

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 832**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/67** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027422**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14152513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14721635 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2970351**

54 Título: **Ácidos ribonucleicos con nucleótidos modificados con 4-tio y procedimientos relacionados**

30 Prioridad:

**14.03.2013 US 201361785098 P**

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

**26.12.2017**

73 Titular/es:

**TRANSLATE BIO, INC. (100.0%)  
200 Sidney Street, Suite 310  
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**DEROSA, FRANK y  
HEARTLEIN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 647 832 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).

**Ácidos ribonucleicos con nucleótidos modificados con 4-tio y procedimientos relacionados****Descripción****5 ANTECEDENTES**

La presente invención se refiere a ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) que comprenden restos de nucleótidos modificados con 4'-tio, a composiciones que comprenden dichos ARNm y a procedimientos para fabricar y usar los mismos.

10 Se ha propuesto la terapia génica usando ARN mensajero como abordaje para el tratamiento de diversas enfermedades. El concepto de la introducción del ARN mensajero (ARNm) como medio de producción de proteínas en un huésped se ha notificado anteriormente. Yamamoto, A. et al. Eur. J. Pharm. 71:484-489 (2009); Debus, H. et al. J. Control Rel. 148:334-343 (2010). Sin embargo, la administración exitosa de ARNm para la producción de proteínas *in vitro* típicamente requería el empaquetamiento del ARNm (tal como, por ejemplo, ARNm en complejo con un polímero o vehículo lipídico). Véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º. WO 2011/06810 y WO 2012/170930. La administración de ARNm no empaquetado (desnudo) requirió la incorporación de nucleótidos modificados químicamente dentro de un ARNm para dar como resultado un agente terapéutico más estable y beneficioso. Véase, por ejemplo, M. Kormann et al. Nature Biotech. 29:154-159 (2011); K. Kariko, Molecular Therapy 16(11):1833-1840 (2008).

La administración de ARNm que codifican una proteína terapéutica que se puede producir *in vivo* puede proporcionar ventajas significativas sobre la administración de ADN que codifica la proteína terapéutica así como la administración directa de la proteína terapéutica. Sin embargo, si bien el desarrollo de ARNm terapéuticos que codifican proteínas terapéuticas representa un avance prometedor en terapias médicas, la utilidad de tales tratamientos todavía puede verse limitada por la escasa estabilidad de los ARNm *in vivo*, particularmente aquellos que codifican proteínas de longitud completa.

En particular, la escasa estabilidad de los ARNm usados en la terapia de reemplazo génico puede dar como resultado una producción insuficiente o menos óptima de la proteína terapéutica codificada *in vivo*. Después de la administración de un ARNm que codifica una proteína terapéutica, el ARNm puede experimentar degradación, por ejemplo, al exponerse a una o más nucleasas *in vivo*. Las ribonucleasas (por ejemplo, endorribonucleasas y exorribonucleasas) representan una clase de enzimas nucleasas que son capaces de catalizar la degradación del ARN en componentes más pequeños y de ese modo hacer que el ARNm sea incapaz de producir la proteína terapéutica. Las enzimas nucleasas (por ejemplo, ARNasa) son, por lo tanto, capaces de acortar la semivida circulatoria de, por ejemplo, los ARNm preparados de forma sintética o recombinante. Después de la degradación nucleolítica, no se traduce un ARNm y, por lo tanto, se evita que ejerza un beneficio terapéutico pretendido, que puede reducir significativamente la eficacia de la terapia génica del ARNm.

