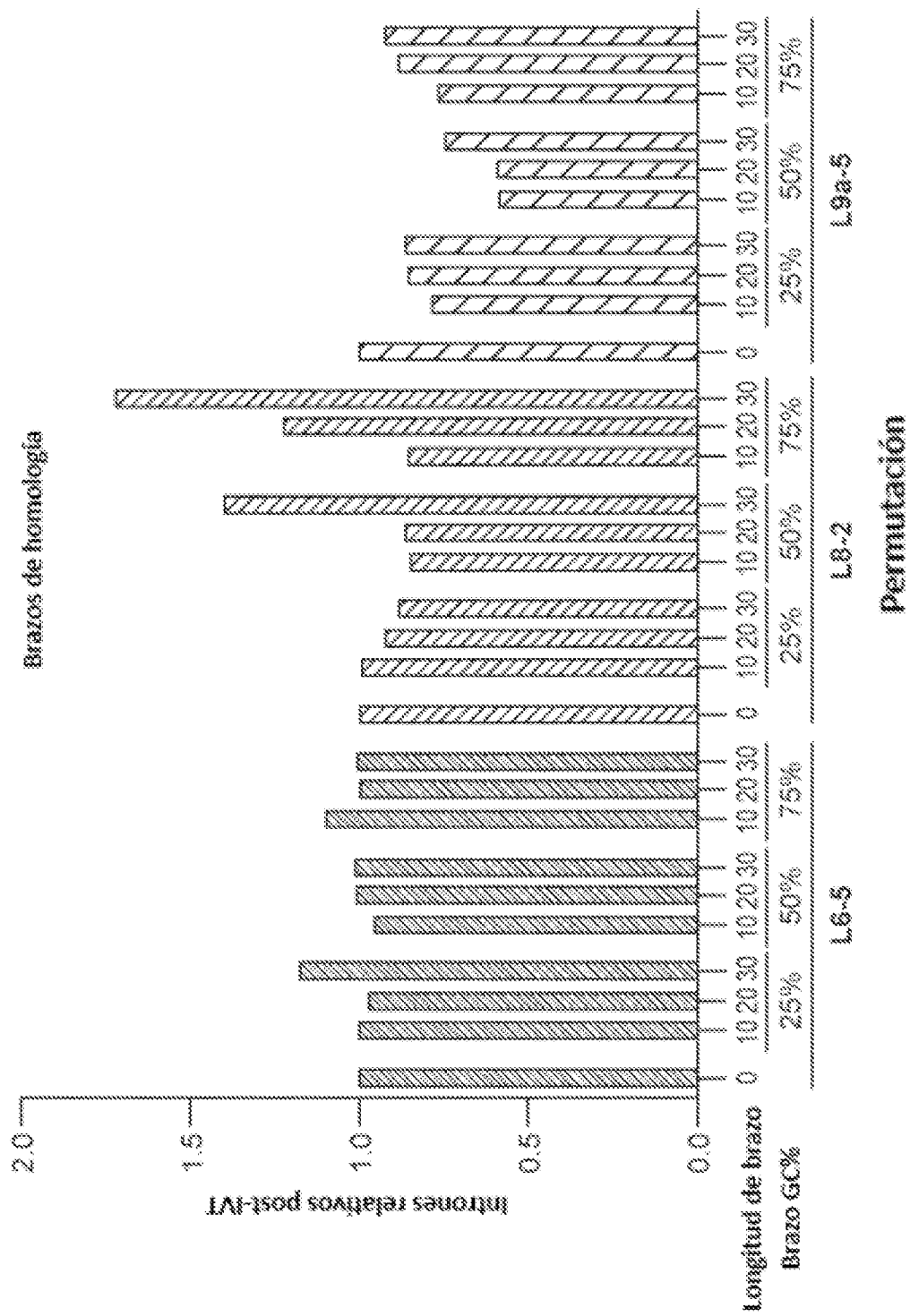


FIG. 14

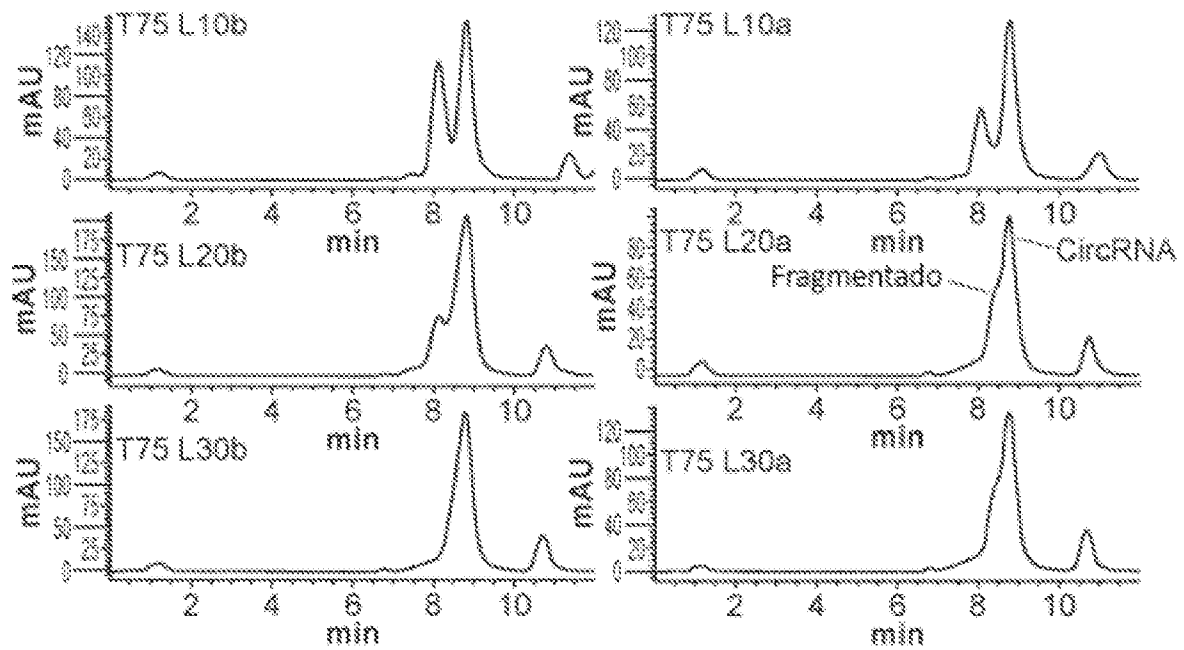


FIG. 15A

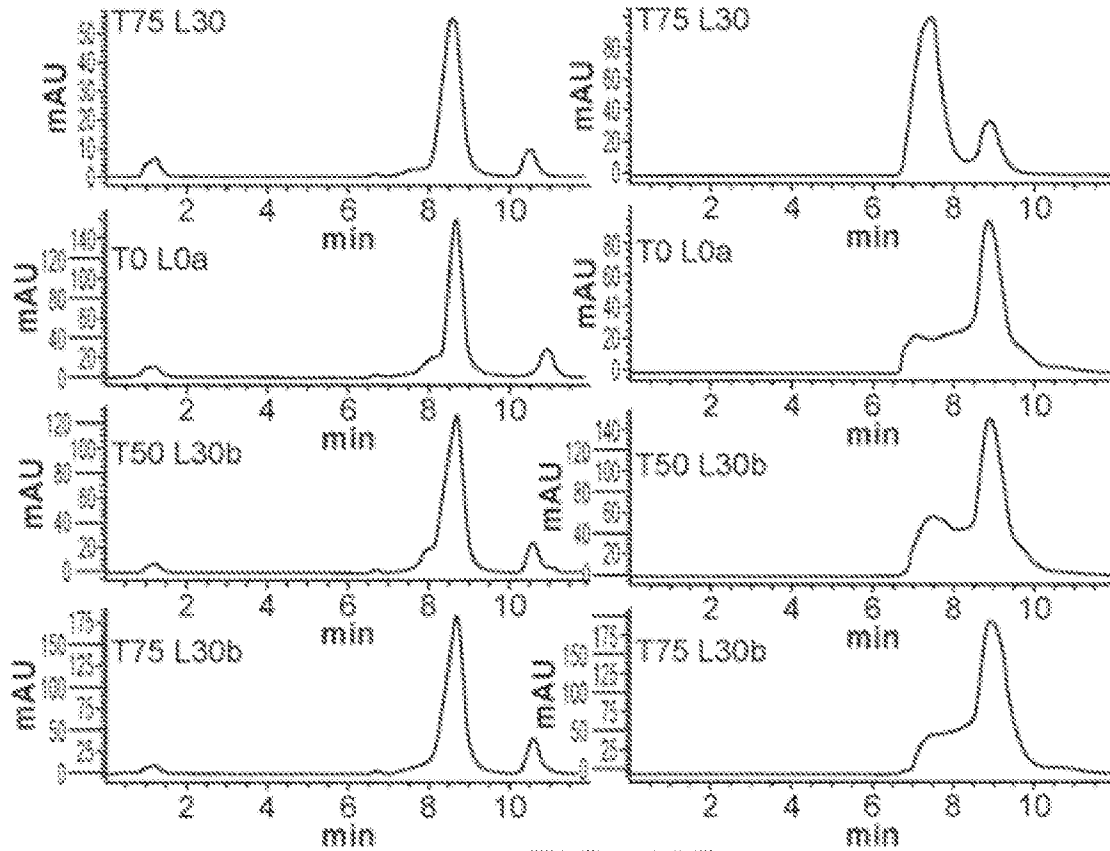


FIG. 15B

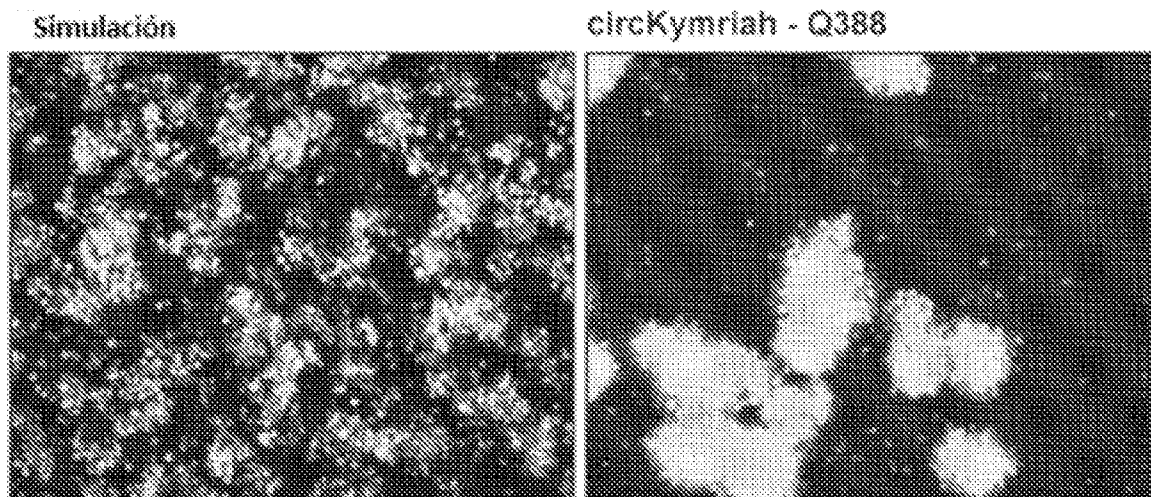


FIG. 16

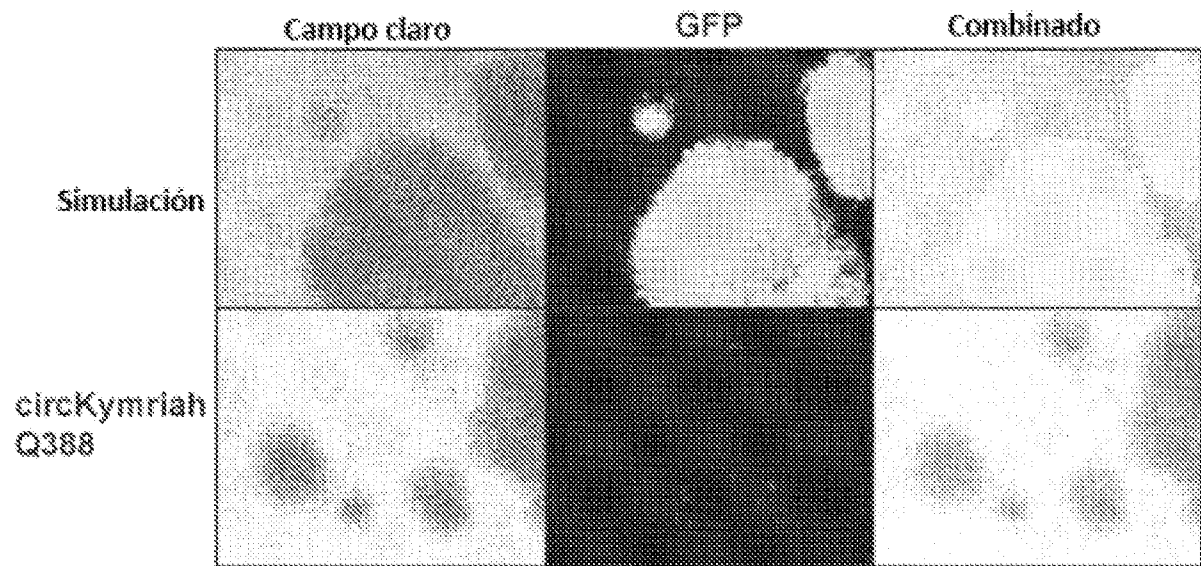


FIG. 17

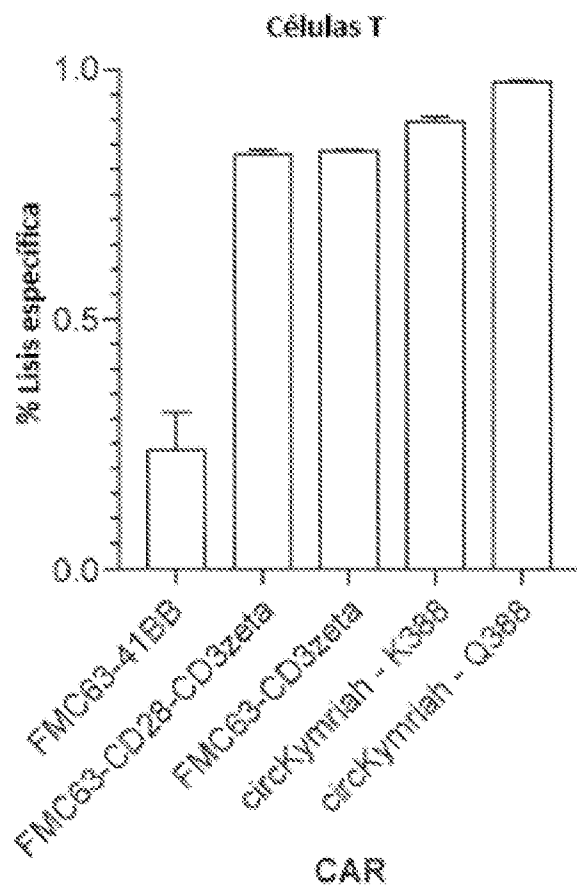


FIG. 18

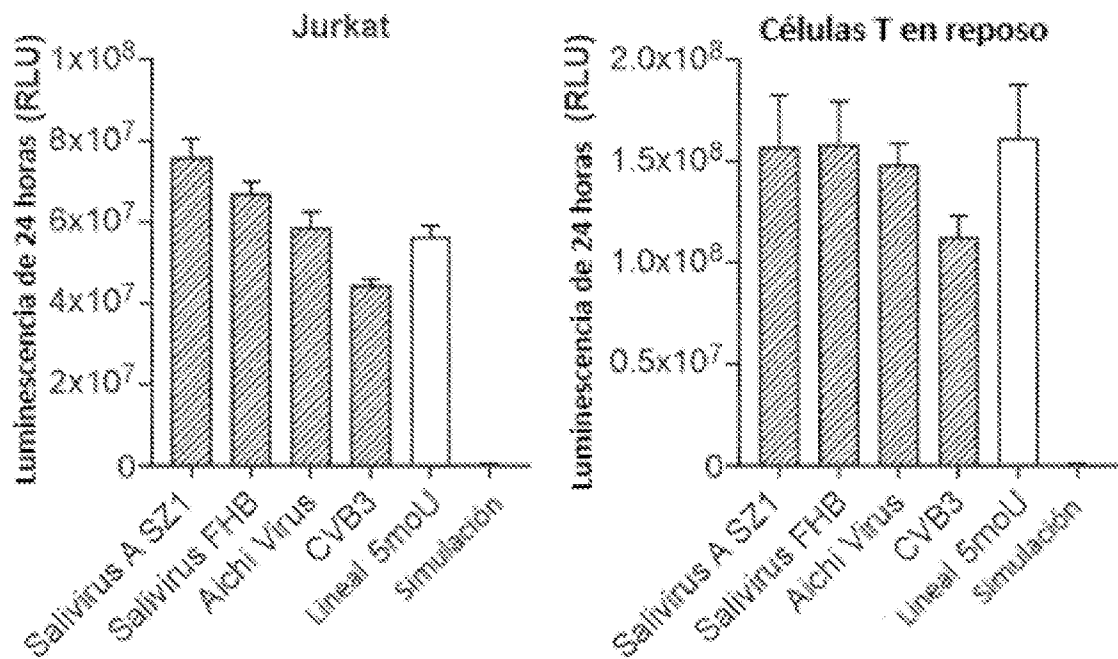


FIG. 19A

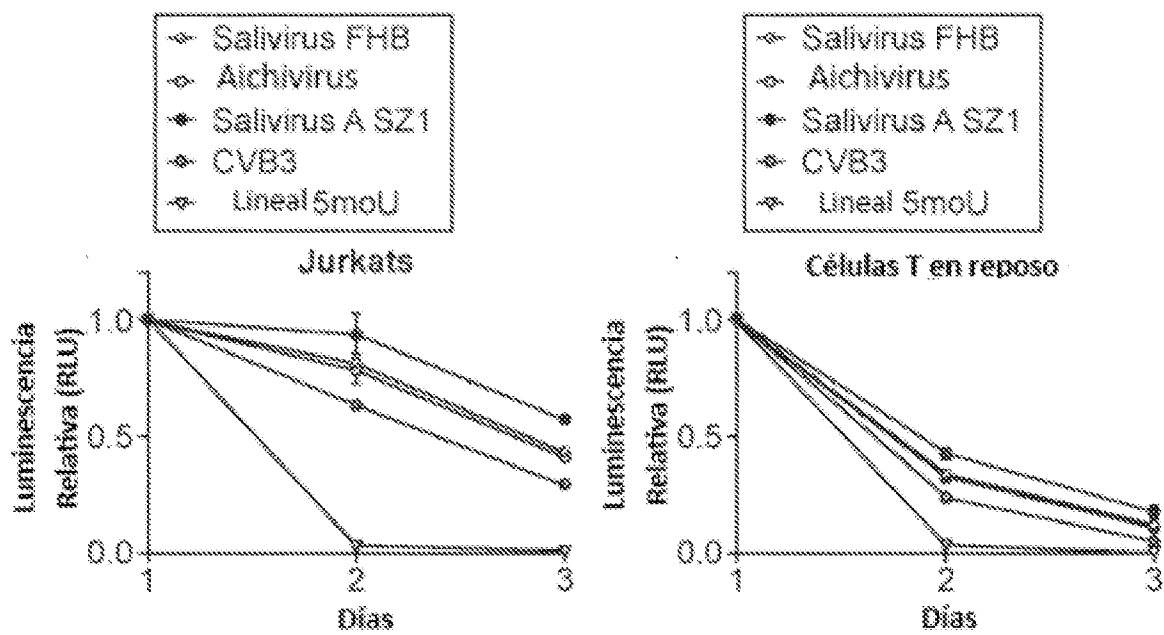


FIG. 19B

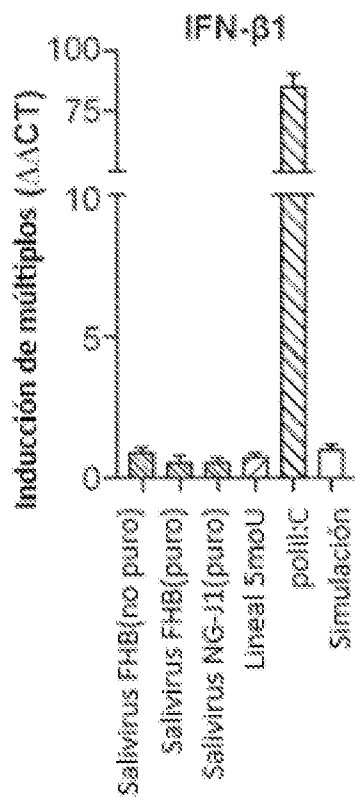


FIG. 20A

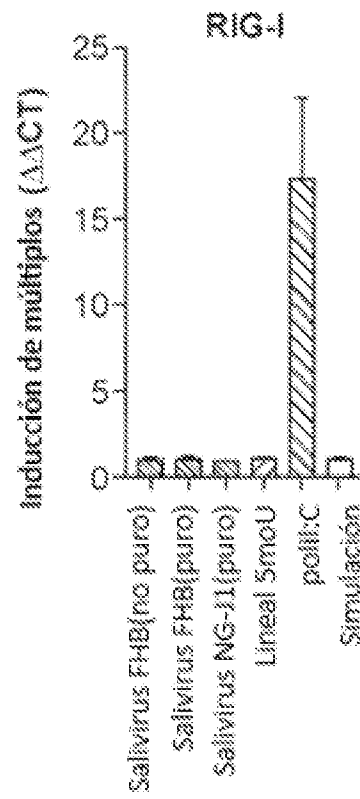


FIG. 20B

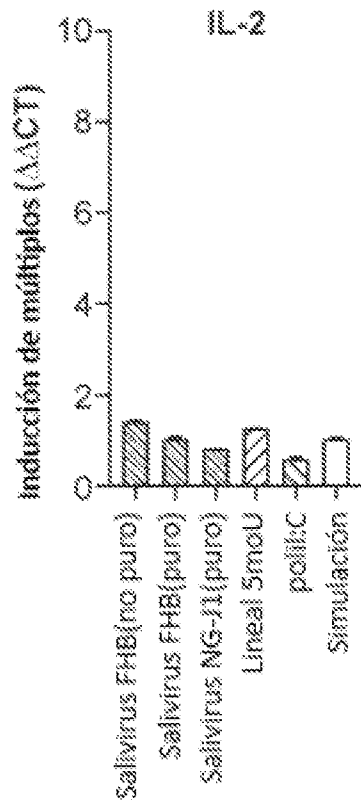


FIG. 20C

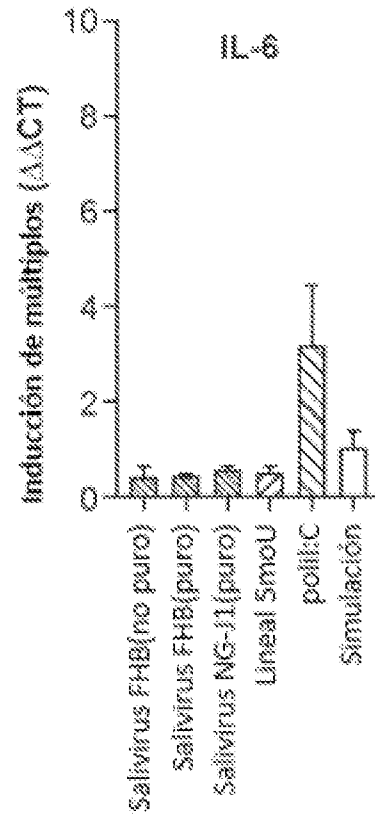


FIG. 20D

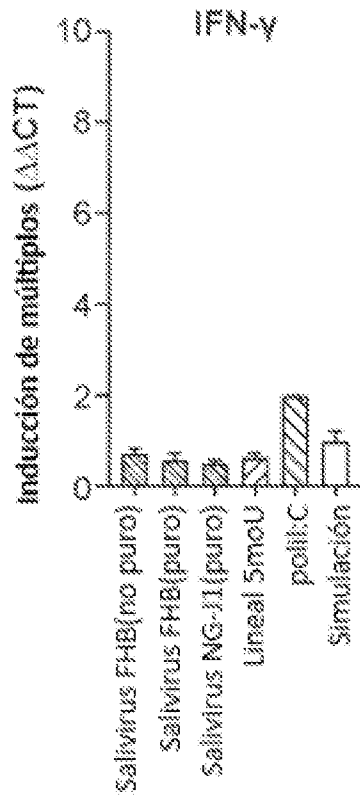


FIG. 20E

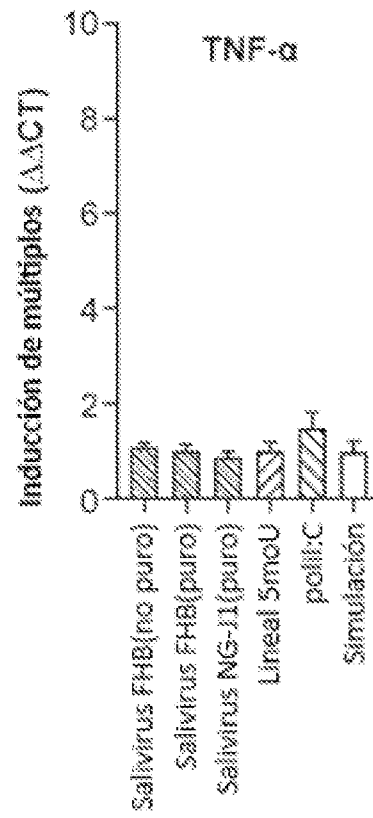


FIG. 20F

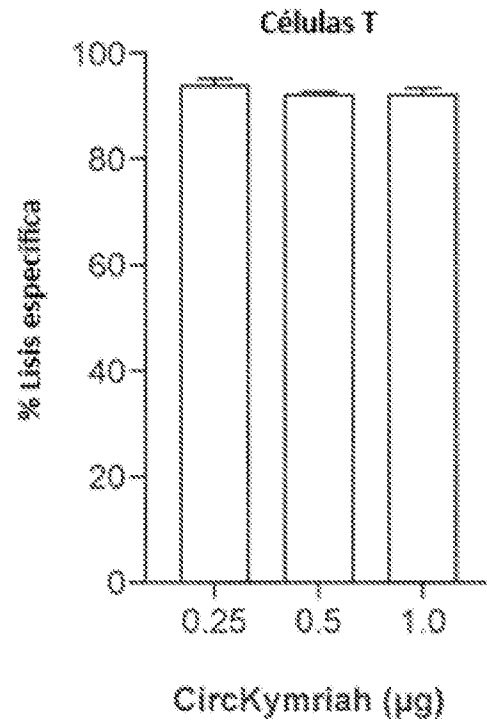