**40 SUMARIO**

La presente invención proporciona un ARNm modificado mejorado para una producción proteica *in vivo* más estable, robusta y sostenida. La presente invención se basa, en parte, en la constatación de que la estabilidad del ARNm utilizado para producir proteínas terapéuticas *in vivo* puede mejorarse adicionalmente incorporando ribonucleótidos modificados en los que el oxígeno en 4' en el resto de ribosa se sustituye por un azufre. Aunque la sustitución del oxígeno en 4' en el resto de ribosa de los ribonucleótidos con un azufre ha sido notificada previamente por S. Hoshika et al. (Nuc. Ac. Res. Supp. 3:209-210 (2003)) y M. Takahashi, M. et al. (Nuc. Ac. Res. 37:1353-1362 (2009)), ambos informes han implicado a cortos segmentos sintéticos de ARN que contienen restos de 4'-tio de, como máximo, 15 restos de longitud para el ARN de interferencia; ARN cortos de 19-21 restos que comprenden nucleótidos modificados con 4'-tio también se han notificado para el ARN de interferencia (Dande et al., J. Med. Chem. 49:1624-1634 (2006)) y para desarrollar aptámeros (de hasta 59 restos de longitud; Hoshika et al., Nuc. Ac. Res. 32:3815-3825(2004); Kato et al., Nuc. Ac. Res. 33:2942-2951 (2005); Minakawa et al., Bioorg. Med. Chem. 16:9450-9456 (2008)). Además, se ha demostrado que la presencia de nucleótidos modificados con 4'-tio en fragmentos cortos de ADN (hasta 15 restos de longitud) aumenta la estabilidad de los dúplex de ARN-ADN. *in vitro* (Jones et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 7: 1275-1278 (1997)). Sin embargo, estos informes no son predictivos del efecto de incorporar 4'-tiorribonucleótidos en un ARNm de longitud completa (es decir, un ARNm que codifica una proteína terapéutica funcional de longitud completa y que contiene, opcionalmente, una o más regiones no codificantes), que generalmente tiene una longitud mucho mayor que cualquiera de los ARN de interferencia o aptámeros analizados en la técnica anterior y no existe en un estado dúplex uniforme y puede adoptar una conformación con un componente grande no helicoidal y / o monocatenario. Más importante aún, no estaba claro si los ARNm que incorporaban nucleótidos modificados con 4'-tio podrían usarse con éxito para la producción *in vivo* de proteína antes de la presente invención. Se sabe que el ribosoma interacciona con la cadena principal de azúcar-fosfato del ARNm (Huttenhofer et al. EMBO J. 13: 3892-3901 (1994)), y, por lo tanto, las modificaciones, tales como los nucleótidos modificados con 4'-tio, podrían alterar potencialmente estas interacciones. Como se describe en el presente documento, incluyendo los ejemplos, los presentes inventores han sintetizado con éxito ARNm de longitud completa que incorporan uno o más nucleótidos modificados con 4'-tio (por ejemplo, 4'-tio-ATP, 4'-tio-UTP, 4'-tio-

GTP y / o 4'-tio-CTP). A pesar de la preocupación sobre la longitud de los ARNm, los presentes inventores pudieron sintetizar ARNm de longitud completa que incorporan hasta 100 % de 4'-tio-ATP, 100 % de 4'-tio-UTP, 100 % de 4'-tio-GTP y / o 100 % 4'-tio-CTP. Como se muestra en los Ejemplos, dichos ARNm modificados son más estables que los ARNm no modificados y, sorprendentemente, tales modificaciones extensas no parecen afectar a la capacidad de los ARNm modificados para traducirse eficazmente *in vivo*.

Por consiguiente, la presente invención proporciona ARNm que permiten un mejor control sobre, por ejemplo, la estabilidad, inmunogenicidad y eficacia traduccional del ARNm, y composiciones que comprenden dichos ARNm y, opcionalmente, un vehículo, así como métodos para usar esos ARNm y composiciones. para inducir la expresión de una proteína terapéutica *in vivo* para el tratamiento de enfermedades y / o trastornos.

Específicamente, la presente invención se refiere a una molécula de ARNm que tiene una región codificante y, opcionalmente, una o más regiones no codificantes, en la que al menos el 1 % de los restos de nucleótidos del ARNm incorpora un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido.

En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado contiene al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de restos de nucleótidos que incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado contiene 100 % de restos de nucleótidos que incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado contiene hasta 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de 4'-tio-ATP. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado contiene hasta 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de 4'-tio-UTP. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado contiene hasta 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de 4'-tio-GTP. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado contiene hasta 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de 4'-tio-CTP. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado contiene una combinación de diversos NTP modificados con 4'-tio descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una región no codificante. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una cola de poli-A y / o de poli-U. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una estructura de capuchón en 5'.