FIG. 21A

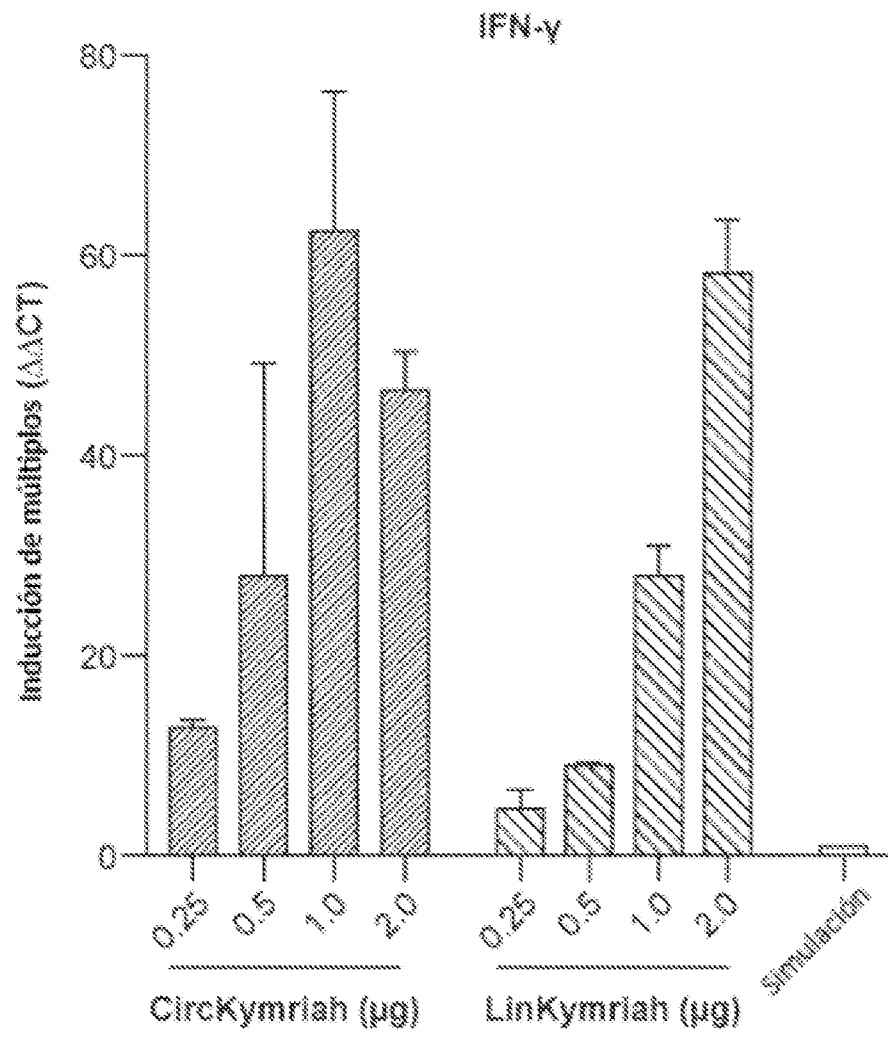


FIG. 21B

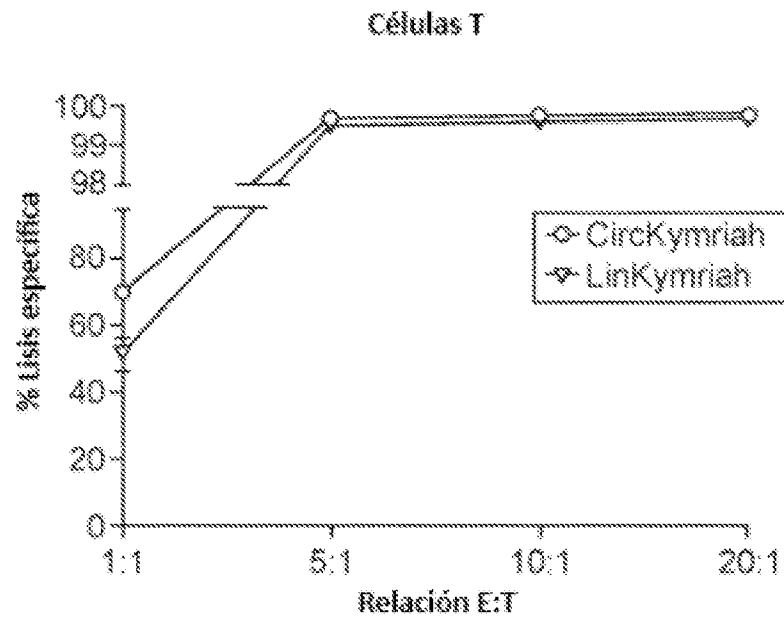


FIG. 22A

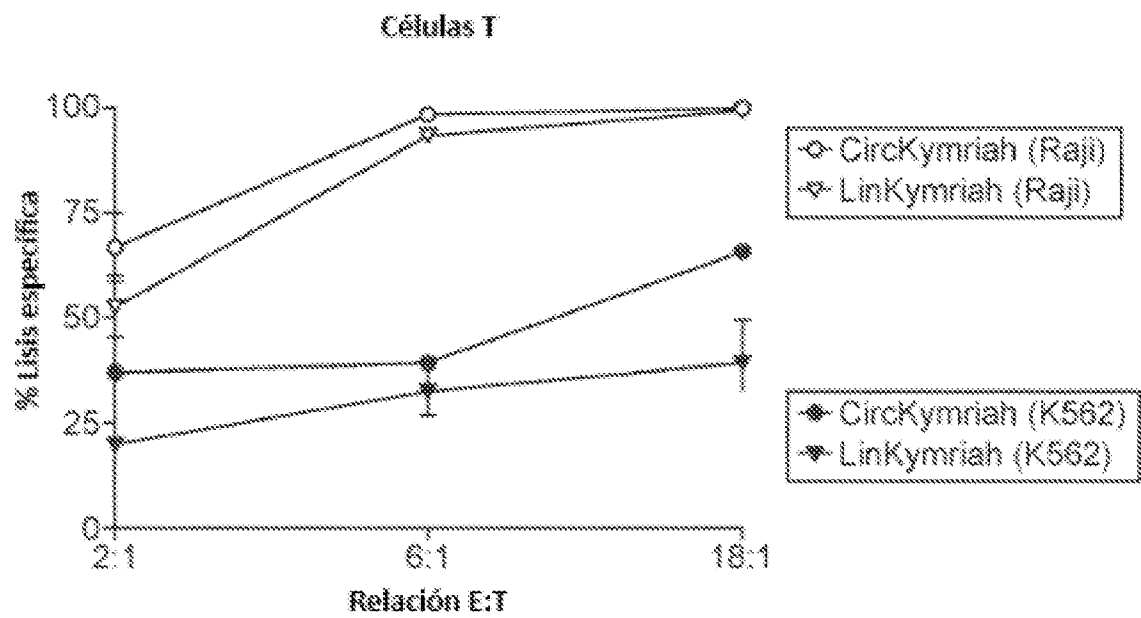


FIG. 22B

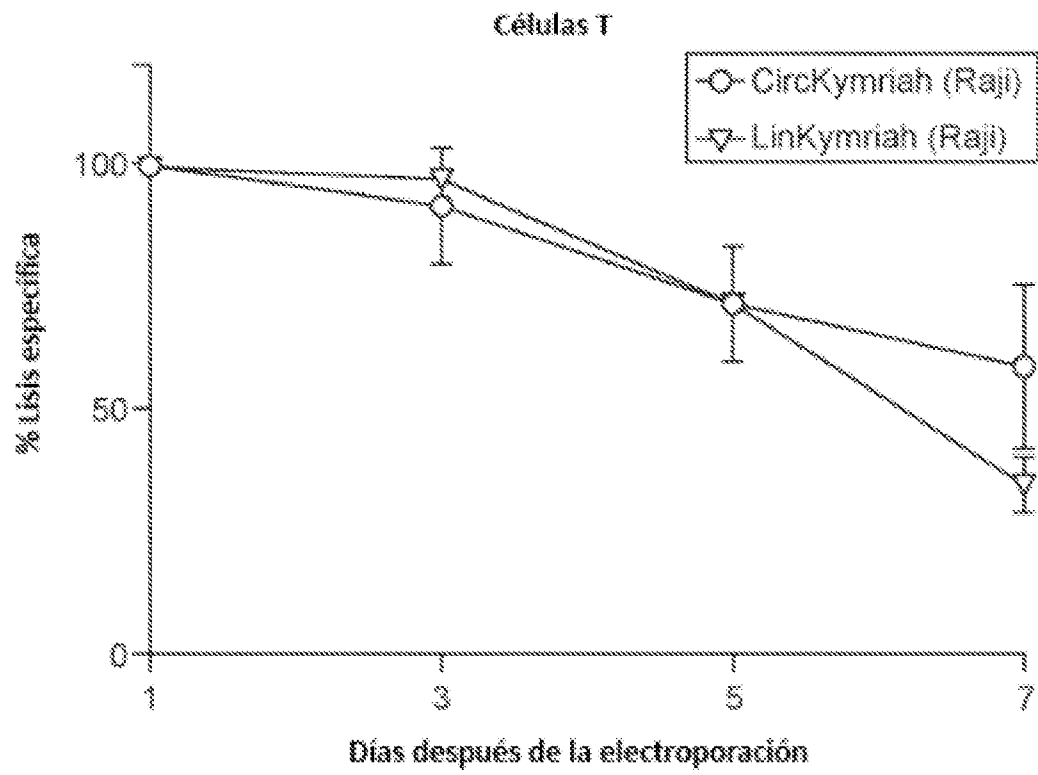


FIG. 23

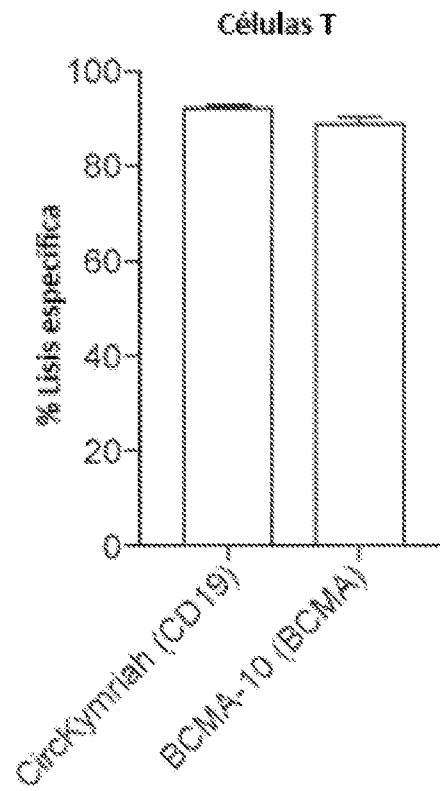


FIG. 24

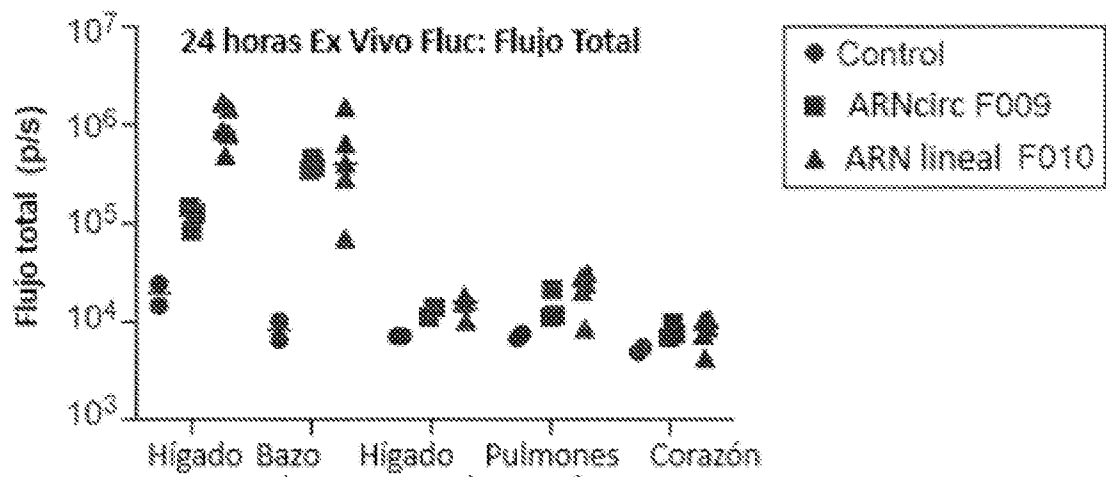


FIG. 25

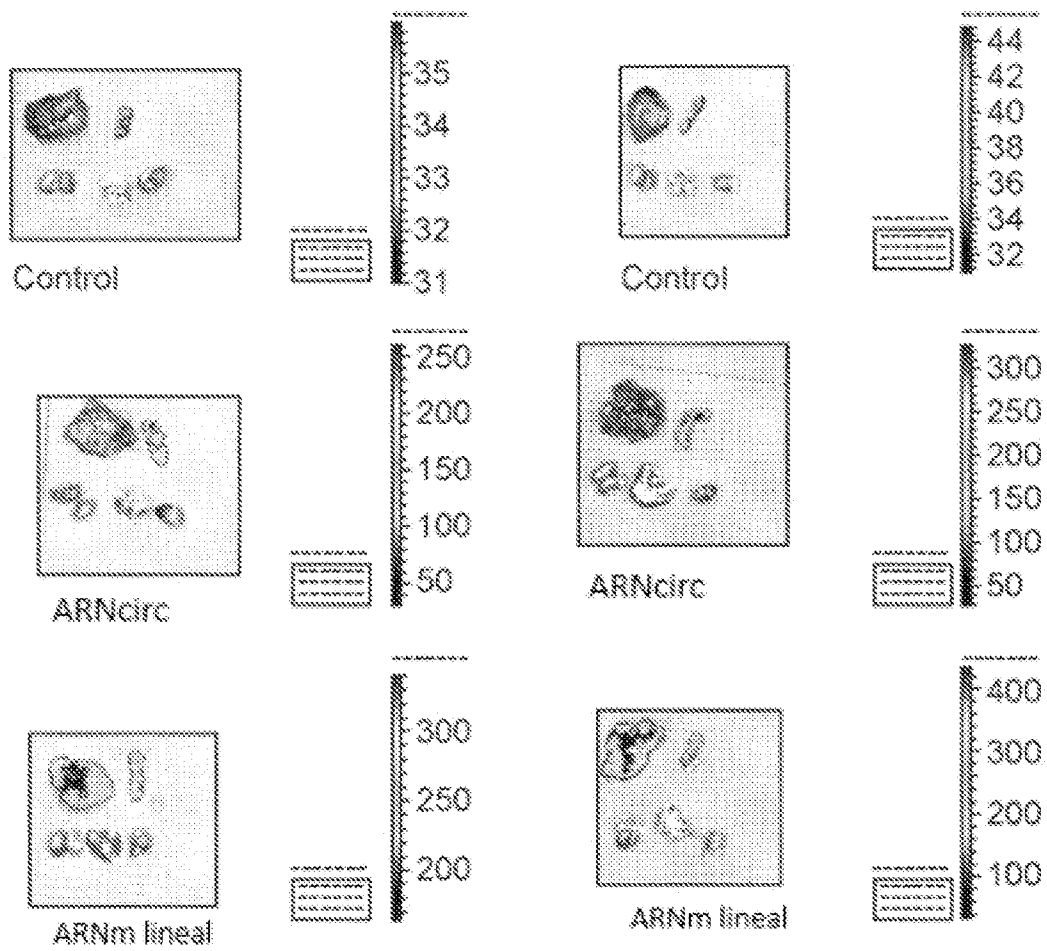


FIG. 26

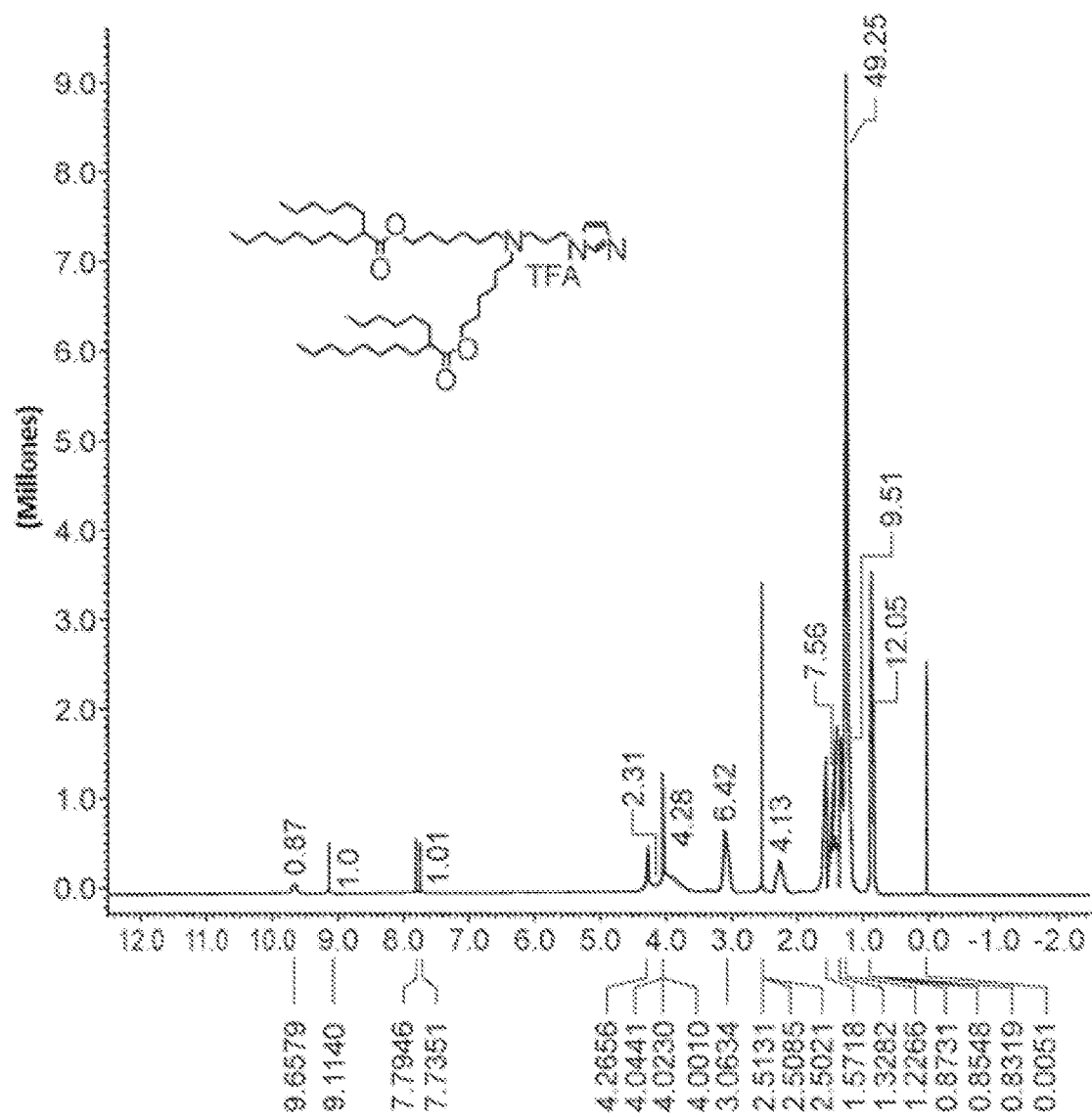


FIG. 27A

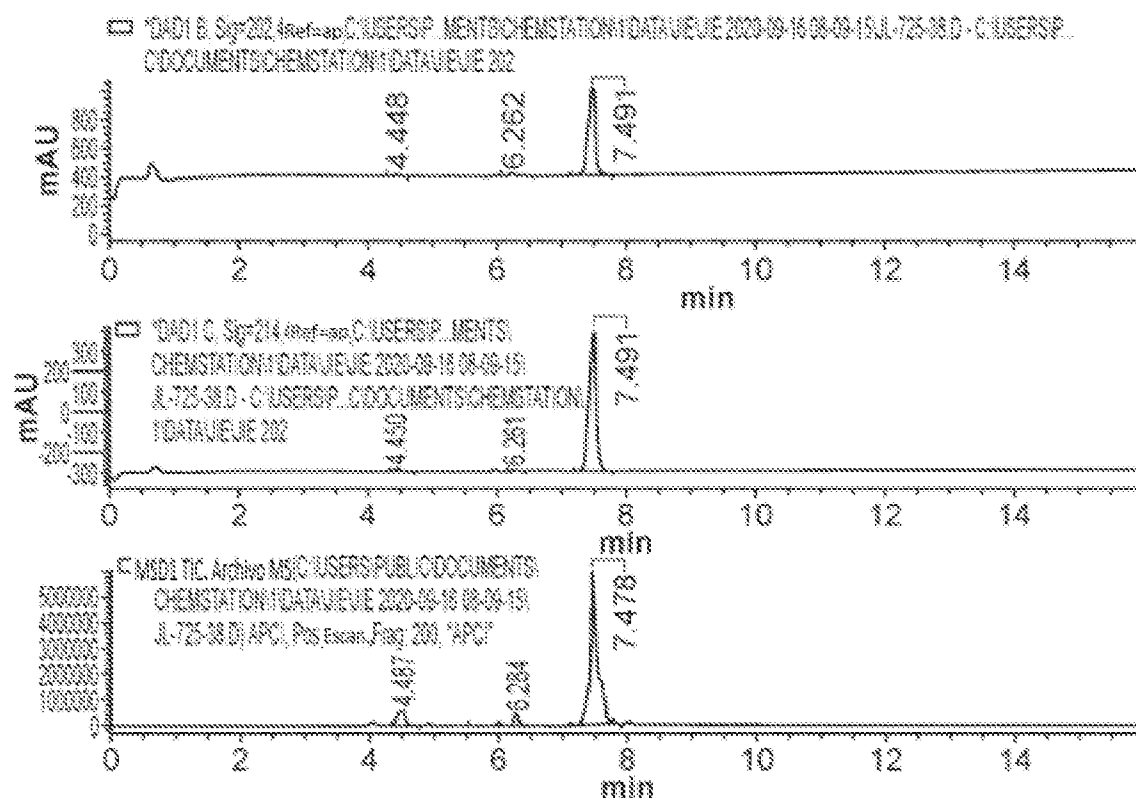


FIG. 27B

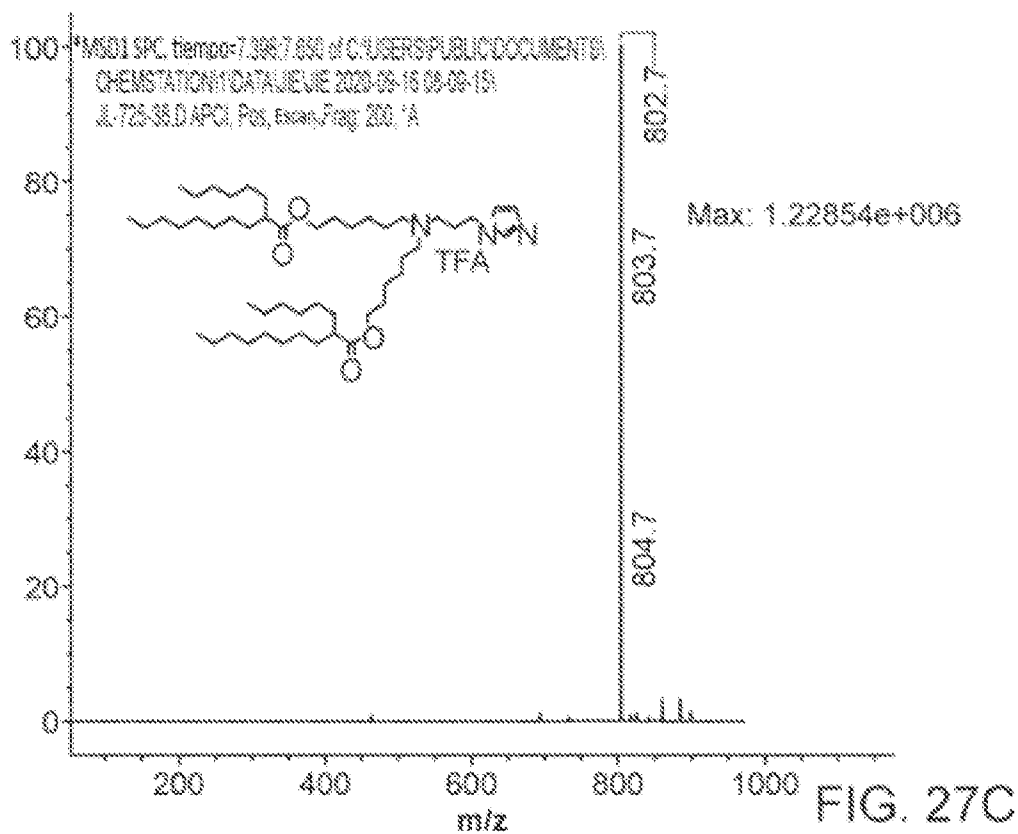


FIG. 27C

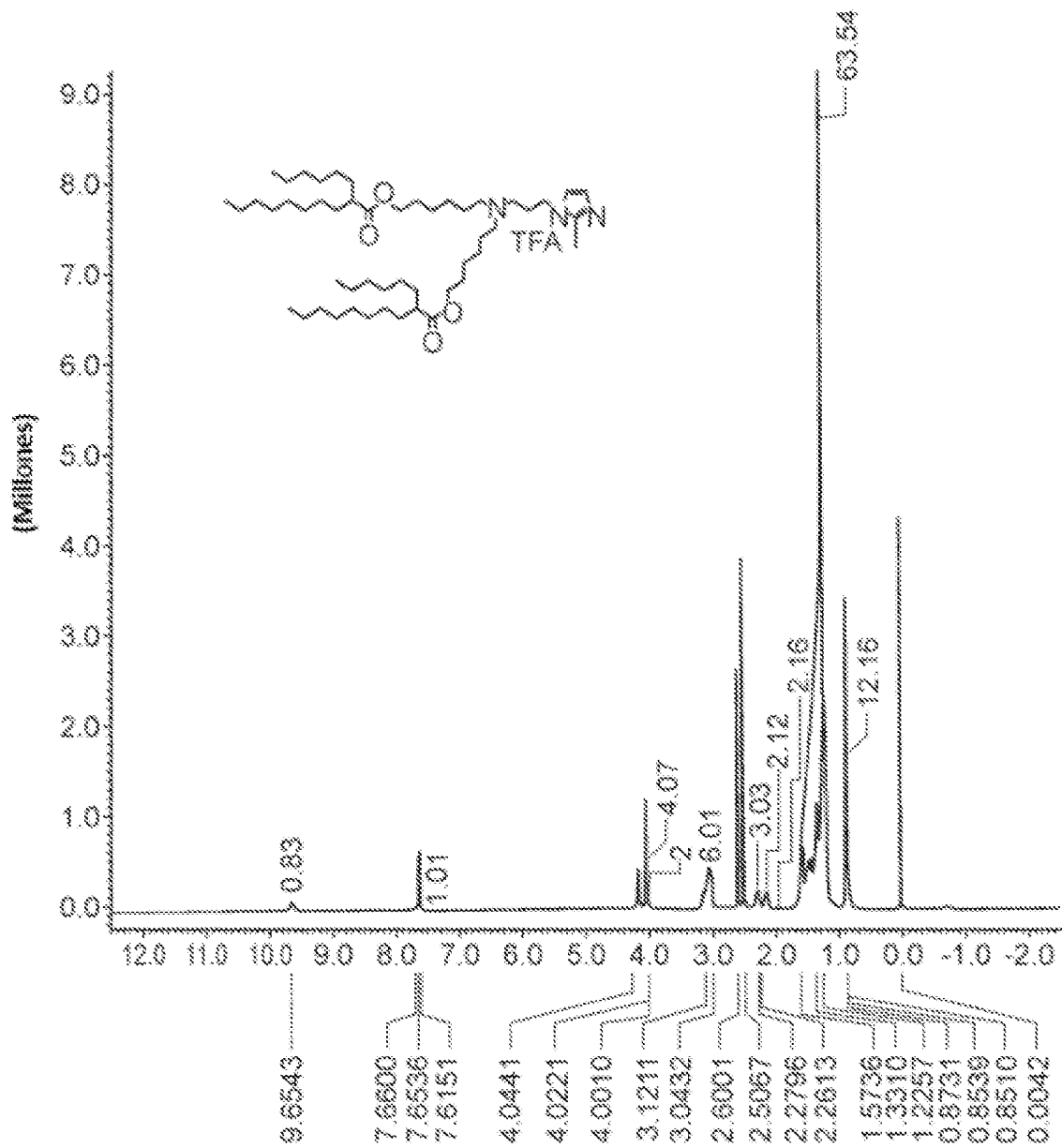
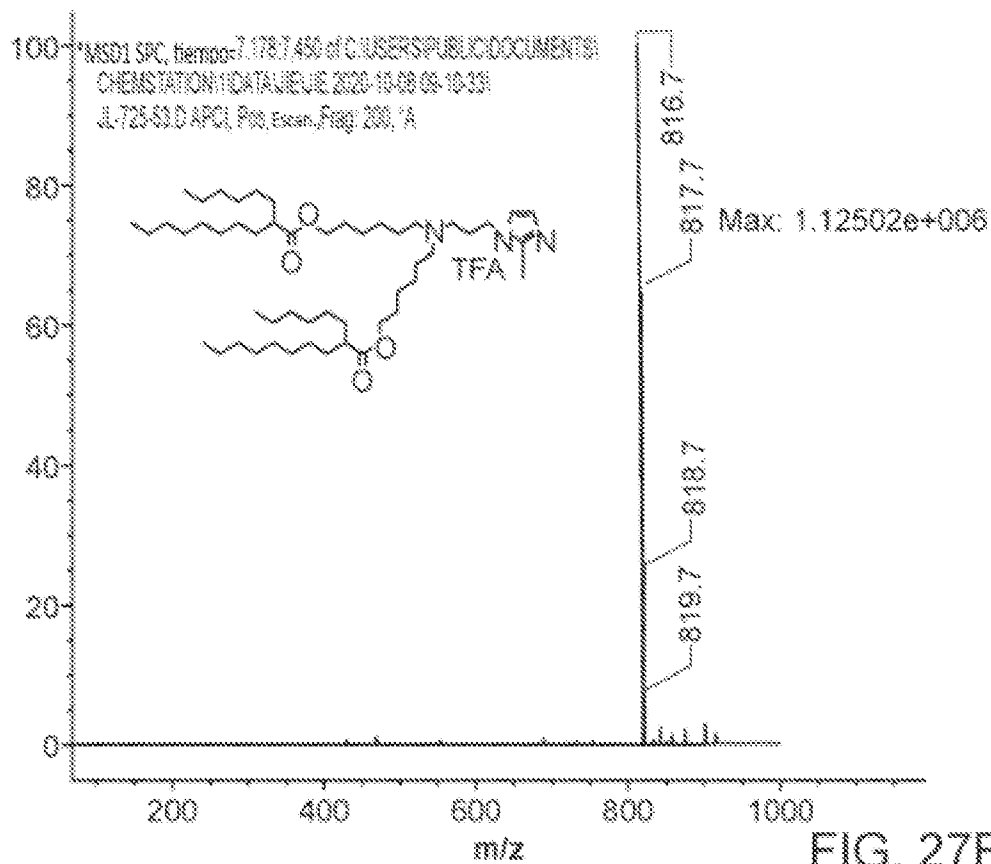
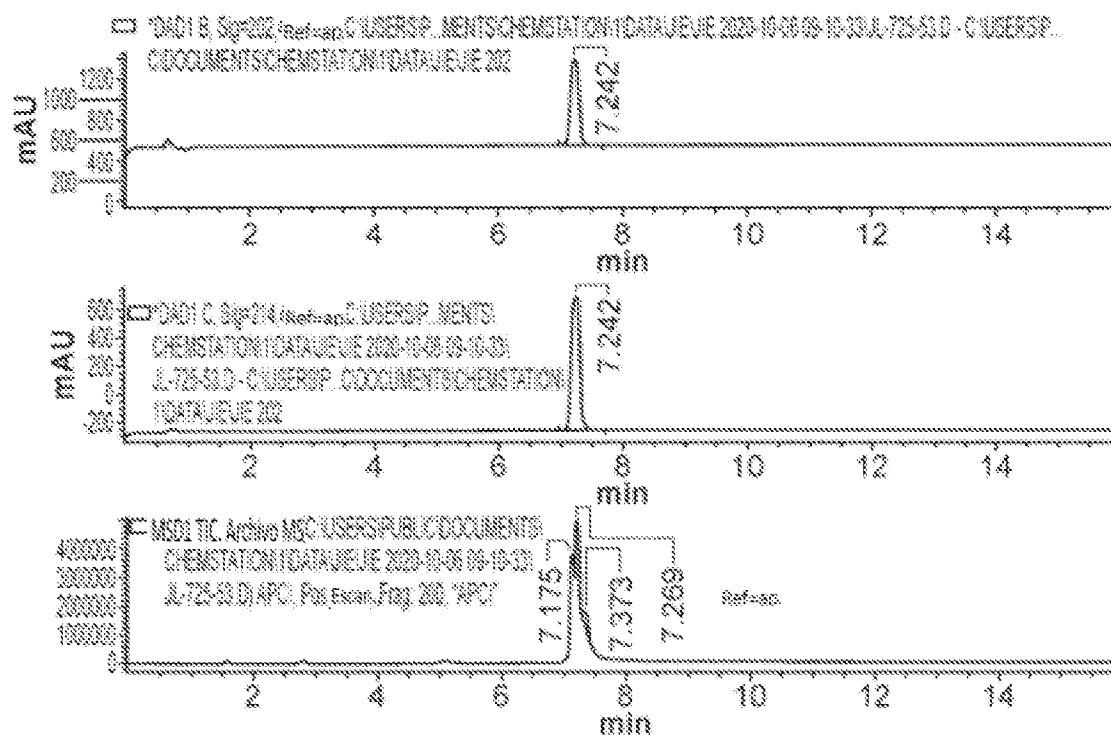
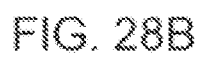
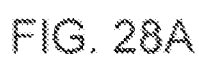