En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende además al menos un residuo de nucleótido no estándar. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de nucleótido no estándar se selecciona de entre una o más de 5-metil-citidina, pseudouridina y 2-tio-uridina. En algunas realizaciones, hasta el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de restos de nucleótidos no estándar incorporan un anillo de 4'-tio-furanosa.

En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado tiene al menos 60 restos de longitud. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado tiene al menos aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000, aproximadamente 1.500, aproximadamente 2.000, aproximadamente 2.500, aproximadamente 3.000, aproximadamente 3.500, aproximadamente 4.000, aproximadamente 4.500 o aproximadamente 5.000 restos de longitud.

Realizaciones adicionales de la invención proporcionan composiciones que comprenden al menos una molécula de ARNm que tiene una región codificante y, opcionalmente, una o más regiones no codificantes, en la que al menos el 1 % de los restos de nucleótidos del ARNm incorpora un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido y un vehículo. En algunas realizaciones, una composición proporcionada comprende al menos una molécula de ARNm que tiene una región codificante y, opcionalmente, una o más regiones no codificantes, en la que al menos el 1 % de los restos de nucleótidos del ARNm incorpora un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido y un vehículo, y el ARNm tiene al menos 60 restos de longitud. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden al menos una molécula de ARNm que tiene una región codificante y, opcionalmente, una o más regiones no codificantes, en la que al menos el 1 % de los restos de nucleótidos del ARNm incorpora un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido y forma un complejo con un vehículo basado en polímero o una nanopartícula lipídica.

La invención proporciona adicionalmente composiciones que comprenden al menos una molécula de ARNm que tiene una región codificante y, opcionalmente, una o más regiones no codificantes, en la que al menos el 1 % de los restos de nucleótidos del ARNm incorpora un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido o una composición que comprende dicho ARNm y un vehículo para su uso como medicamento. También se divulgan métodos para tratar un sujeto que necesita una proteína terapéutica, que comprende administrar al menos una molécula de ARNm que tiene una región codificante y, opcionalmente, una región no codificante, en la que al menos el 1 % de los restos nucleotídicos del ARNm incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido o una composición que comprende dicho ARNm y un vehículo. En algunas realizaciones, un ARNm administrado en un método proporcionado tiene al menos 60 restos de

longitud. Diversos ARNm modificados descritos en el presente documento pueden usarse para la producción de proteínas terapéuticas o para el tratamiento de diversas enfermedades, trastornos o afecciones.

5 La presente memoria proporciona un método para producir una proteína usando un ARNm modificado descrito en el presente documento. Tal método de producción de proteínas puede usarse en un sistema libre de células *in vitro*, un sistema basado en células *in vitro* o un sistema *in vivo*. En diversas realizaciones, un ARNm adecuado comprende al menos el 1 % de los restos de nucleótidos del ARNm que incorpora un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. En algunas realizaciones, un ARNm adecuado comprende hasta aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de restos de nucleótidos (por ejemplo, ATP, CTP, GTP, UTP y/o NTP no estándar) que incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una cola de poli-A o de poli-U. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado tiene al menos 60 restos de longitud.

15 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona el uso de una molécula de ARNm proporcionada para la fabricación de un medicamento que es capaz de producir una proteína terapéutica *in vivo*.

20 En algunas otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para fabricar un ARNm proporcionado. En algunas otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para la síntesis *in vitro* de un ARNm proporcionado. En algunas otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para fabricar (por ejemplo, sintetizar *in vitro*) un ARNm proporcionado que contiene hasta aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de restos de nucleótidos (por ejemplo, ATP, CTP, GTP, UTP y/o NTP no estándar) que incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. En algunas otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para fabricar (por ejemplo, sintetizar *in vitro*) un ARNm proporcionado de al menos 25 aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 1.000, aproximadamente 1.500, aproximadamente 2.000, aproximadamente 2.500, aproximadamente 3.000, aproximadamente 3.500, aproximadamente 4.000, aproximadamente 4.500, o aproximadamente 5.000 restos de longitud.

30 En la siguiente descripción se expondrán en parte objetos y ventajas adicionales de la invención y en parte serán obvios a partir de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se realizarán y conseguirán por medio de los elementos y combinaciones destacadas particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

35 Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son ejemplos y explicaciones únicamente y no son restrictivas de la invención reivindicada. Los dibujos adjuntos ilustran varias realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar adicionalmente los principios de la invención.