FIG. 27D





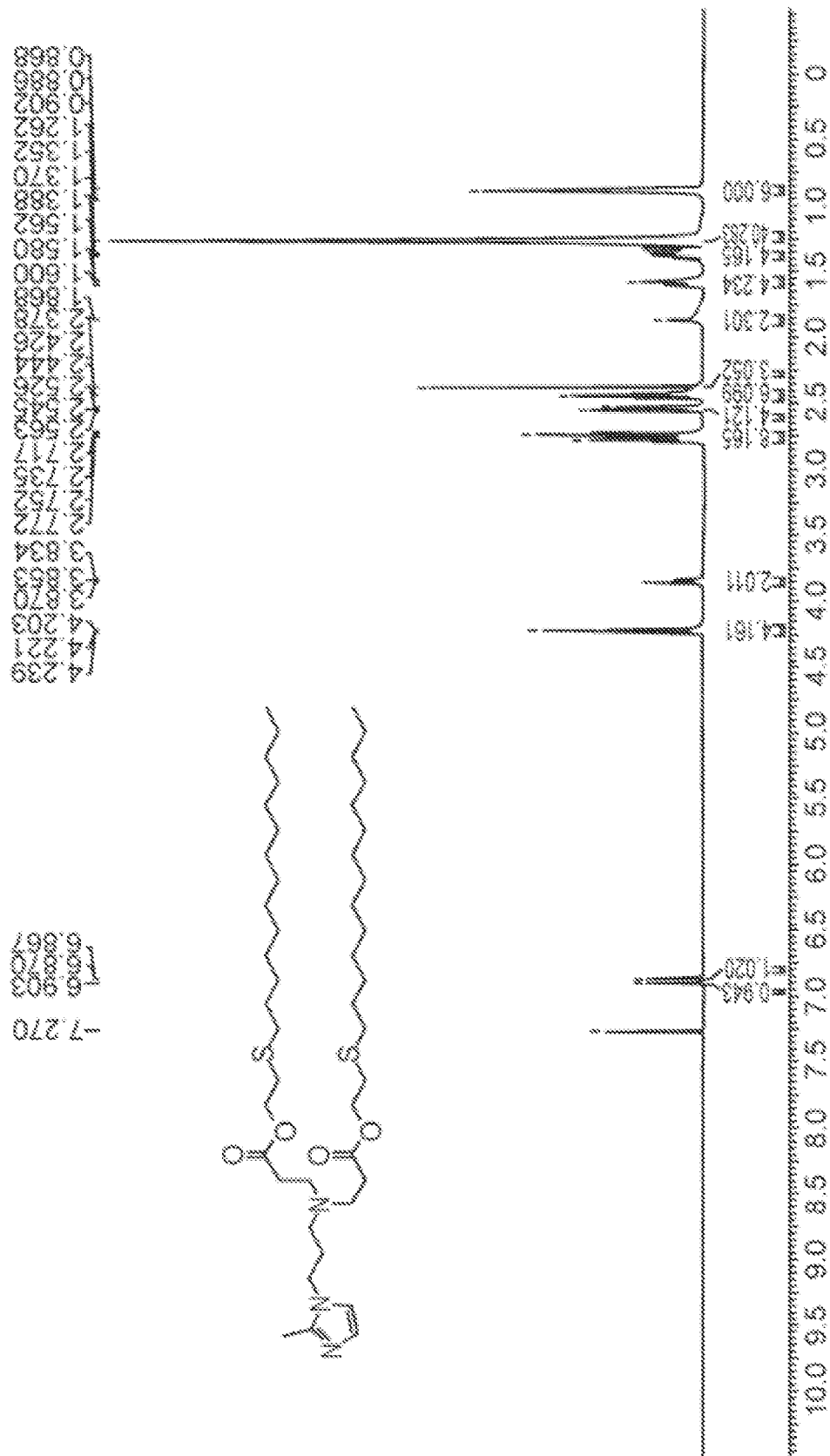


FIG. 28C

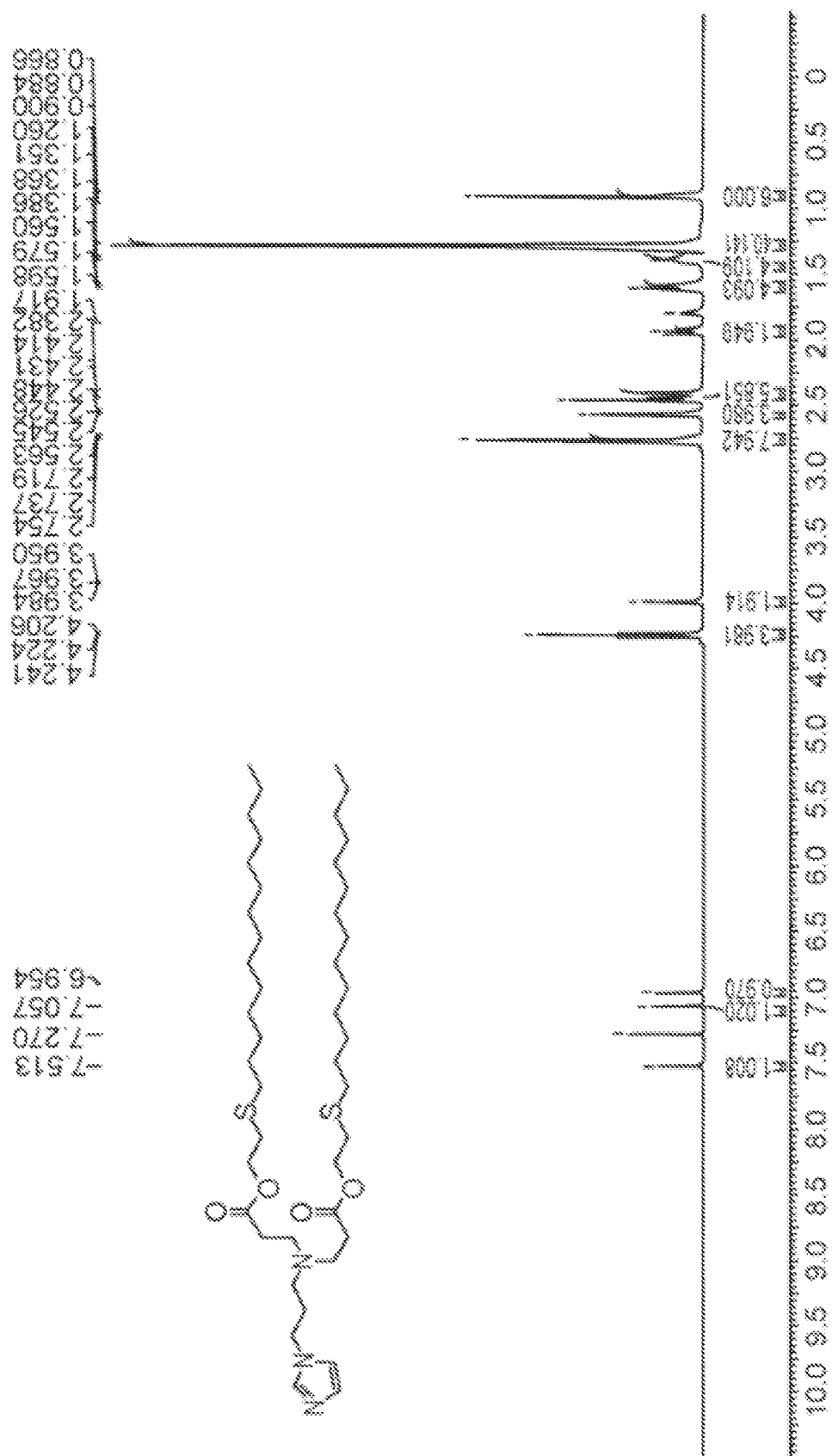


FIG. 29

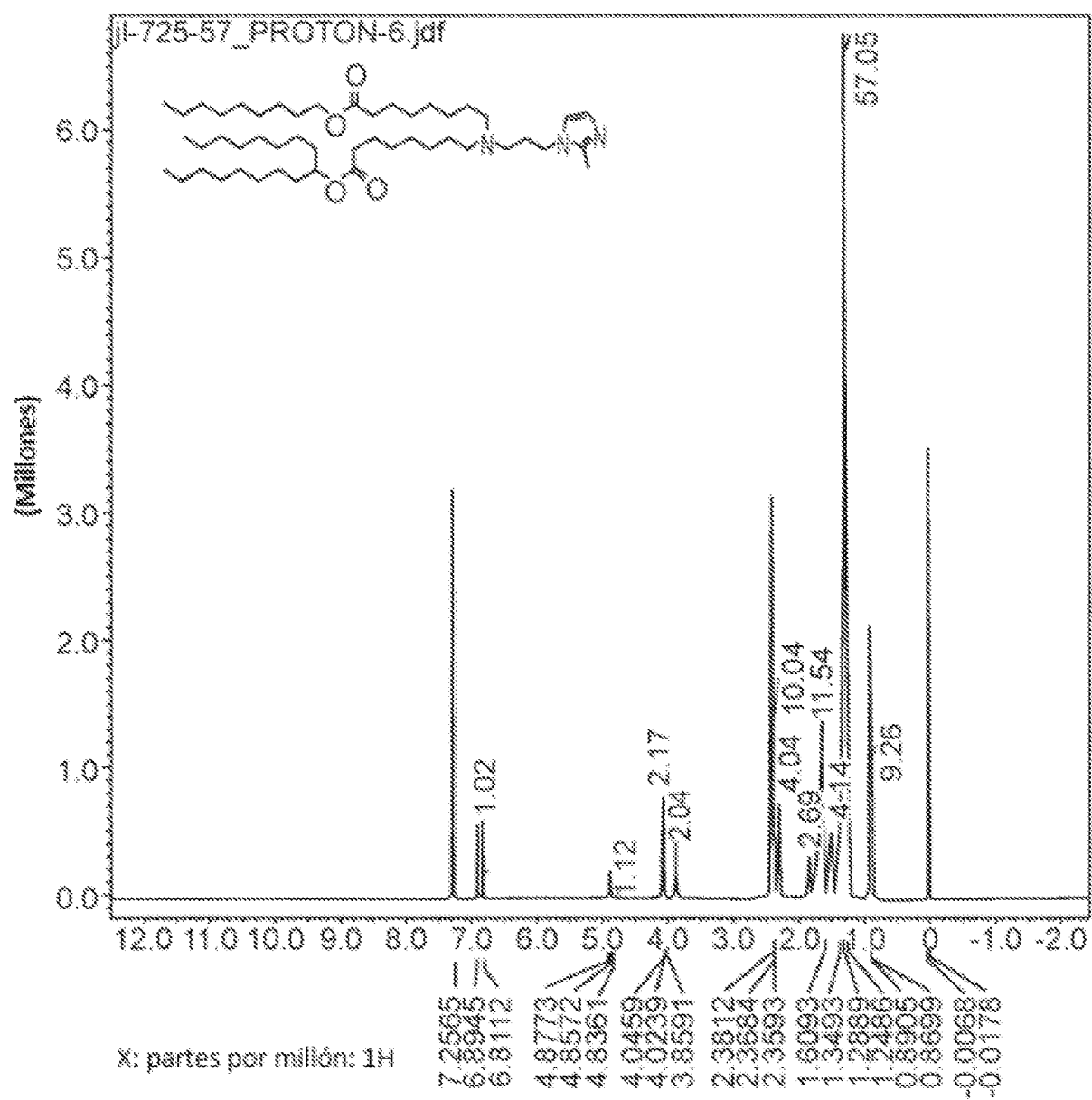


FIG. 30A

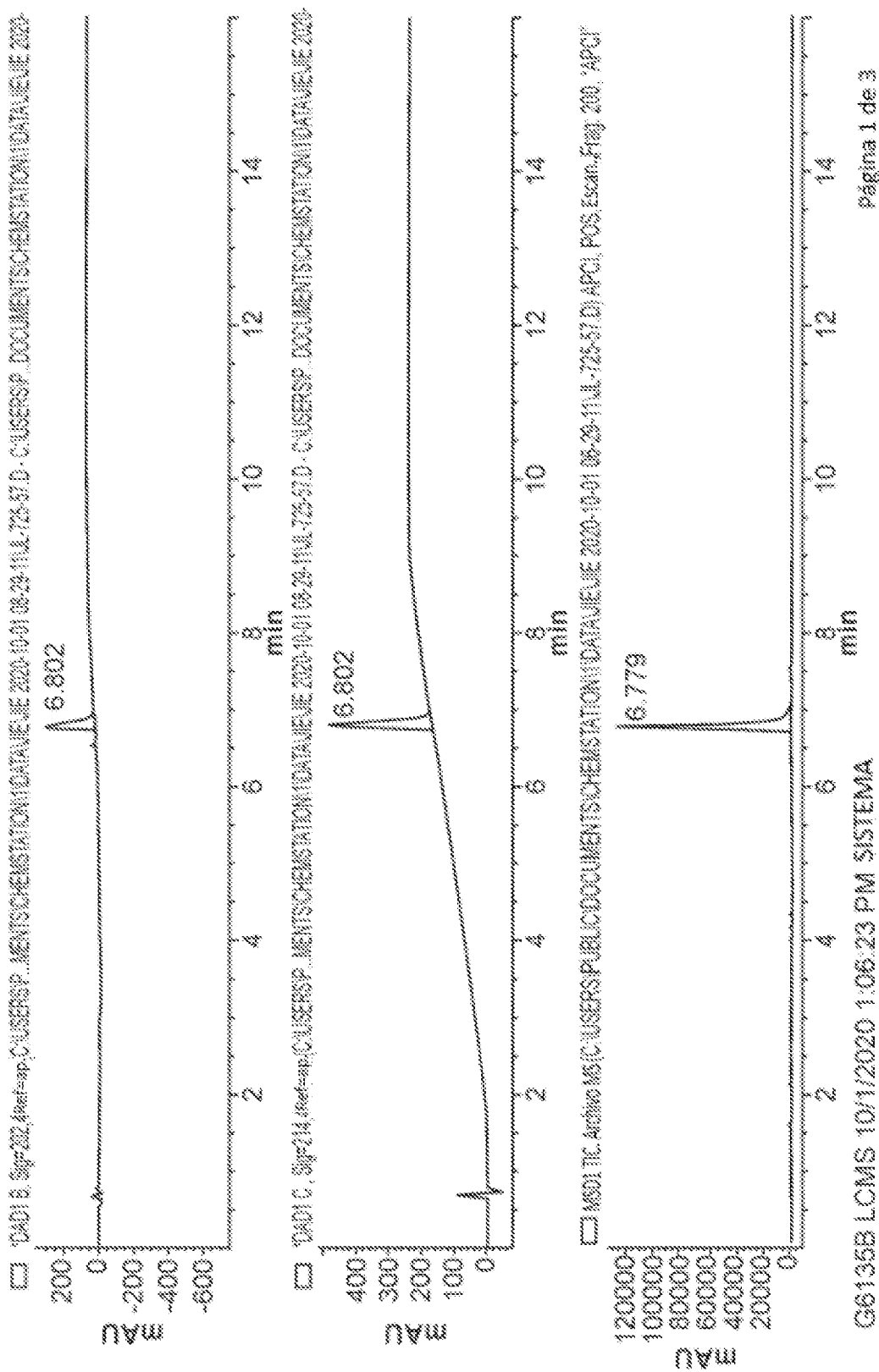


FIG. 30B

MSD1 SP1tempo=5.7418.889 of C:\USERS\PUBLIC\DOCUMENT\CHEMSTATION\1\DATA\JEUE 2020-10-01 08:29-11\UL-725-37.D APCI, POS Scan, Frag: 200, *A

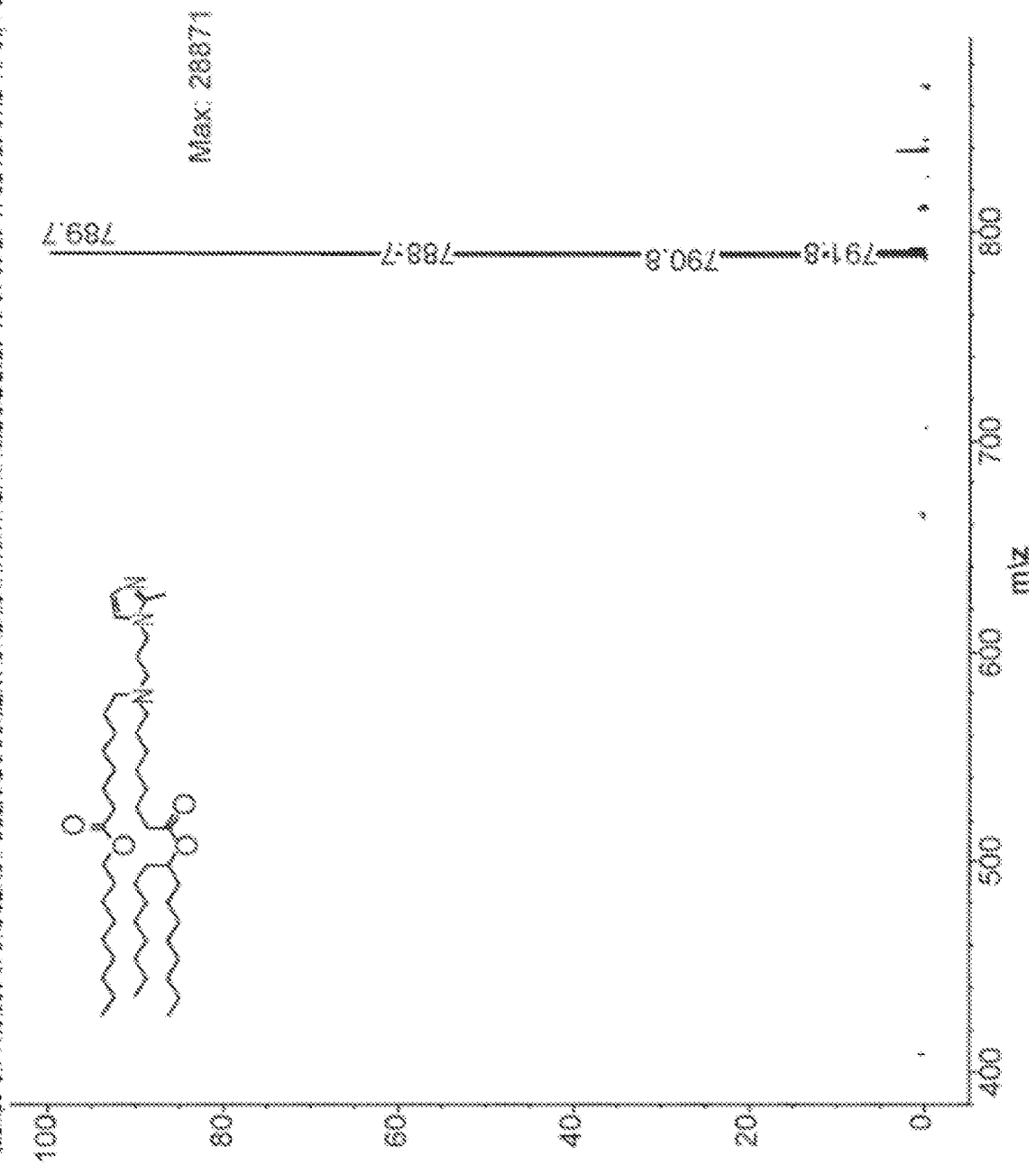


FIG. 30C

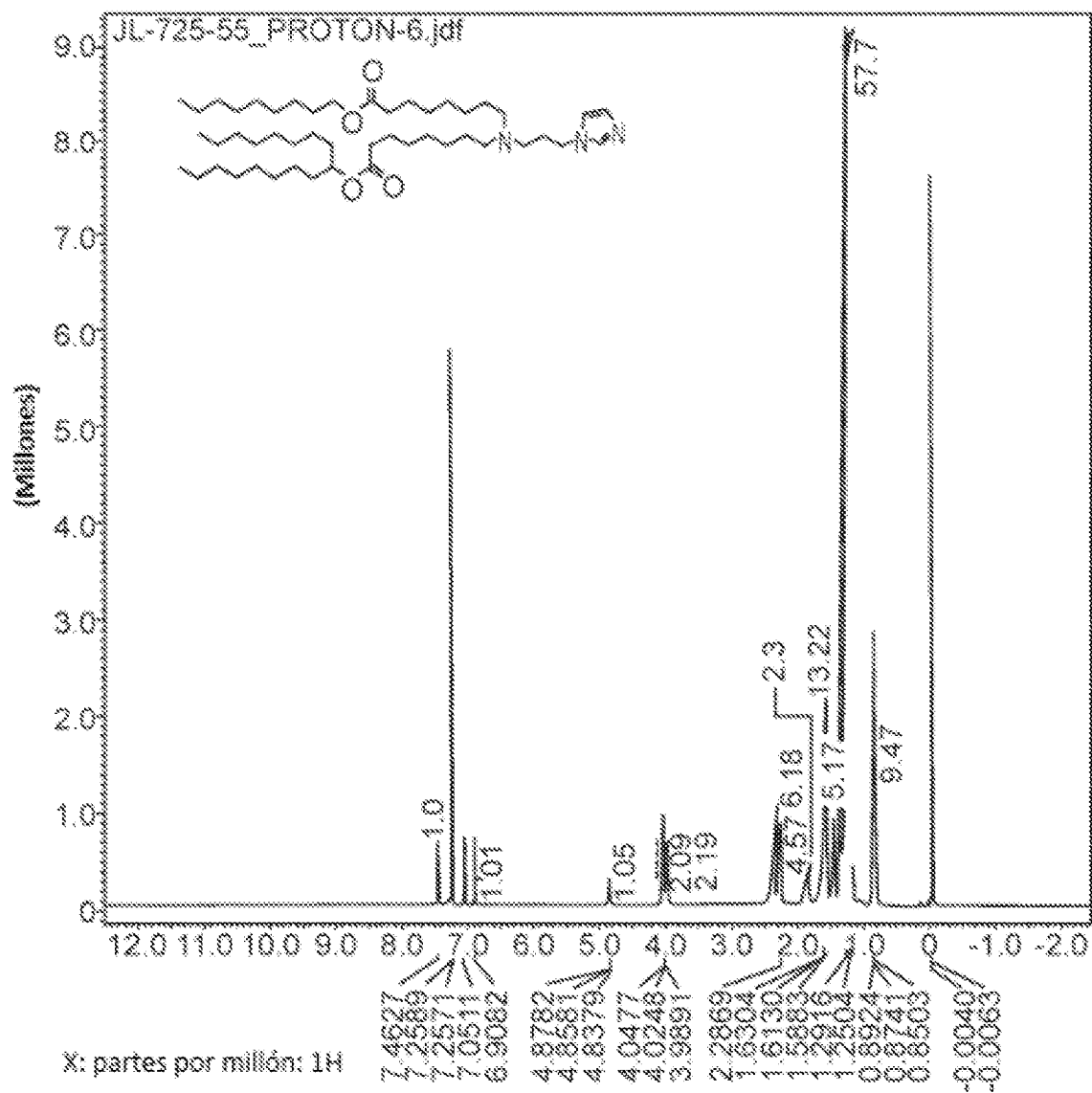


FIG. 31A

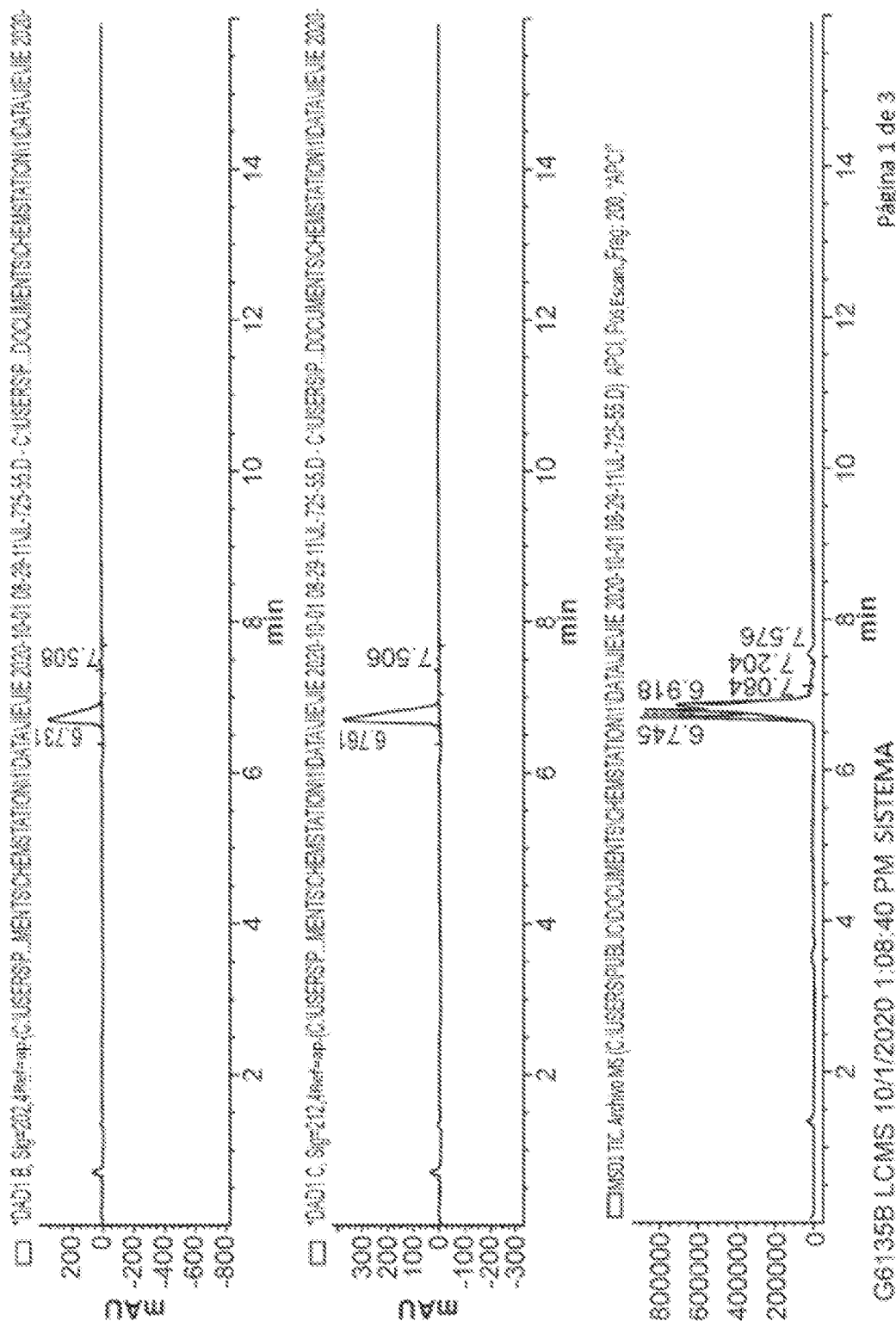
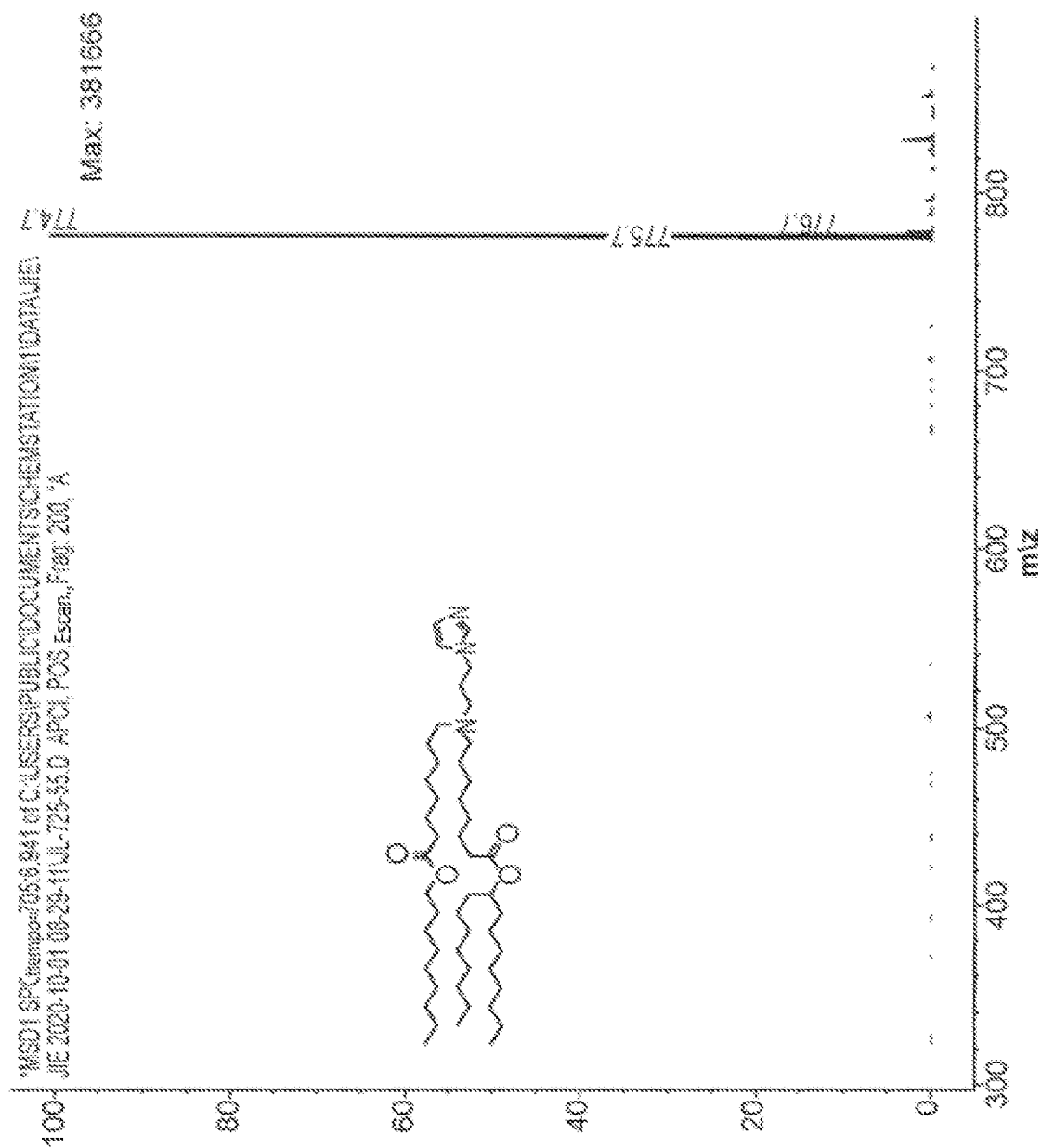