#### 40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos son solo para fines ilustrativos, no limitativos.

45 La Figura 1 muestra estructuras moleculares de bases 4'-tioARN de ejemplo: 4'-tio-adenosina, 4'-tio-guanosina, 4'-tio-citidina, 4'-tio-uridina, 4'-tio-5-metil- citidina, 4'-tio-pseudouridina y 4'-tio-2-tiouridina.

La figura 2 muestra la detección de luciferasa a partir de la producción de luciferasa de FFL en células HEK 293T después de la transfección de ARNm de FFL modificado y no modificado.

50 La figura 3 muestra los resultados de un estudio de estabilidad de ARNm de FFL modificado y no modificado.

La figura 4 muestra la detección de luciferasa a partir de la producción de luciferasa de FFL en hígado de ratón después de la administración de ARNm de FFL modificado y no modificado.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 Como se usa en el presente documento, el término "ARNm" se usa para hacer referencia a un ARN modificado y / o no modificado que incluye una región codificante y, opcionalmente, una región no codificante. El término "región codificante" se refiere a una porción o región del ARNm que se puede traducir en una cadena de aminoácidos, es decir, dos o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Una cadena de aminoácidos también se denomina péptido o polipéptido, que puede plegarse en una proteína (por ejemplo, una proteína terapéutica). El término "región no codificante" se refiere a una porción o región del ARNm que típicamente no están traducidas. La región no codificadora típicamente incluye una región 5' no traducida y / o una región 3' no traducida, que incluye, pero no se limita a las mismas, una cola de poli (A) o de poli (U).

65 Una "base nucleotídica estándar" es un resto de base distinto de las bases naturales adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) o uracilo (U). La base nucleotídica no estándar es un análogo de una base nucleotídica específica (A, C, G, T o U) cuando sus propiedades de apareamiento de bases en una doble hélice de ácido

nucleico y el locus de incorporación mediante ADN o ARN polimerasas en una doble hélice de ácido nucleico (incluyendo una hélice de ARN-ADN local, tal como la formada durante la transcripción de un molde de ADN mediante ARN polimerasa) son muy similares a una de las cinco bases nucleotídicas enumeradas anteriormente, con la excepción de que los análogos de T generalmente también serán análogos de U y al contrario. El término "no estándar" usado junto con términos que incluyen, pero no se limitan a, "nucleósido", "base", "nucleótido" o "resto" debe interpretarse de la misma manera que si se utilizara junto con "base nucleotídica".

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína terapéutica" incluye cualquier proteína que, si se administra a un sujeto, proporciona un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del sujeto. En algunas realizaciones, una deficiencia, falta de, o expresión aberrante de esa proteína en un sujeto da lugar a una enfermedad o afección. "Proteína terapéutica" también puede referirse a una proteína que normalmente no está presente o que normalmente no está presente en cantidades suficientes en un sujeto para lograr un efecto terapéutico deseado.

La expresión "lípidos auxiliares", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material lipídico neutro o zwitteriónico que incluye colesterol. Sin desear quedar ligado a una teoría en particular, los lípidos auxiliares pueden añadir estabilidad, rigidez y / o fluidez dentro de las bicapas / nanopartículas lipídicas.

Los ARNm de la invención emplean bases modificadas químicamente específicas, en las que el oxígeno en 4' en el resto ribosa de un resto de nucleótido se reemplaza por azufre, para la sustitución en una molécula de ácido ribonucleico mensajero para mejorar sus propiedades biológicas tras la administración a un sujeto. Ejemplos de restos de nucleótidos modificados con 4'-tio para la incorporación en un ARNm de la invención se representan en la figura 1 (que muestra restos de nucleótidos modificados que contienen un anillo de furanosas tio-sustituido). En algunas realizaciones, la modificación 4'-tio del anillo de furanosas proporciona resistencia mejorada a exonucleasas, endonucleasas y / u otras enzimas de degradación de ARN en suero humano.. Dicha estabilidad puede proporcionar al ARN una semivida aumentada. Por tanto, por ejemplo, la administración de un ARNm que tiene una modificación 4'-tio en el anillo de furanosas o una composición que comprende dicho ARNm da como resultado la captación celular de un ARNm que tiene propiedades biológicas mejoradas, por ejemplo, semivida aumentada, que, a su vez, contribuye a un aumento de la producción de proteínas *in vivo*. Específicamente, la invención se refiere a una molécula de ARNm que tiene una región codificante y, opcionalmente, una o más regiones no codificantes, en la que al menos el 1 % de los residuos de nucleótidos del ARNm incorpora un anillo de furanosas 4'-tio-sustituido.