FIG. 31B





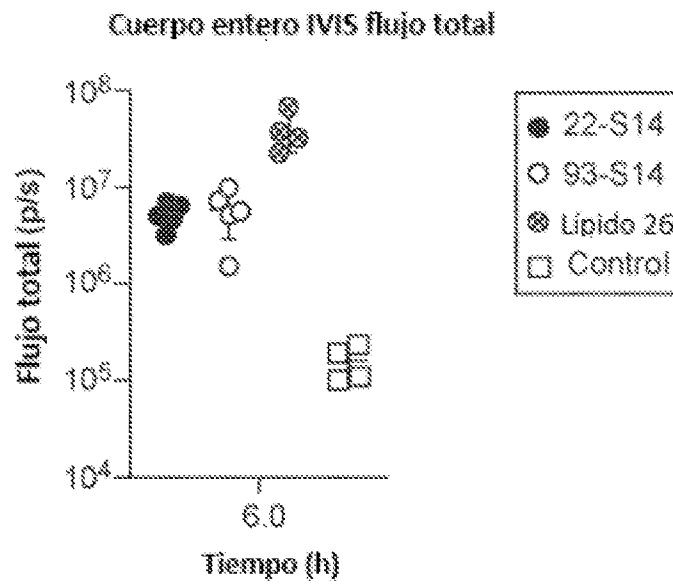


FIG. 32A

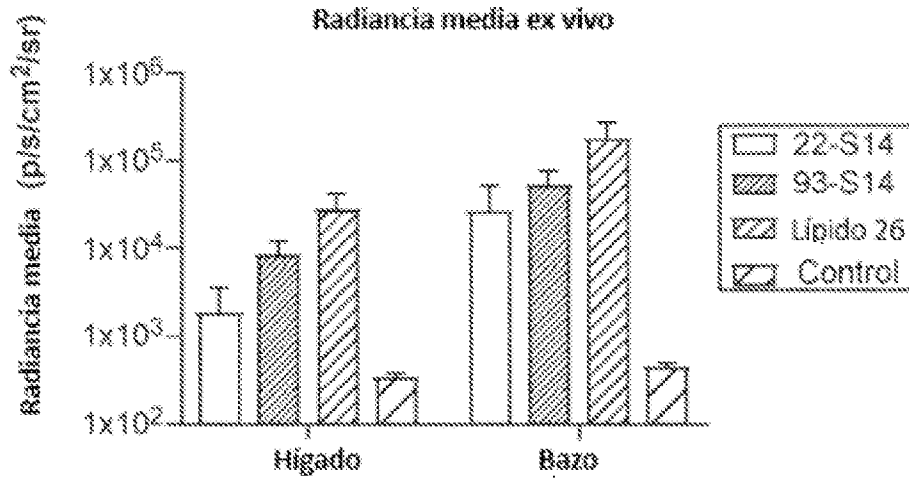
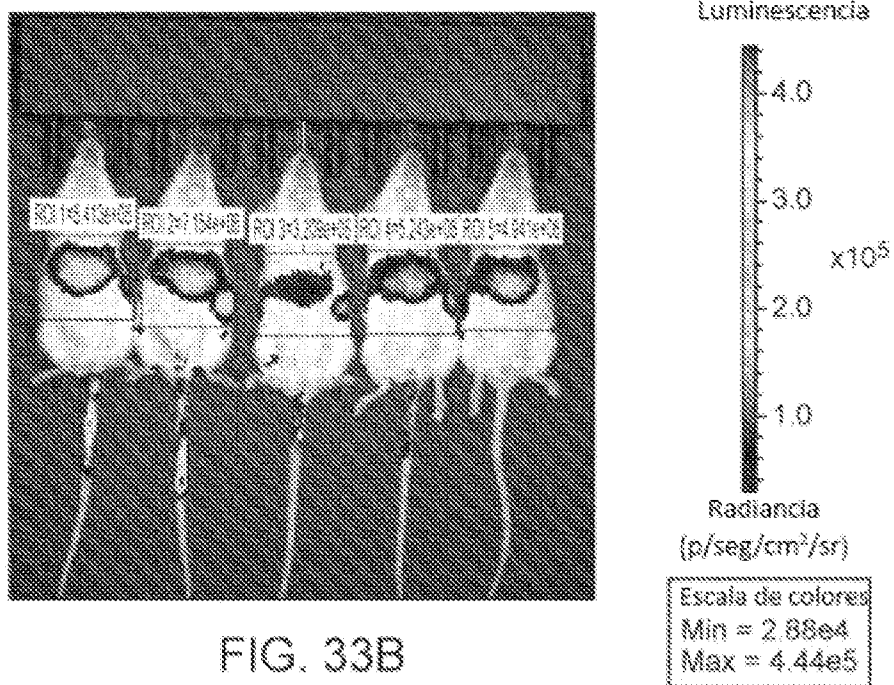
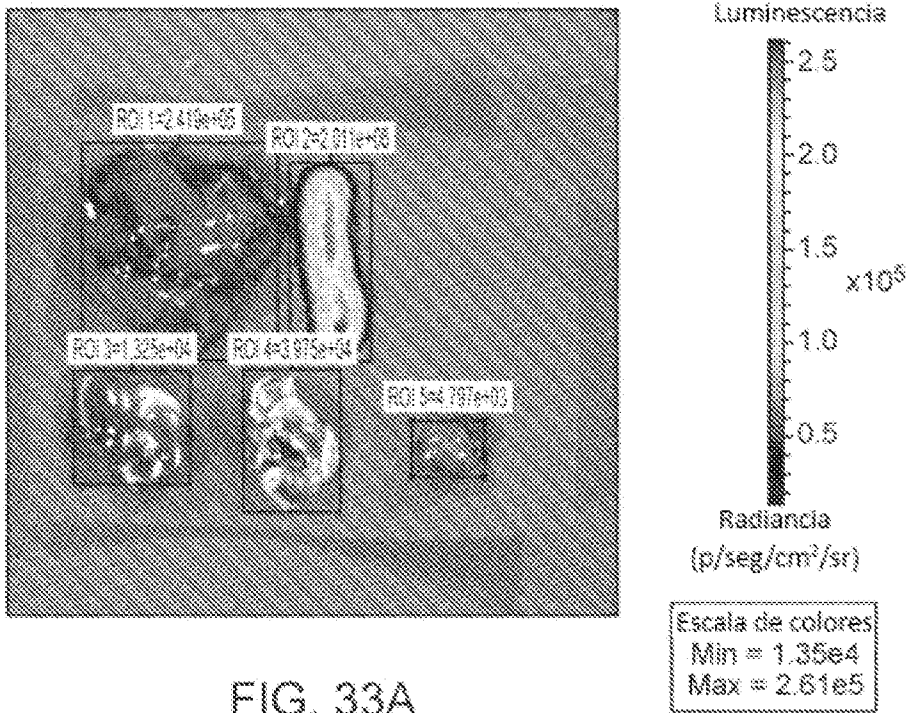
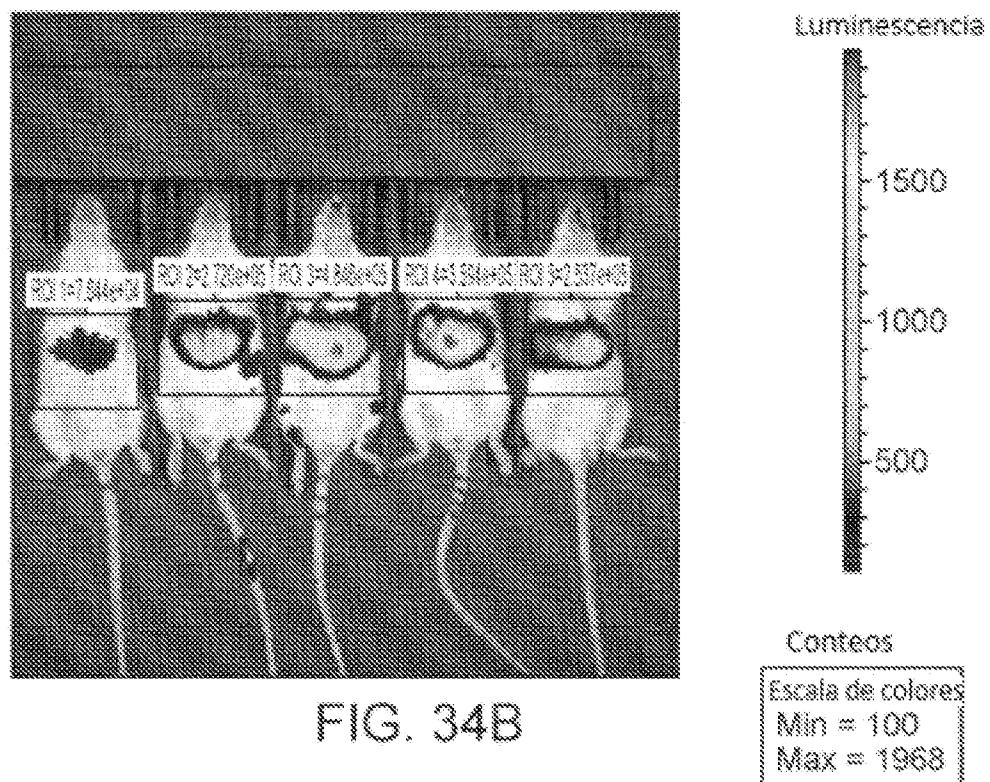
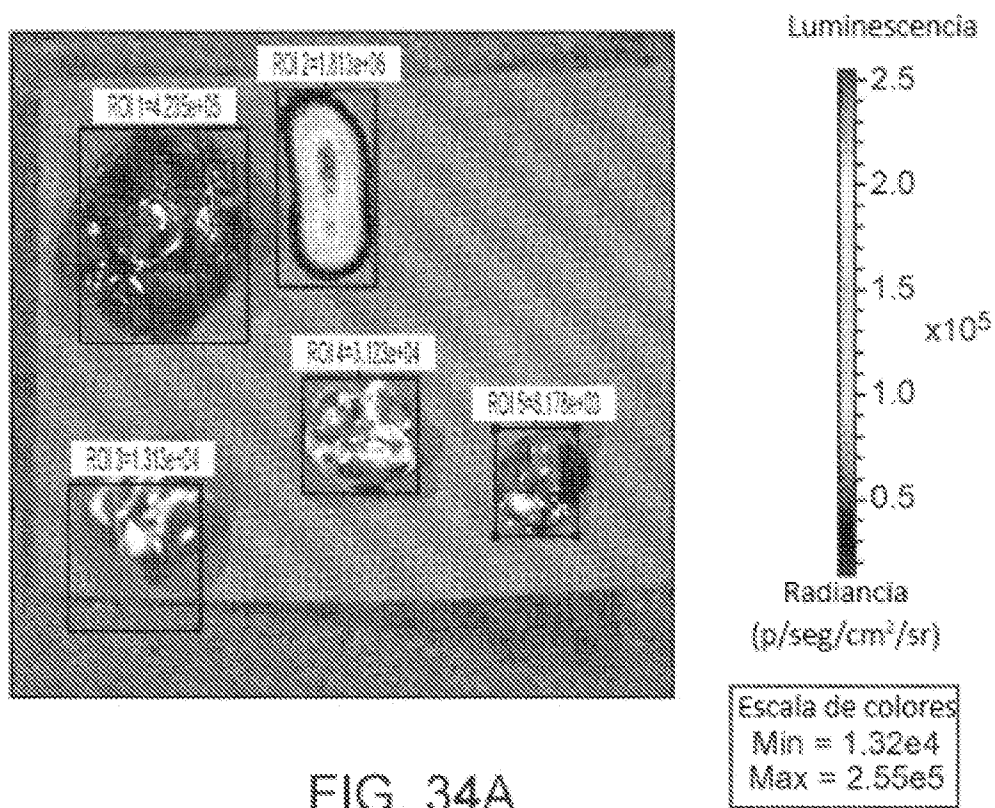
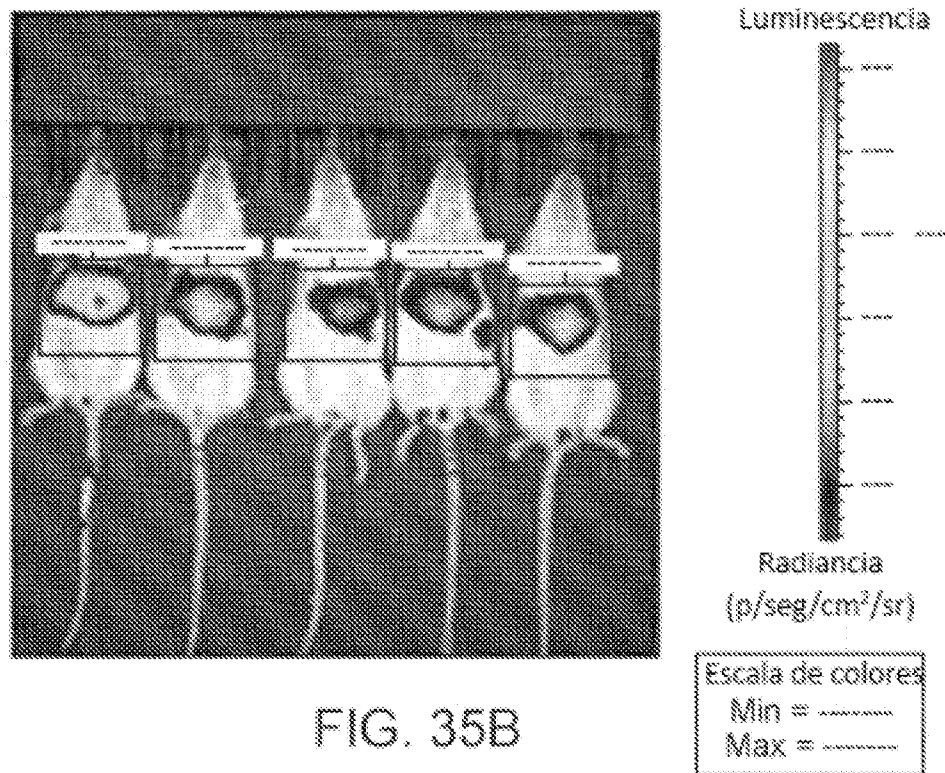
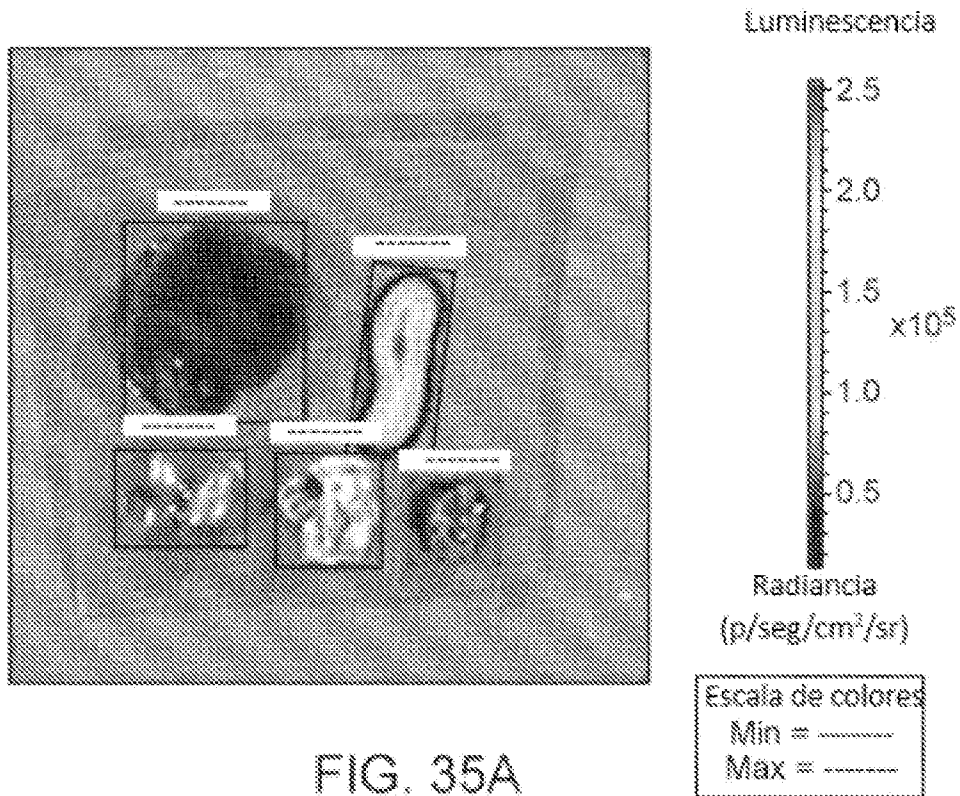


FIG. 32B







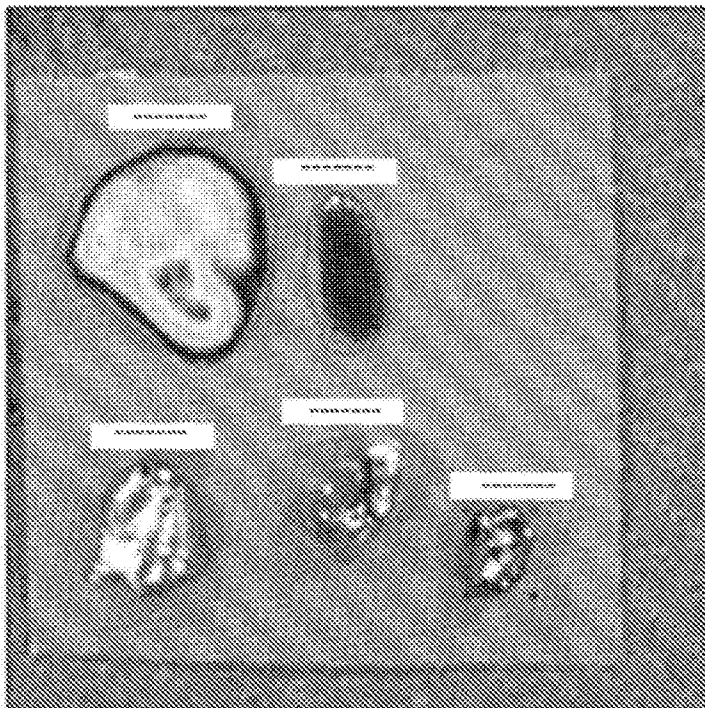
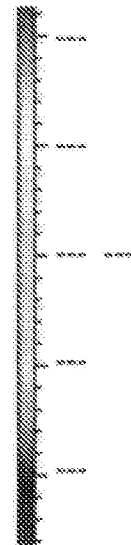


FIG. 36A

Luminescencia



Radiancia
(p/seg/cm²/sr)

Escala de colores
Min = _____
Max = _____

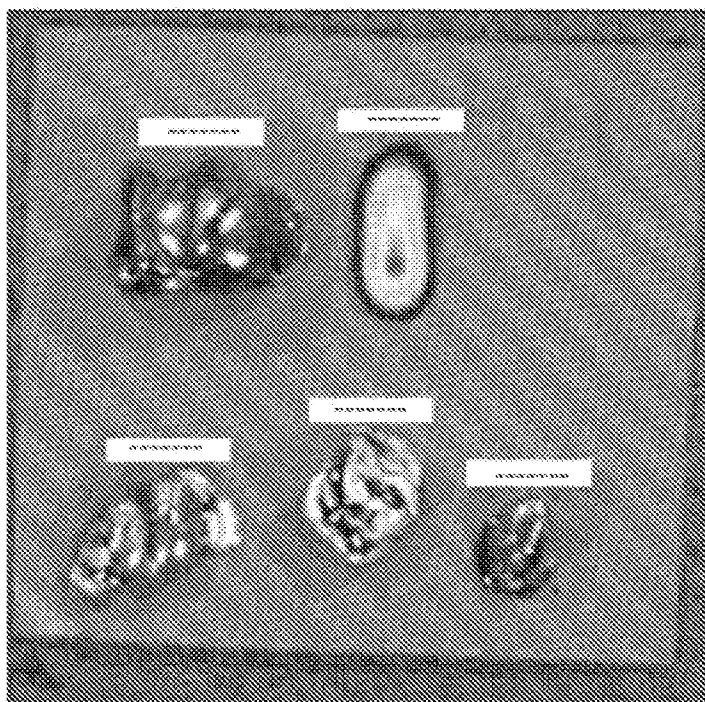
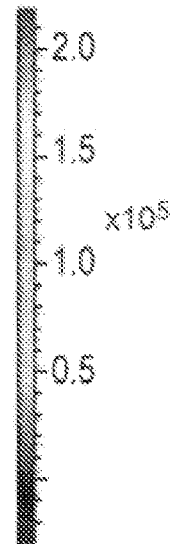


FIG. 36B

Luminescencia



Radiancia
(p/seg/cm²/sr)

Escala de colores
Min = _____
Max = _____

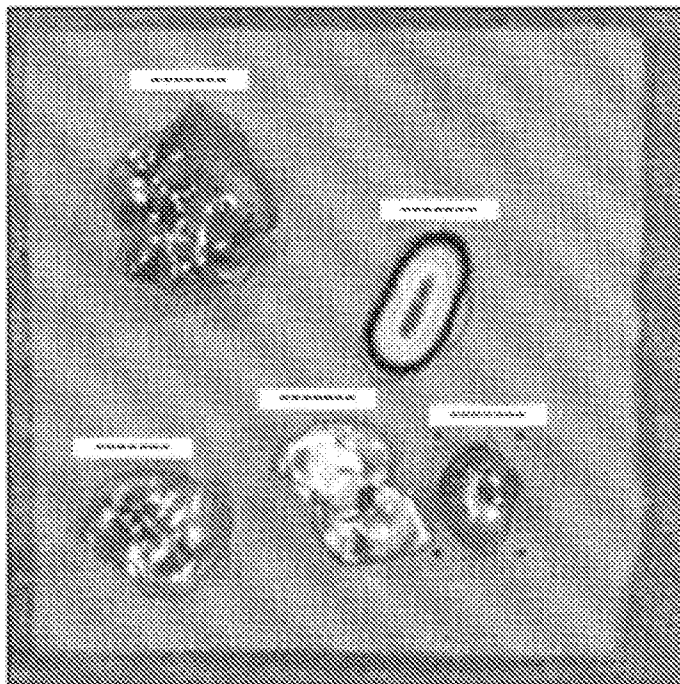
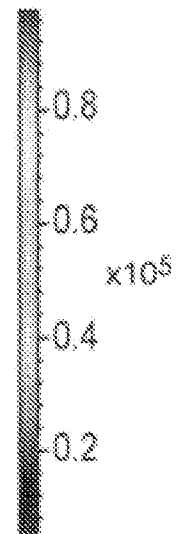


FIG. 36C

Luminescencia



Radiancia
(p/seg/cm²/sr)

Escala de colores

Min = -----

Max = -----

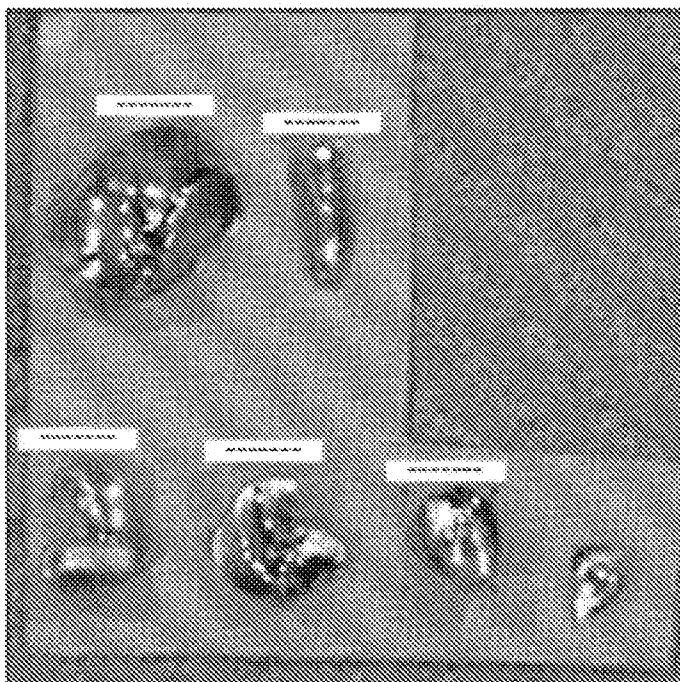
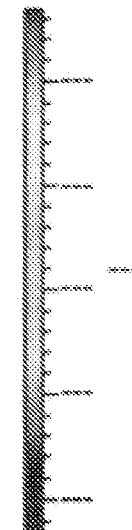


FIG. 36D

Luminescencia



Radiancia
(p/seg/cm²/sr)