En ciertas realizaciones, al menos el 1 % de los restos de nucleótidos de adenosina en el ARN tiene una modificación 4'-tio en el anillo de furanosas. Por ejemplo, aproximadamente el 1-5 %, 5-15 %, 15-30 %, 30-50 %, 50-75 %, 75-90 %, 90-99 % o 99-100 % de la adenosina en el ARNm puede ser 4'-tio-adenosina.

En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de los restos de adenosina en el ARNm son 4'-tio-adenosina. En algunas realizaciones, aproximadamente el 100 % de los restos de adenosina en el ARNm son 4'-tio-adenosina.

En ciertas realizaciones, al menos el 1 % de los restos de nucleótidos de guanosina en el ARN tiene una modificación 4'-tio en el anillo de furanosas. Por ejemplo, aproximadamente el 1-5 %, 5-15 %, 15-30 %, 30-50 %, 50-75 %, 75-90 %, 90-99 % o 99-100 % de la guanosina en el ARNm puede ser 4'-tio-guanosina.

En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de los restos de guanosina en el ARNm son 4'-tio-guanosina. En algunas realizaciones, aproximadamente el 100 % de los restos de guanosina en el ARNm son 4'-tio-guanosina.

En ciertas realizaciones, al menos el 1 % de los restos de nucleótidos de uridina en el ARN tiene una modificación 4'-tio en el anillo de furanosas. Por ejemplo, aproximadamente el 1-5 %, 5-15 %, 15-30 %, 30-50 %, 50-75 %, 75-90 %, 90-99 % o 99-100 % de la uridina en el ARNm puede ser 4'-tio-uridina.

En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de los restos de uridina en el ARNm son 4'-tio-uridina.

aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de los restos de uridina en el ARNm son 4'-tio-uridina. En algunas realizaciones, aproximadamente el 100 % de los restos de uridina en el ARNm son 4'-tio-uridina.

5 En ciertas realizaciones, al menos el 1 % de los restos de nucleótidos de citidina en el ARN tiene una modificación 4'-tio en el anillo de furanosa. Por ejemplo, aproximadamente el 1-5 %, 5-15 %, 15-30 %, 30-50 %, 50-75 %, 75-90 %, 90-99 % o 99-100 % de la citidina en el ARNm puede ser 4'-tio-citidina.

10 En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de los restos de citidina en el ARNm son 4'-tio-citidina. En algunas realizaciones, aproximadamente el 100 % de los restos de citidina en el ARNm son 4'-tio-citidina.

20 En algunas realizaciones, cada nucleótido 4'-tio-modificado en un ARNm proporcionado es 4'-tio-uridina. En algunas realizaciones, cada nucleótido 4'-tio-modificado en un ARNm proporcionado es 4'-tio-citidina. En algunas realizaciones, cada nucleótido 4'-tio-modificado en un ARNm proporcionado es, independientemente, 4'-tio-uridina o 4'-tio-citidina. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más 4'-tio-uridina o 4'-tio-citidina. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende además al menos un resto de 4'-tio-adenosina. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende además al menos un resto de 4'-tio-guanosina. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende además al menos un resto de 4'-tio-guanosina o 4'-tio-adenosina. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más restos de 4'-tio-guanosina o 4'-tio-adenosina.

30 En ciertas realizaciones, la fracción de restos de nucleótidos con una modificación 4'-tio en el anillo de furanosa de un tipo base (por ejemplo, adenosina, guanosina, uridina o citidina) varía independientemente de la fracción de restos de nucleótidos modificados de los otros tipos de bases.