Escala de colores

Min = -----

Max = -----

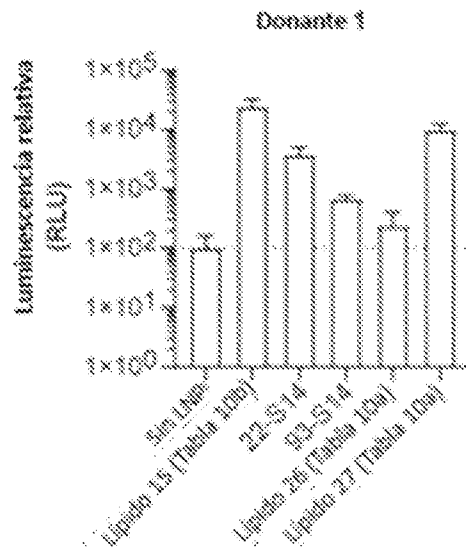


FIG. 37A

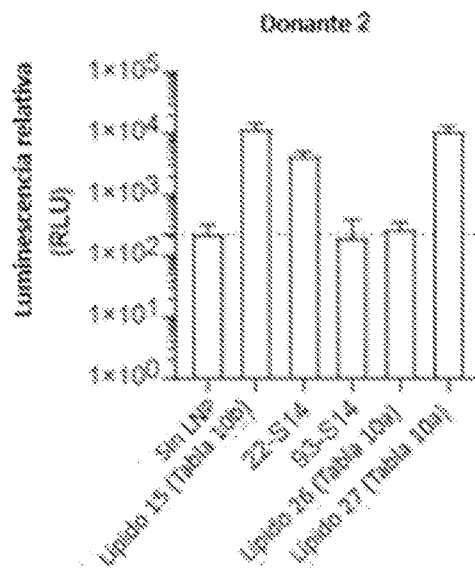


FIG. 37B

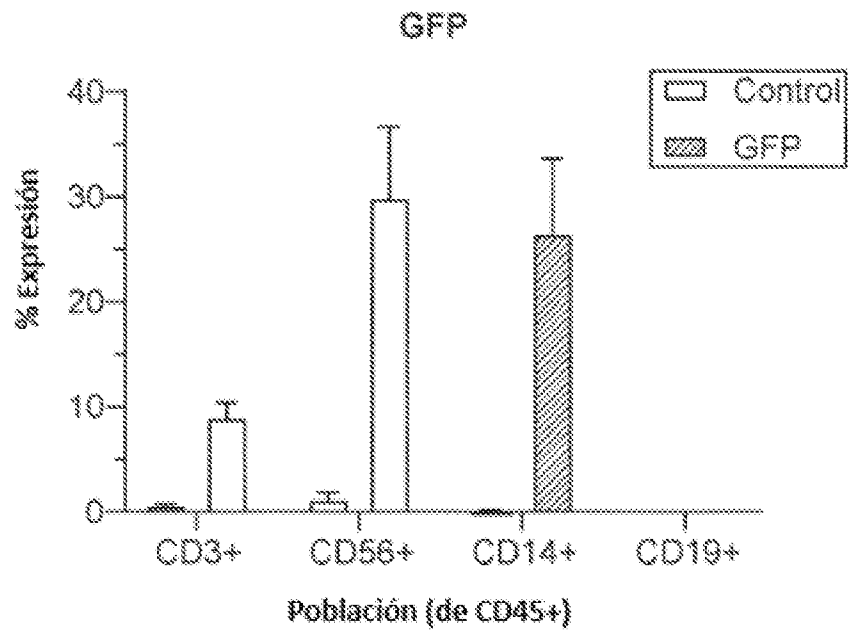


FIG. 38A

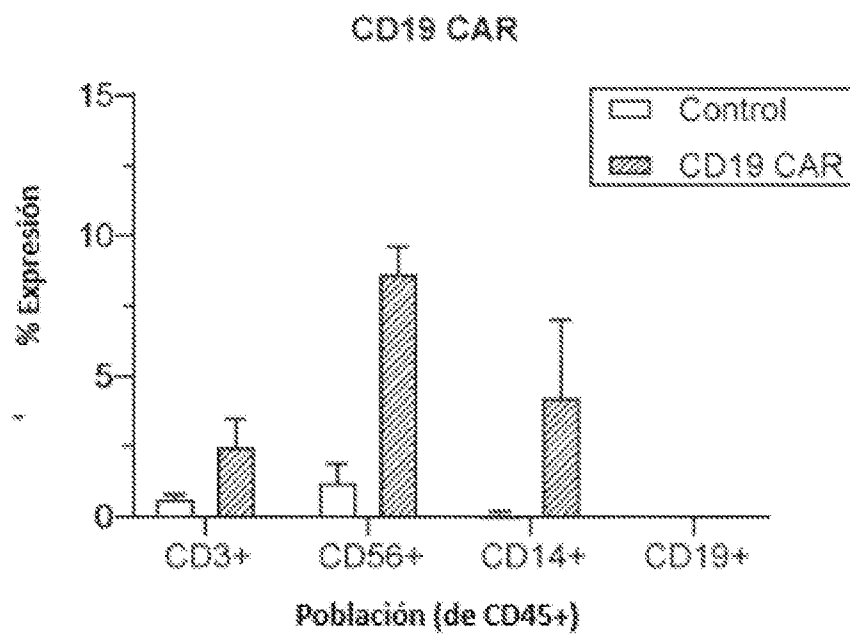


FIG. 38B

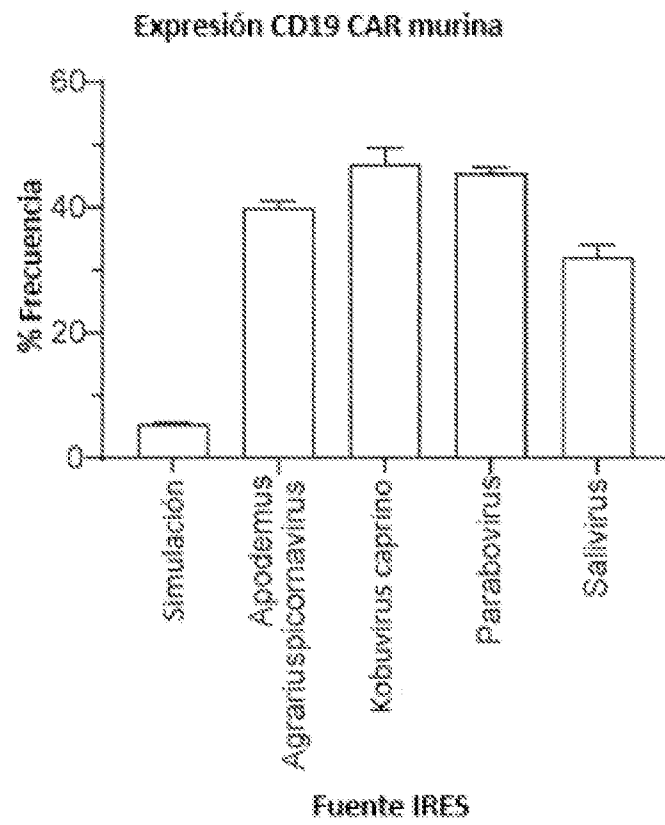


FIG. 39

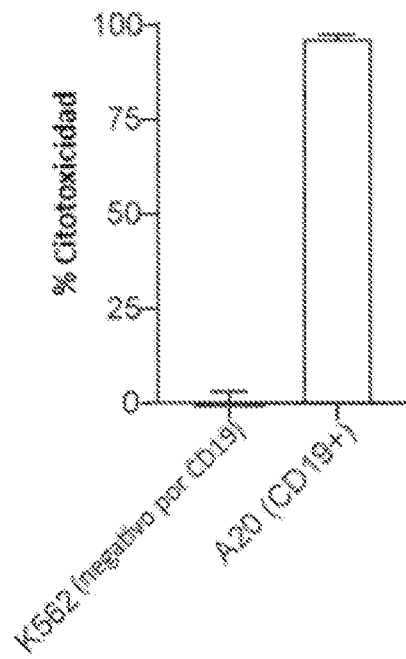


FIG. 40

Día 8 Conteos de células en sangre periférica

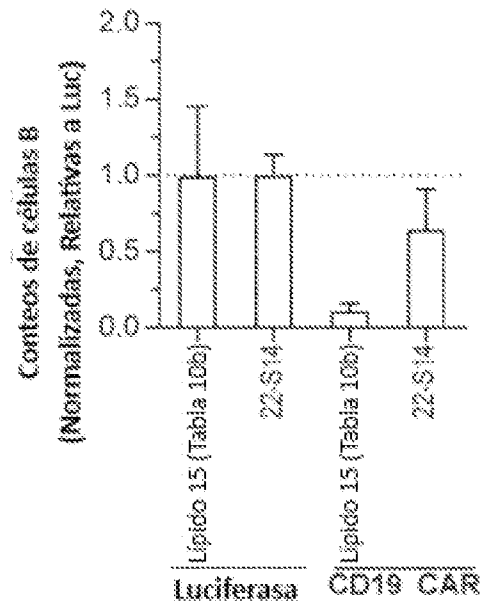


FIG. 41A

Día 12 Conteos de células en sangre periférica

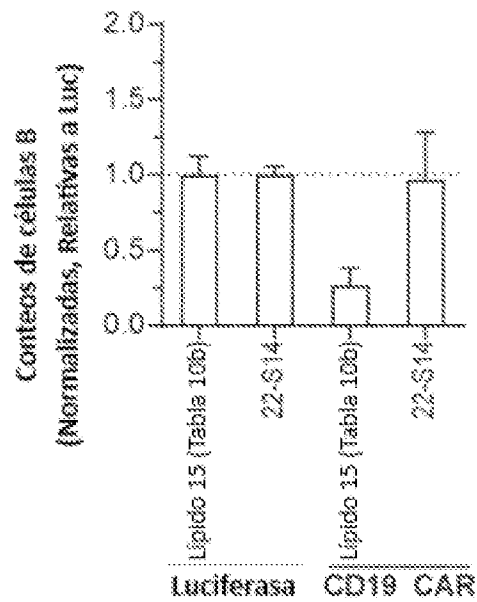


FIG. 41B

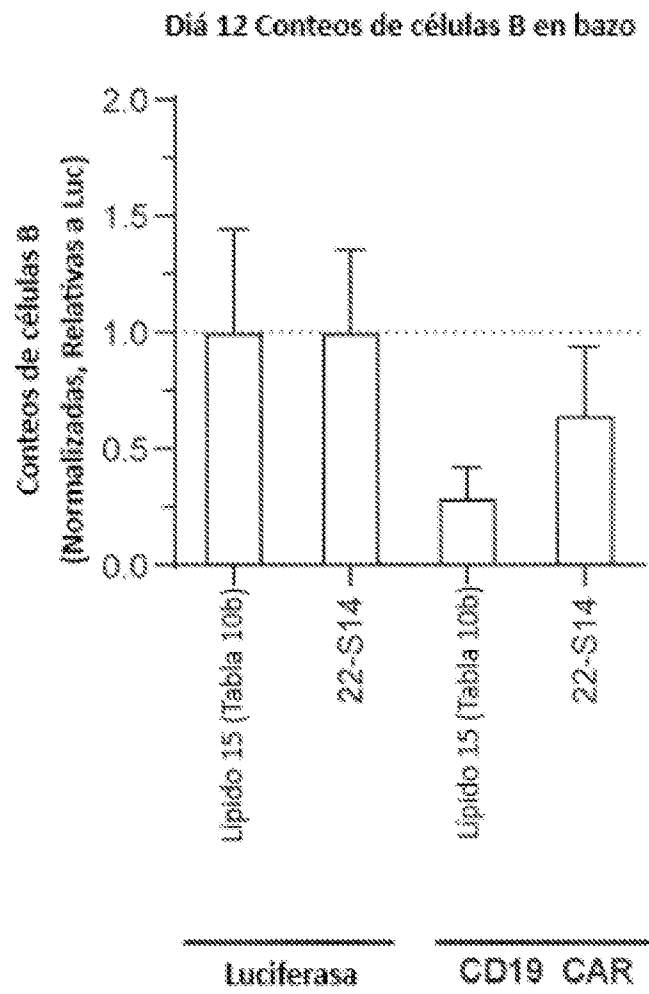


FIG. 41C

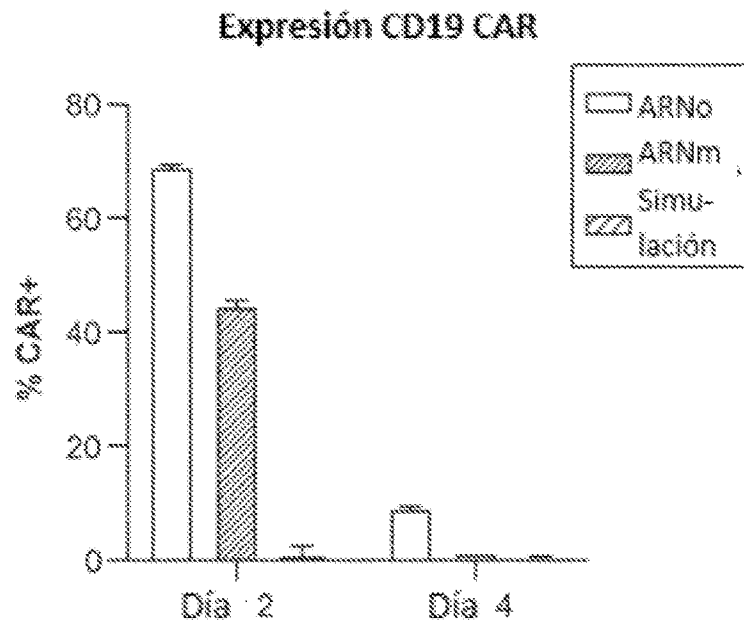


FIG. 42A

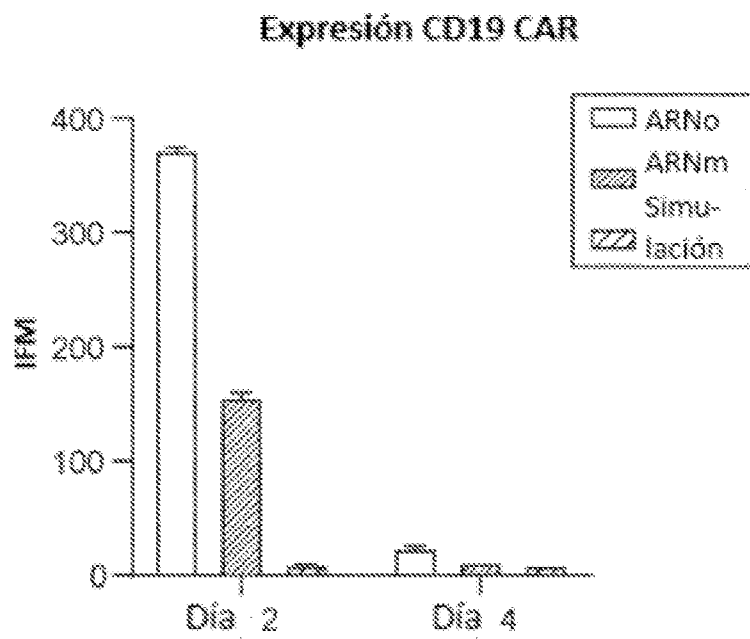


FIG. 42B

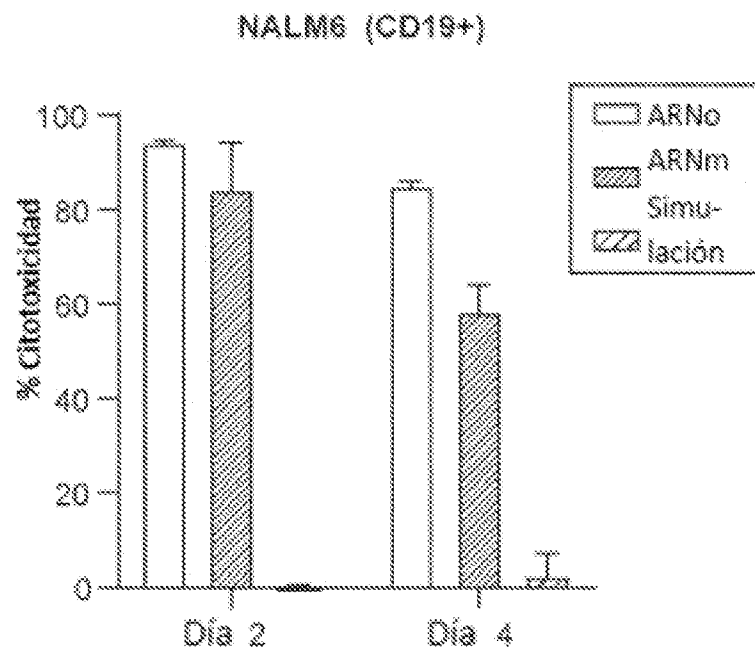


FIG. 43A

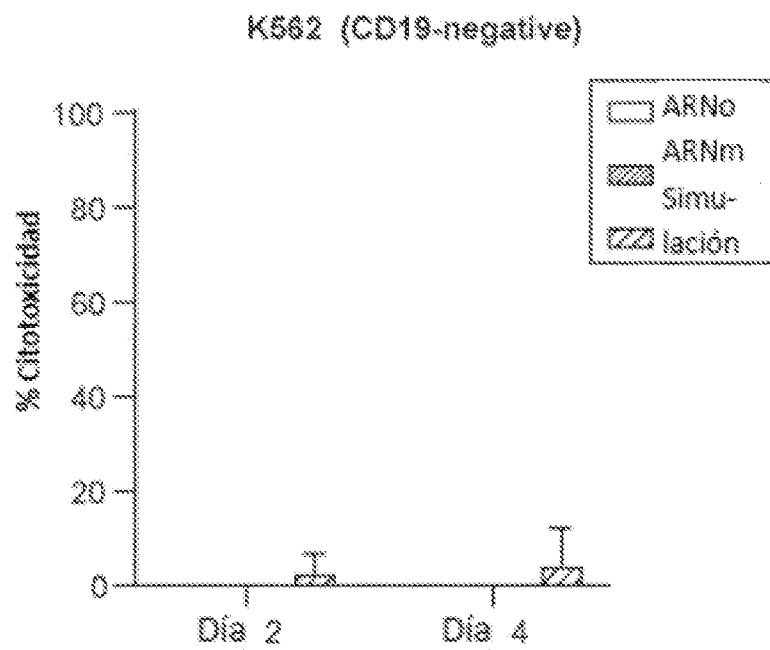


FIG. 43B

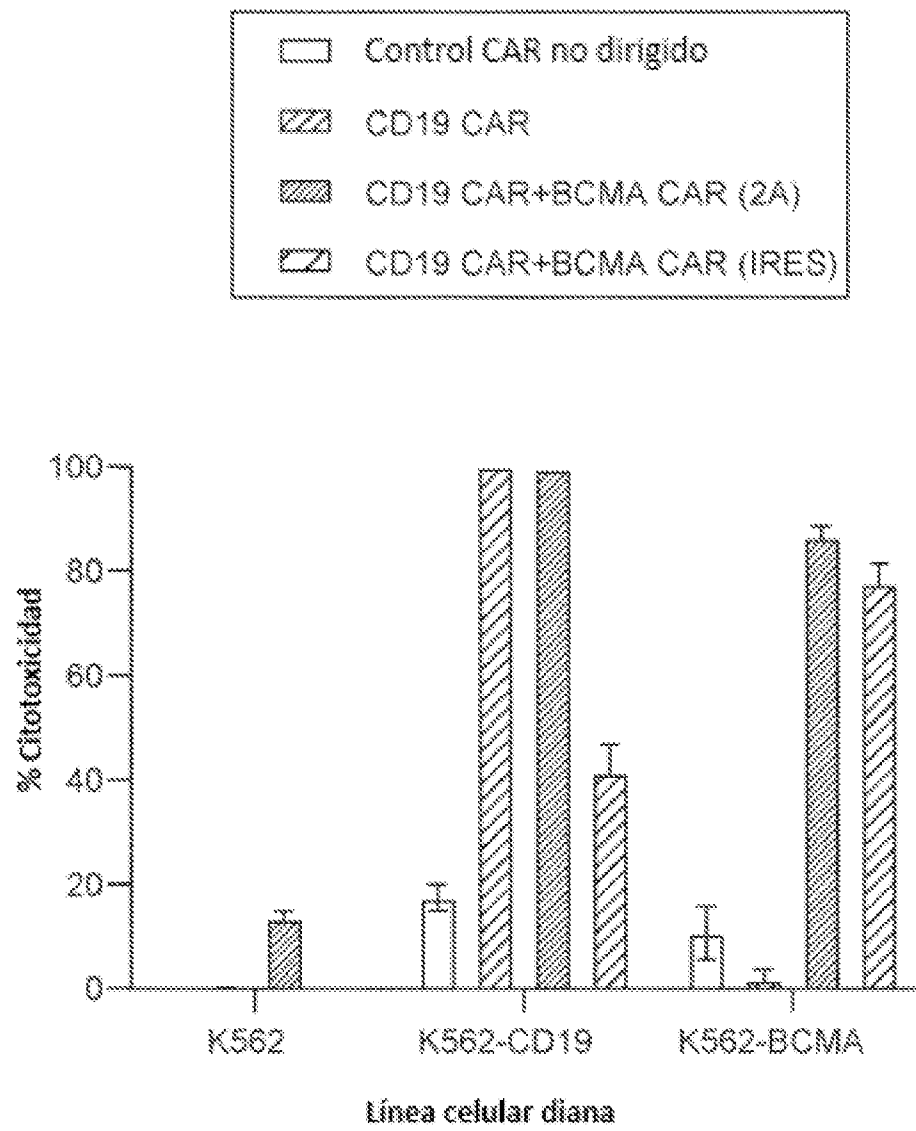


FIG. 44

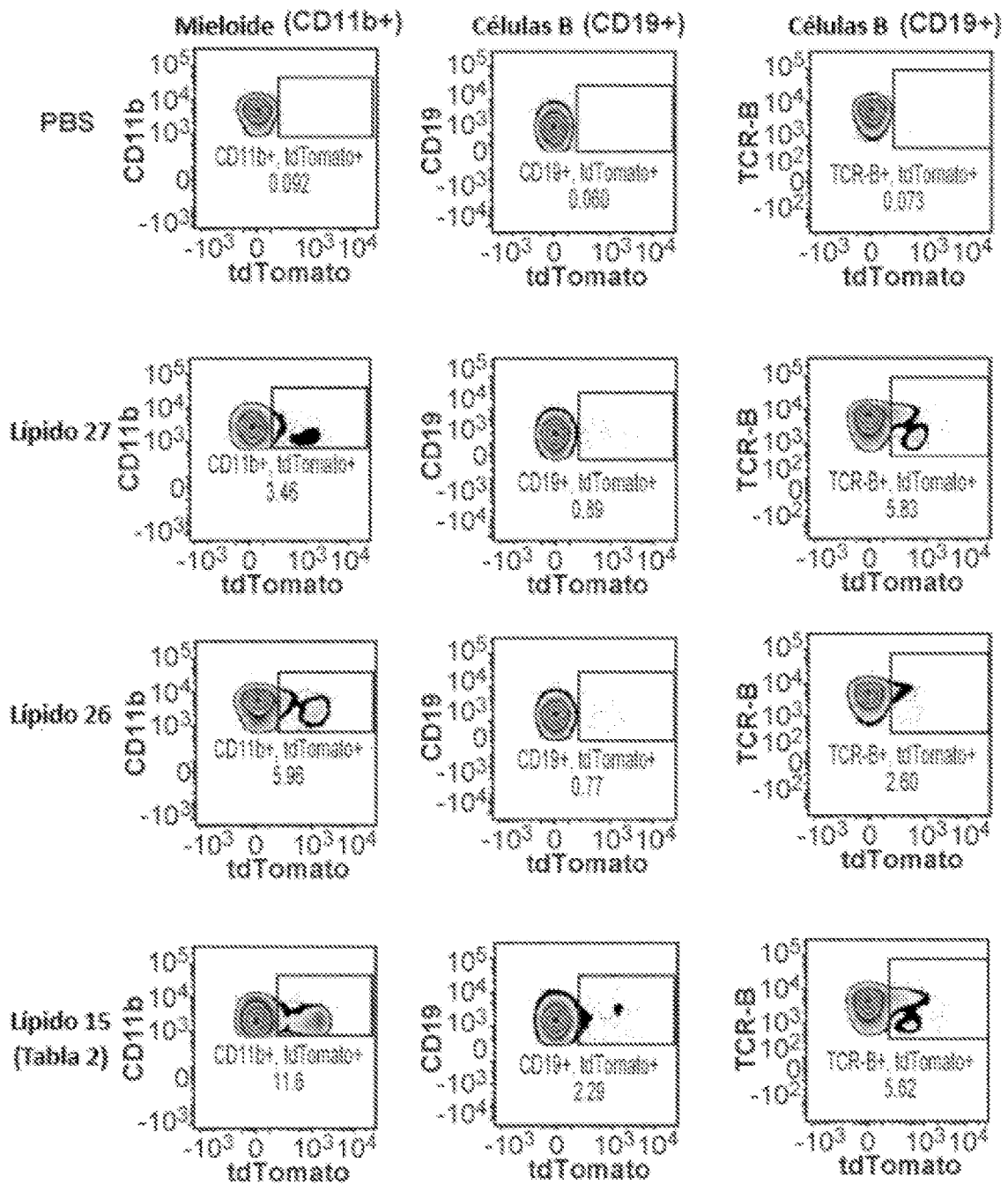


FIG. 45A

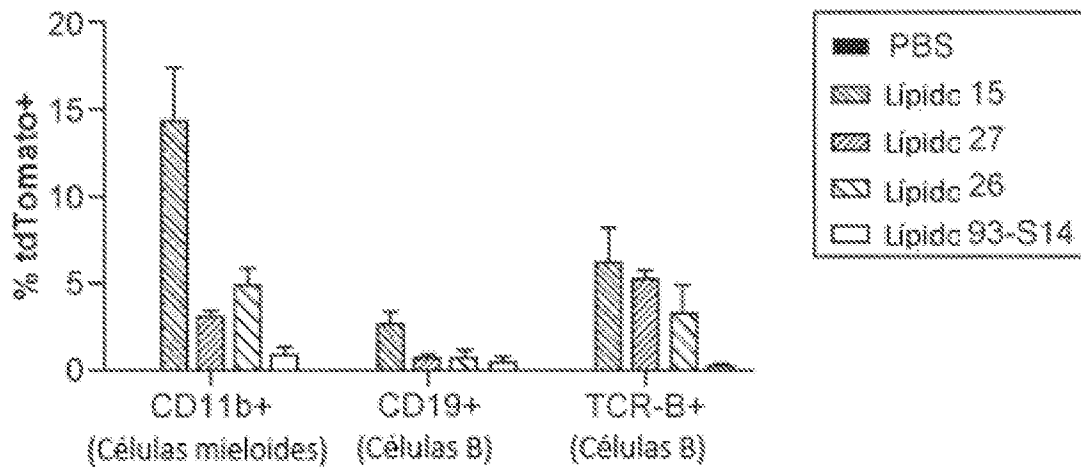


FIG. 45B

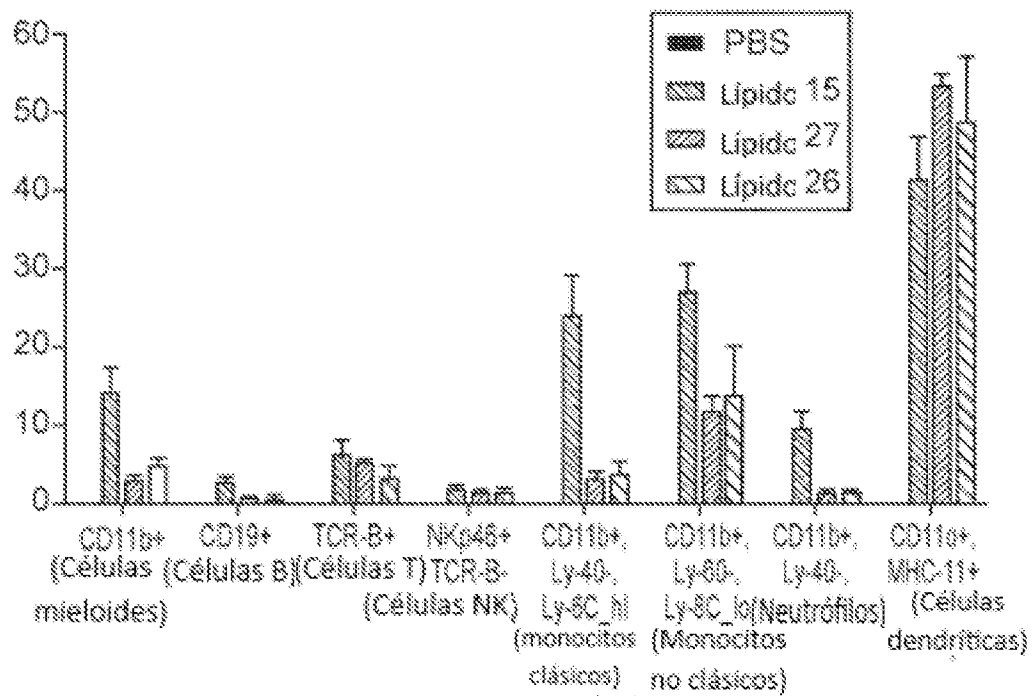


FIG. 45C



FIG. 46A

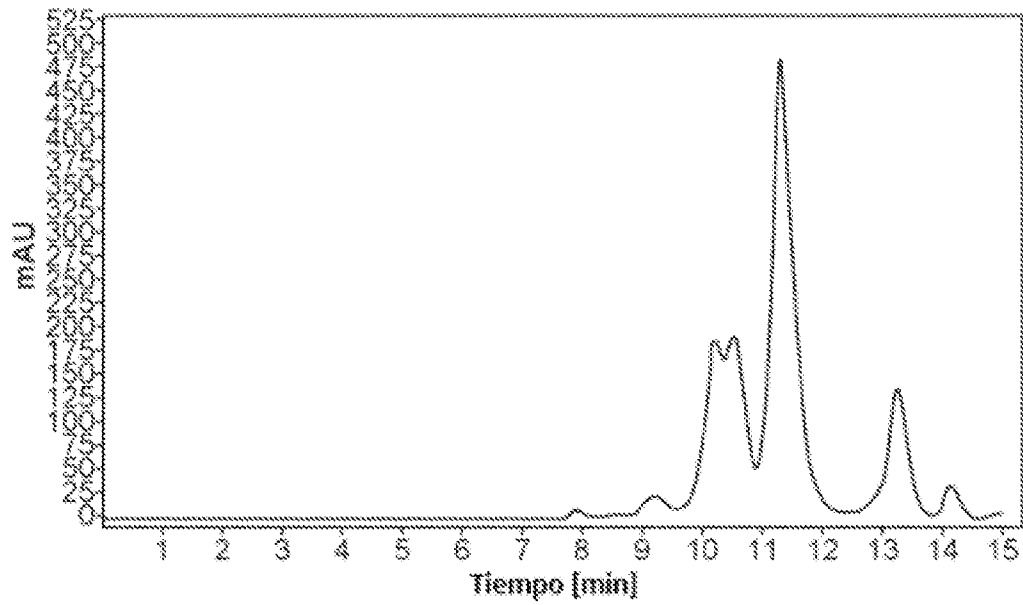


FIG. 46B

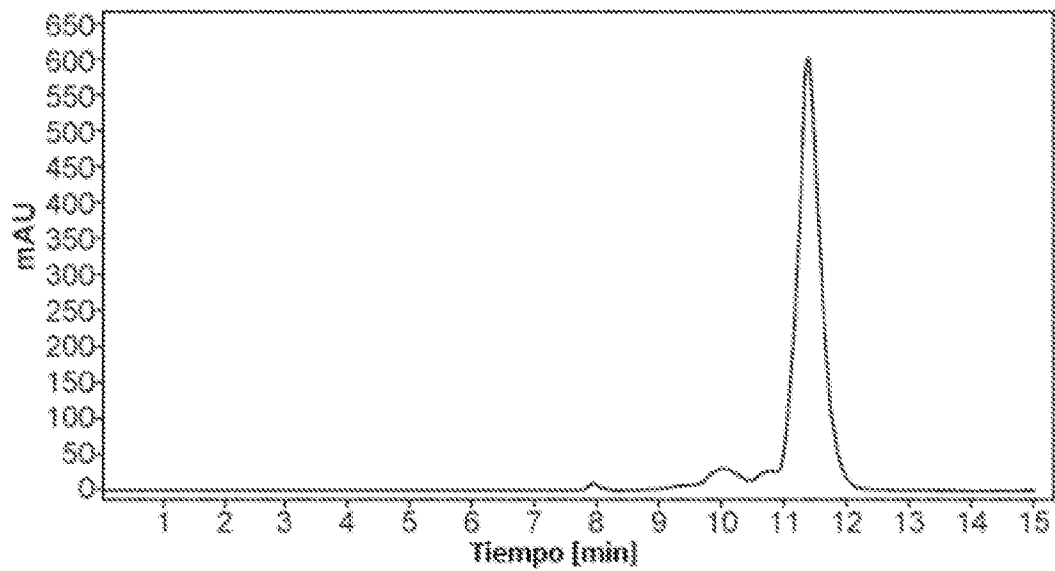


FIG. 46C

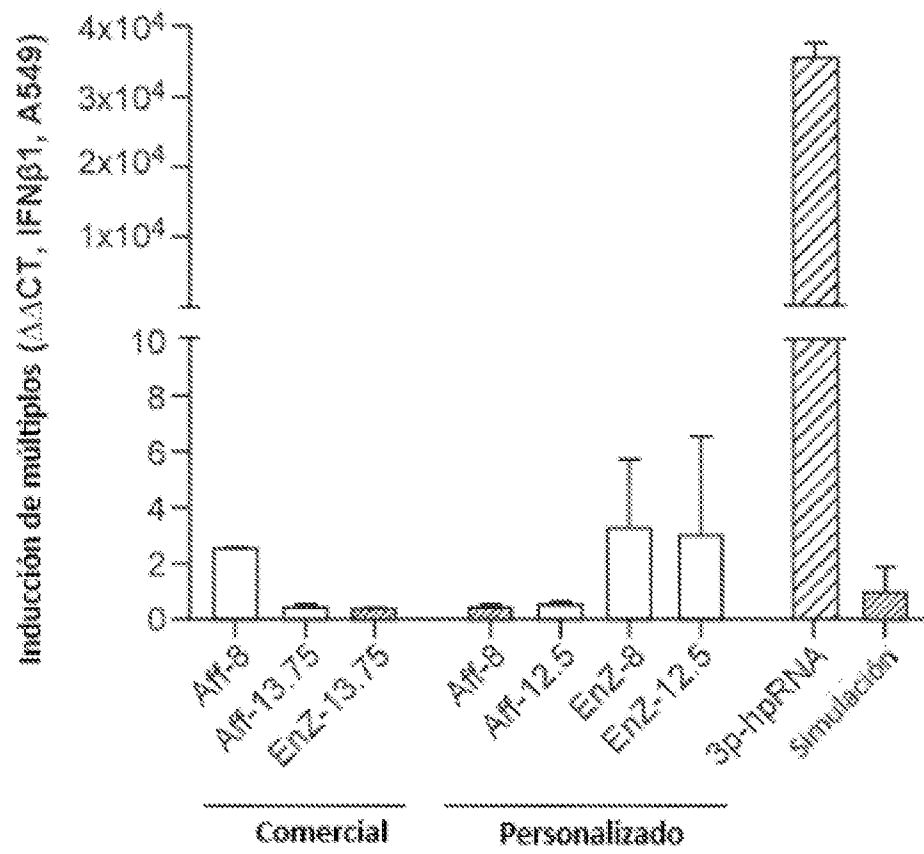


FIG. 46D

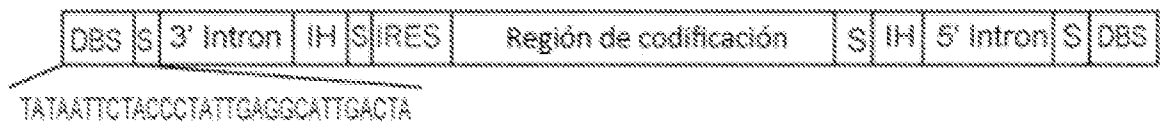


FIG. 47A

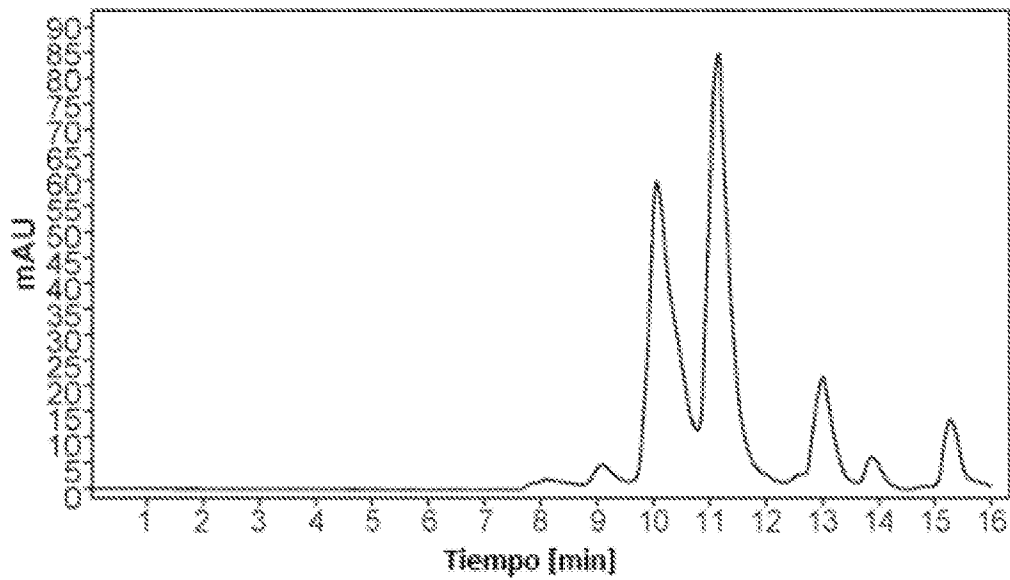