35 En ciertas realizaciones, menos del 10 % de los restos de nucleótidos en el ARN tiene una modificación 4'-tio en el anillo de furanosa. Por ejemplo, aproximadamente 1-5 %, 5-10 %, 3-5 %, 1-3 %, 0.1-1 %, o 0.01-0.1 % de los restos de nucleótidos pueden incorporar un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido.

40 En otras realizaciones, más del 10 % de los restos de nucleótidos en el ARN tiene una modificación 4'-tio en el anillo de furanosa. Por ejemplo, aproximadamente 10-15 %, 15-20 %, 20-25 %, 25-30 %, 30-35 %, 35-40 %, 40-45 % o 45-50 % de los restos de nucleótidos pueden incorporar un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. En algunas realizaciones, más del 50 % de los restos de nucleótidos tiene una modificación 4'-tio-ARN en el anillo de furanosa. Por ejemplo, aproximadamente el 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, 95-100 %, 95-97 %, 97-98 %, 98-99 %, 99-99,9 %, o 99,9-100 % de los restos de nucleótidos incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido.

45 En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de los residuos de nucleótidos pueden incorporar un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. En algunas realizaciones, aproximadamente el 100 % de residuos de nucleótidos puede incorporar un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido.

50 Las regiones codificantes y no codificantes en los ARNm de la invención pueden abarcar regiones de secuencia no contiguas. Las regiones no codificantes opcionales pueden incluir una o más de una región 5' no traducida (UTR), una 3' UTR, una cola de poli-A, poli-U o poli-C y / o una estructura de capuchón en 5'. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una región no codificante. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una 5' UTR. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una 3' UTR. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una estructura de capuchón en 5'. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una cola de poli-A. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una secuencia de 5'-UTR, una secuencia 3'-UTR y una cola de poli-A. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una secuencia de 5'-UTR, una región codificante, una secuencia 3'-UTR y una cola de poli-A. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una secuencia de 5'-UTR, un capuchón en 5', una secuencia 3'-UTR y una cola de poli-A. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende una secuencia de 5'-UTR, un capuchón en 5', una región codificante, una secuencia 3'-UTR y una cola de poli-A.

65 En ciertas realizaciones, la cola de poli-A, poli-U o poli-C comprende restos de nucleótidos que incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. En algunas realizaciones, solo la cola de poli-A, poli-U o poli-C u otros componentes de la región no codificante incorporan restos de nucleótidos que tienen una sustitución 4'-tio en el

anillo de furanosa, mientras que el resto de los restos de nucleótidos en la molécula de ARNm no contiene una modificación 4'-tio-furanosa. En algunas realizaciones, la región codificante comprende restos de nucleótidos que incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. En ciertas realizaciones, tanto las regiones codificantes como las no codificantes (si están presentes) incorporan restos de nucleótidos que tienen una sustitución 4'-tio en el anillo de furanosa. En ciertas realizaciones, la longitud de la cola de poli-A, poli-U o poli-C puede variar. Por ejemplo, la longitud de la cola de poli-A, poli-U o poli-C puede ser de al menos aproximadamente 50, 70, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la longitud de la cola de poli-A, poli-U o poli-C es menor que aproximadamente 50, 70, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 o 500 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la molécula de ARNm puede incluir modificaciones además de un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. Por ejemplo, la molécula puede incorporar cualquier base nucleotídica no estándar. Ciertas realizaciones pueden incluir modificaciones de restos de nucleótidos tales como 5-metil-citidina ("5mC"), pseudouridina ("ψU"), 2-tio-uridina ("2sU"), 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina citosina, así como combinaciones de estas modificaciones y otras modificaciones de restos de nucleótidos. Ciertas realizaciones pueden incluir además modificaciones adicionales al anillo de furanosa u otras partes del resto de nucleótido, por ejemplo, la base nucleotídica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede incluir un anillo de furanosa 4'-tio sustituida dentro de una base no modificada o modificada tal como, por ejemplo, pseudouridina, 2-tiouridina y 5-metilcitidina. En ciertas realizaciones, cualquiera de estas modificaciones puede estar presente en 0-100 % de los restos de nucleótidos, por ejemplo, más de 0 %, 1 %, 10 %, 50 %, 90 % o 95 % o 100 % de los restos de nucleótidos individualmente o en combinación. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado comprende al menos un residuo de nucleótido no estándar. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de nucleótido no estándar se selecciona de entre una o más de 5-metil-citidina, pseudouridina y 2-tio-uridina. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de nucleótido no estándar en 5-metil-citidina. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de nucleótido no estándar incorpora un anillo de 4'-tio-furanosa. En algunas realizaciones, hasta el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de residuos de nucleótidos no estándar incorporan un anillo de 4'-tio-furanosa.