FIG. 47B

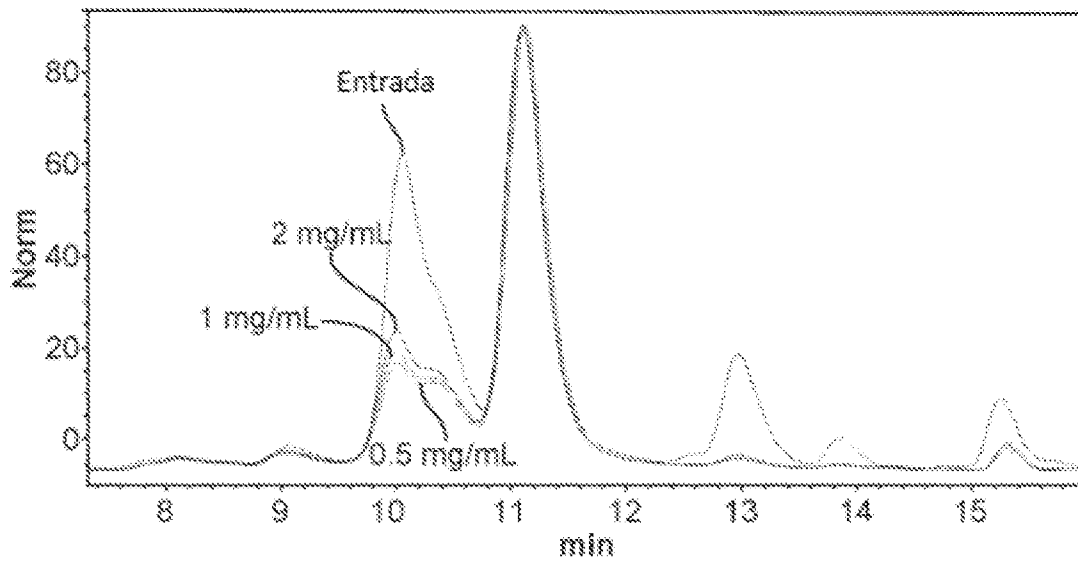


FIG. 47C

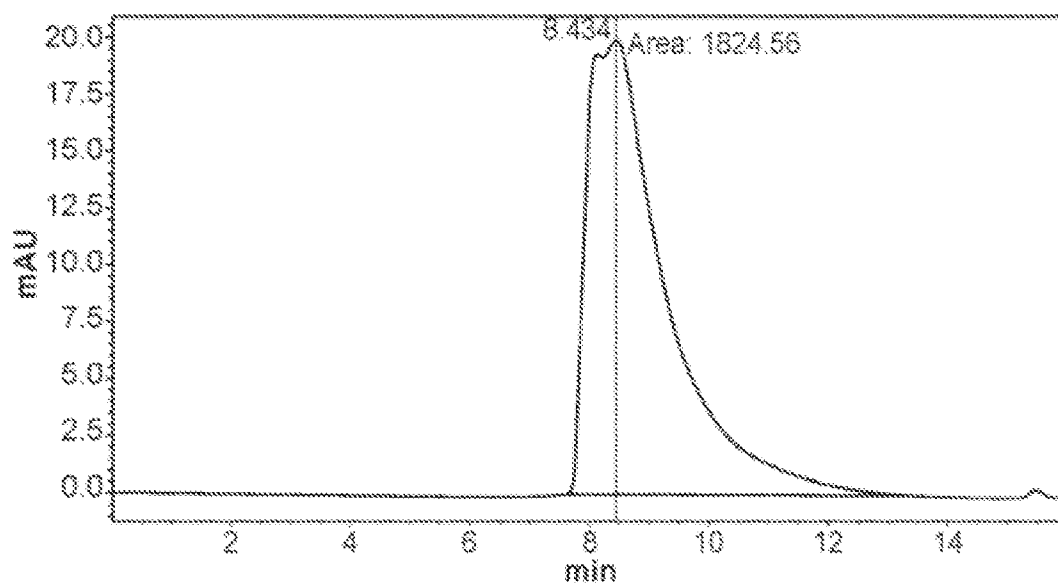


FIG. 48A

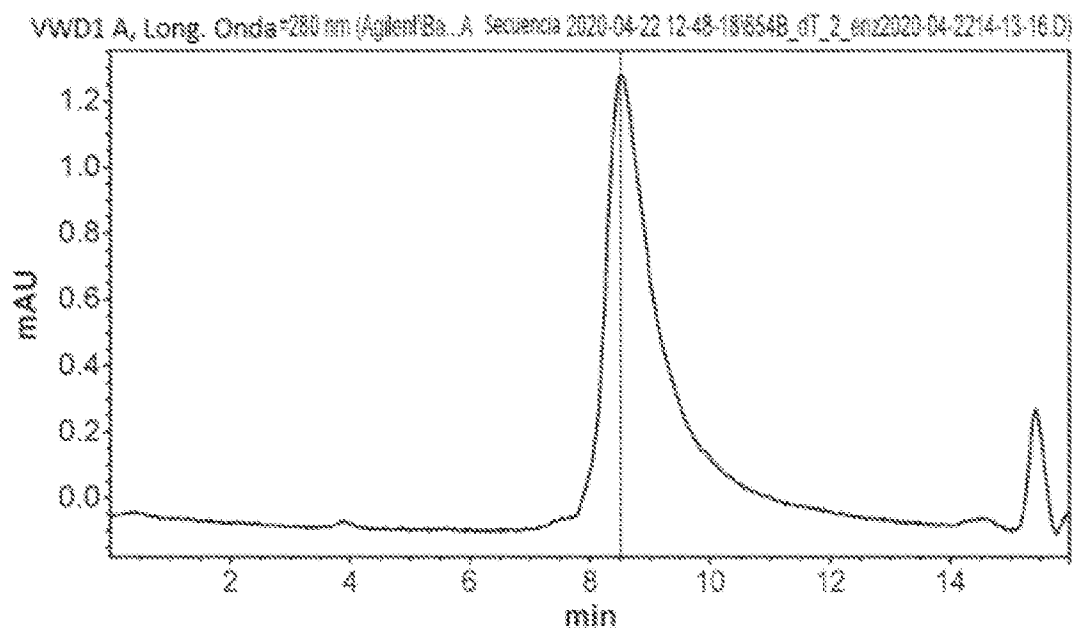


FIG. 48B

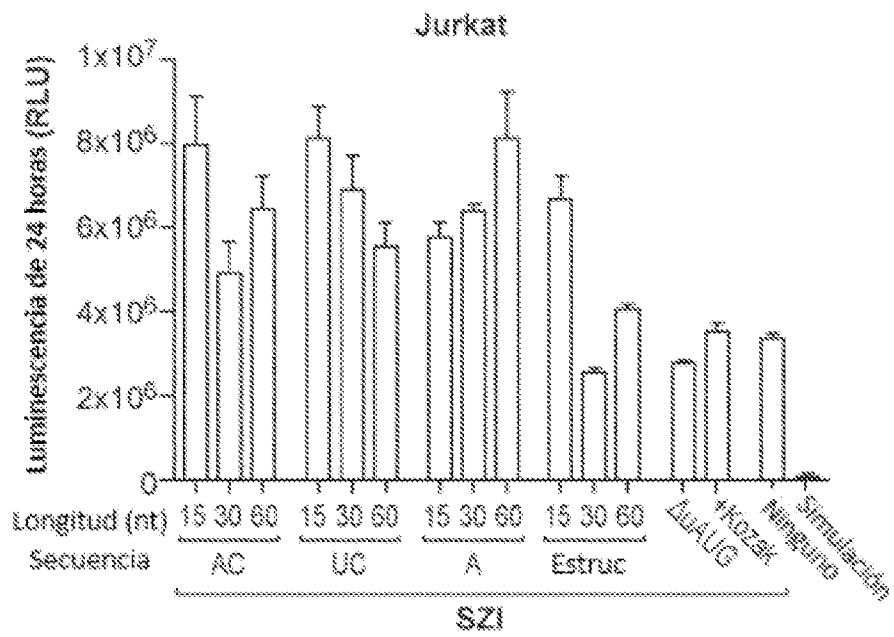


FIG. 49A

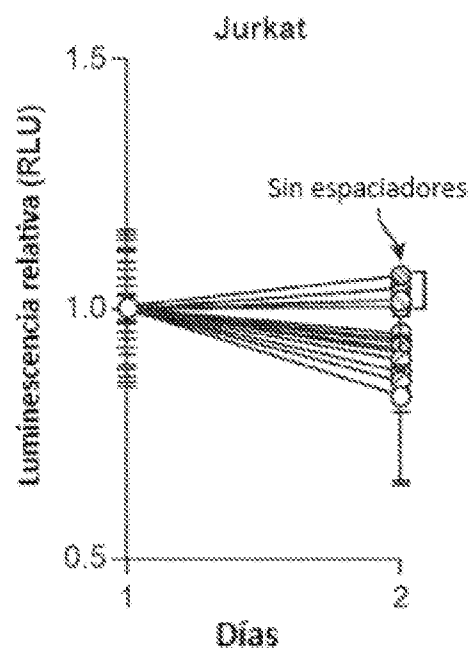


FIG. 49B

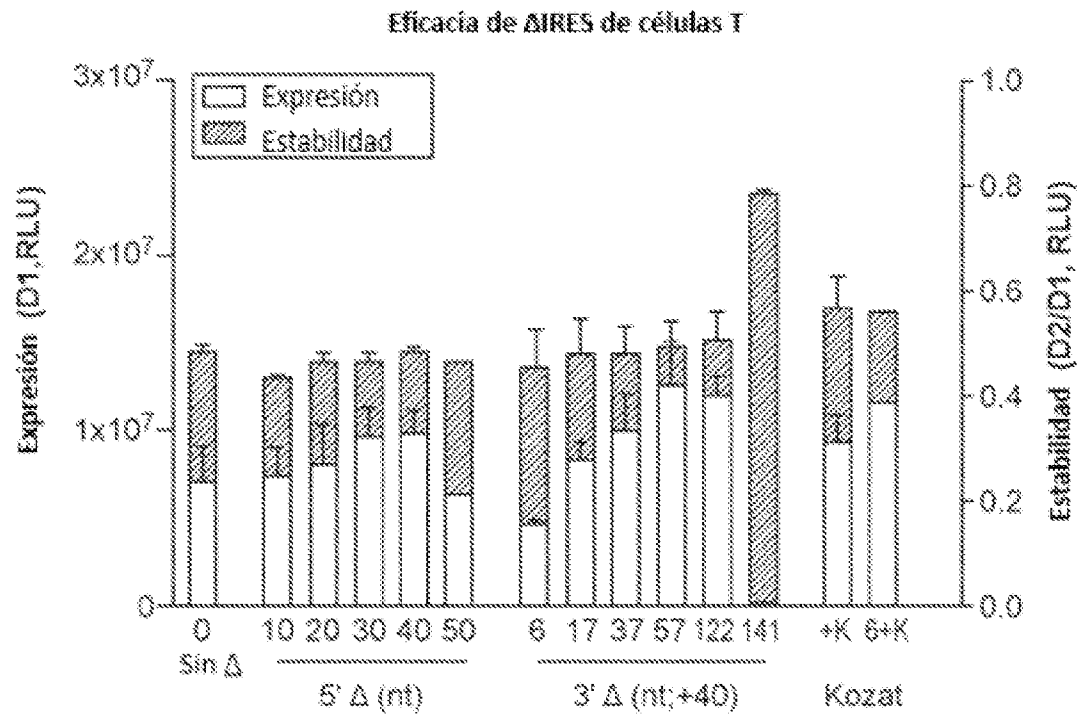


FIG. 50

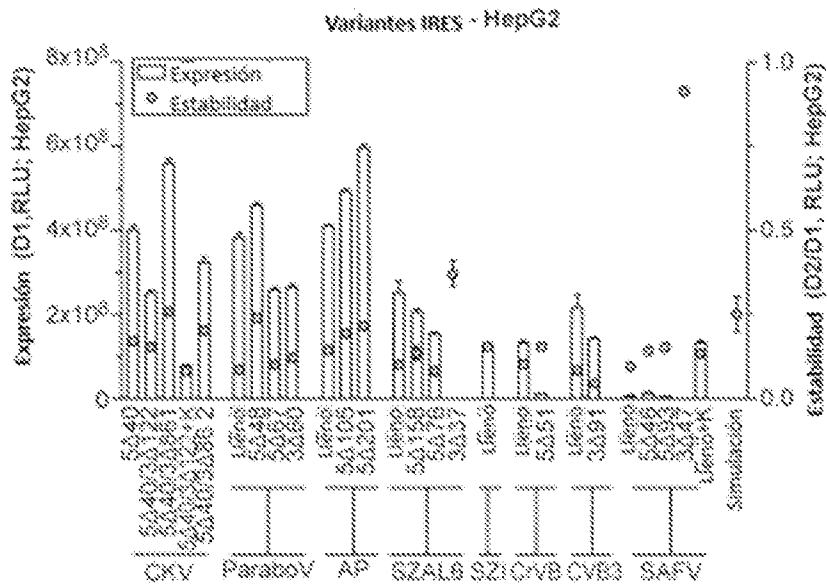


FIG. 51

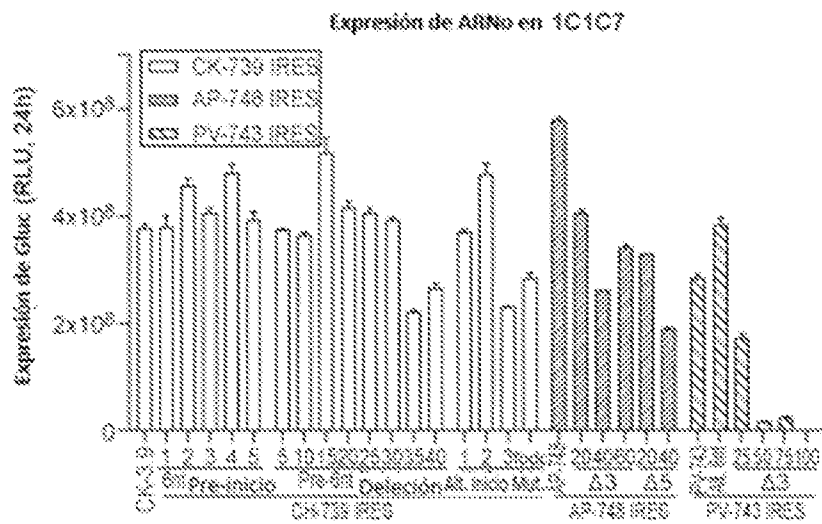


FIG. 52

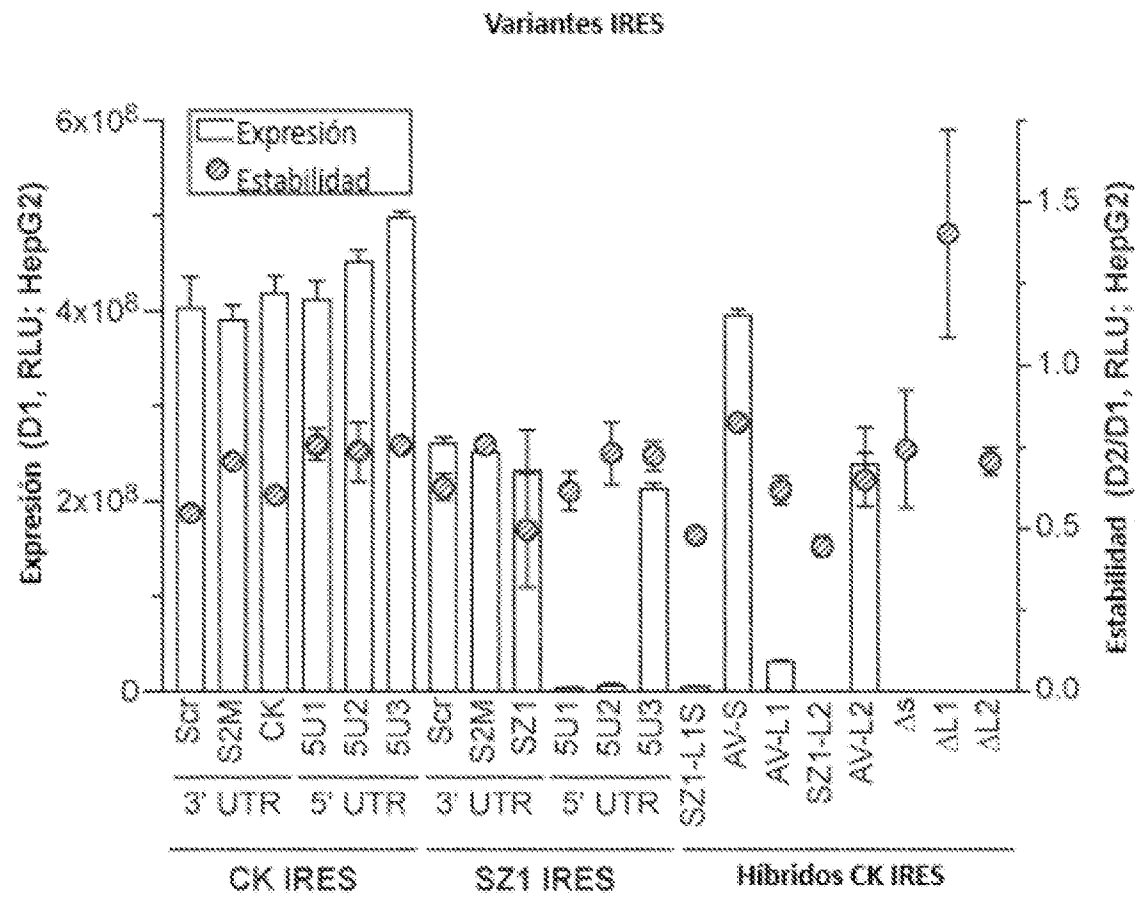


FIG. 53

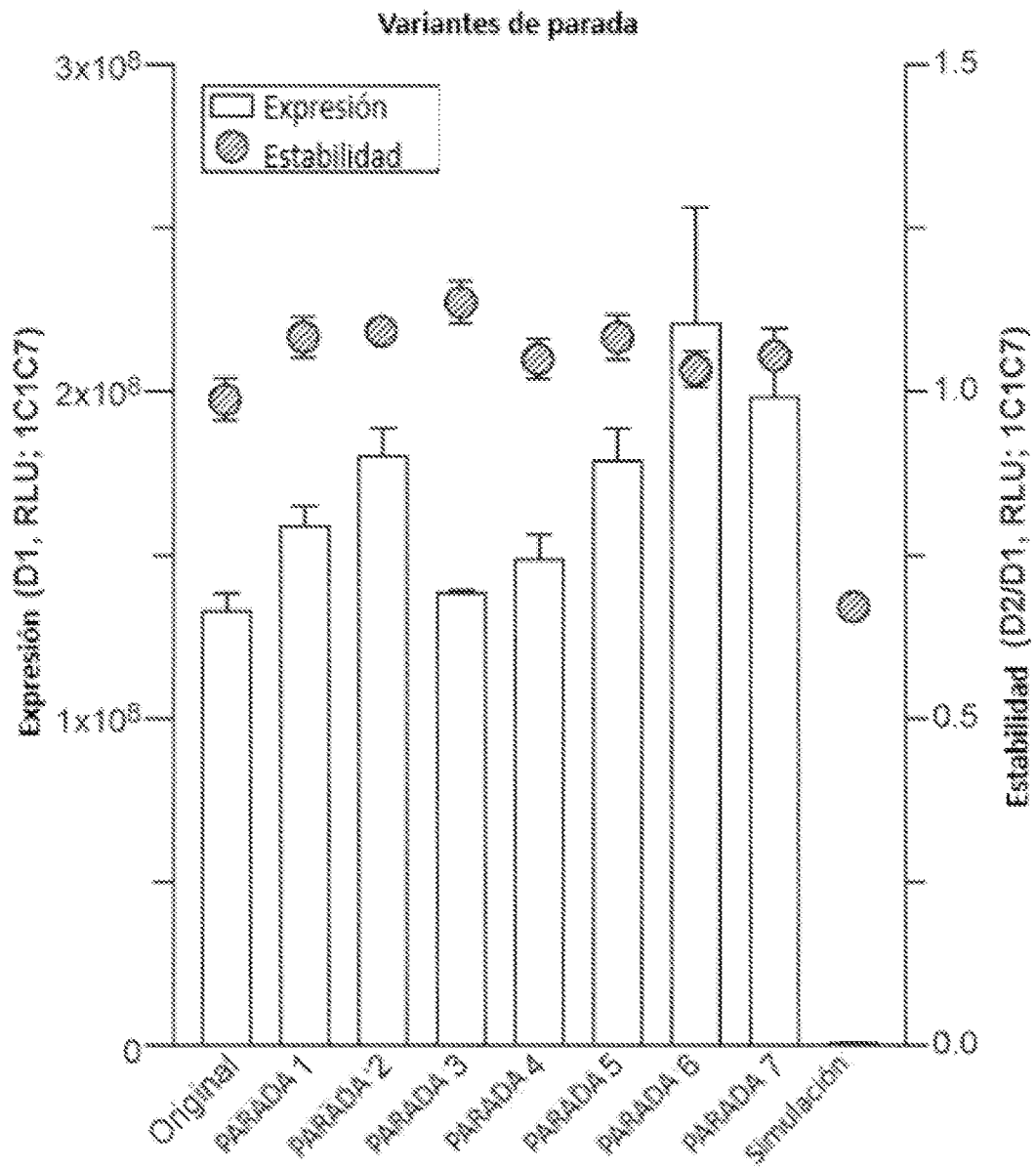


FIG. 54

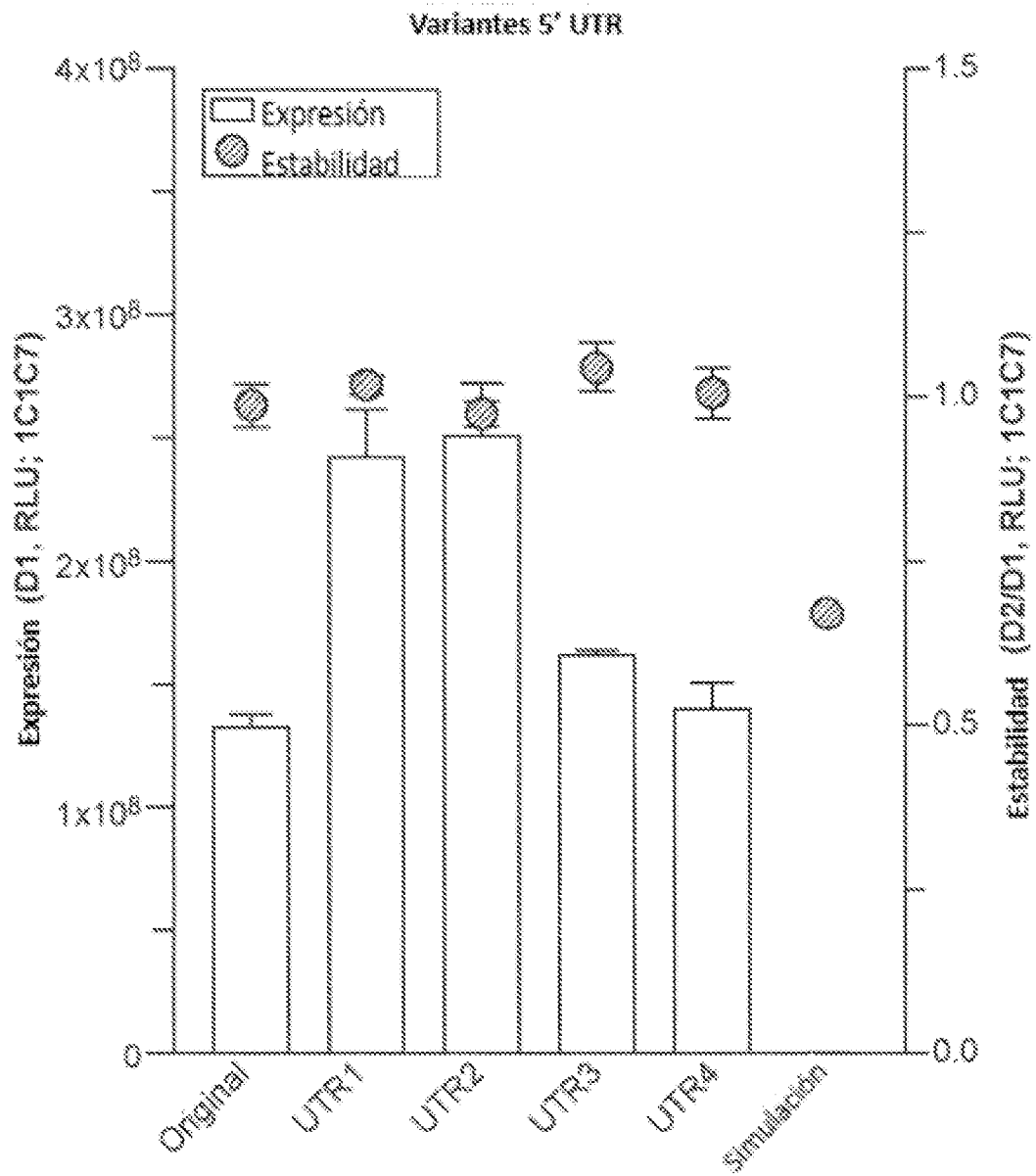


FIG. 55

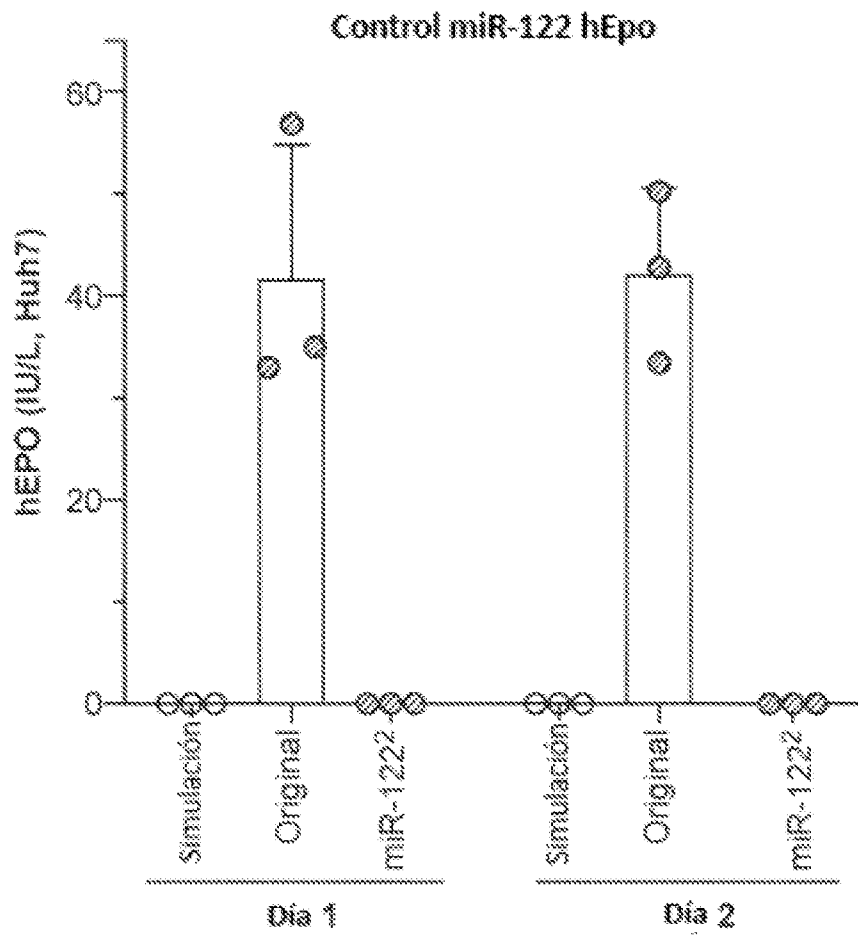


FIG. 56