Las modificaciones adicionales pueden incluir, por ejemplo, modificaciones o sustituciones de azúcar (por ejemplo, una o más de una modificación de 2'-O-alquilo, un ácido nucleico bloqueado (LNA)). En realizaciones en las que la modificación de azúcar es una modificación de 2'-O-alquilo, dicha modificación puede incluir, pero sin limitación, una modificación 2'-desoxi-2'-fluoro, una modificación de 2'-O-metilo, una modificación de 2'-O-metoxietilo y una modificación de 2'-dodoxilo.

En ciertas realizaciones, 0-100 % del ARNm puede ser monocatenario. En ciertas realizaciones, 0-100 % del ARN puede adoptar una conformación no helicoidal.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden ARNm en los que aproximadamente el 100 % de los restos de uridina se reemplazan por 4'-tio-uridina.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden ARNm en los que aproximadamente el 100 % de los restos de uridina se reemplazan por 4'-tio-uridina y aproximadamente el 100 % de los restos de citidina se reemplazan por 5-metil-citidina.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden ARNm en los que aproximadamente el 100 % de los restos de uridina se reemplazan por 4'-tio-pseudouridina.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden ARNm en los que aproximadamente el 100 % de los restos de uridina se reemplazan por 4'-tio-pseudouridina y aproximadamente el 100 % de los restos de citidina se reemplazan por 5-metil-citidina.

En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado proporciona un efecto biológico beneficioso, por ejemplo, pero sin limitación, una mayor estabilidad, una tasa de producción de proteínas mejorada, y / o un mayor rendimiento de proteínas, cuando se compara con un ARNm natural correspondiente. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado tiene una estabilidad incrementada (por ejemplo, una semivida en suero más larga) cuando se administra *in vivo*, en comparación con un ARNm natural correspondiente (es decir, un ARNm correspondiente sin modificación).

El ARNm de la invención puede ser más resistente a la degradación por nucleasas (por ejemplo, endonucleasa) en un grado que da como resultado un aumento de la cantidad de la proteína terapéutica traducida a partir del transcrito de ARNm tras la administración a un sujeto en al menos aproximadamente el 2,5 %, 5 %, 7.5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 33 %, 36 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 100 %, 110 %, 120 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 750 %, 800 %, 900 %, o 1.000 %, en comparación con un ARNm correspondiente sin modificación.

En ciertas realizaciones, la longitud de la molécula de ARNm modificada en las composiciones de la invención tiene al menos 200 restos de nucleótidos de longitud. Por ejemplo, el ARNm puede tener al menos

aproximadamente 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 o 5000 restos de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado tiene al menos 60 restos de longitud. En algunas realizaciones, un ARNm proporcionado tiene al menos aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1,000, aproximadamente 1,500, aproximadamente 2,000, aproximadamente 2,500, aproximadamente 3,000, aproximadamente 4,000, aproximadamente 5,000, aproximadamente 6,000 o aproximadamente 7000 restos de longitud.

En algunas realizaciones de la invención, la proteína terapéutica codificada por los ARNm de la invención puede ser cualquier proteína en la que una deficiencia, falta de, o expresión aberrante de esa proteína da lugar a una enfermedad y / o afección. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica puede ser una enzima. En otras realizaciones, la proteína terapéutica es una que normalmente no está presente o que no está presente normalmente en cantidades suficientes en un sujeto para lograr el efecto terapéutico deseado.

Por ejemplo, una selección no limitante de proteínas terapéuticas adecuadas incluye eritropoyetina, insulina, hormona del crecimiento humano, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), insulina, alfa-galactosidasa A, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparán sulfamidasa, hialuronidasa, galactocerebrosidasa, omítina transcarbamilasa (OTC), carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS 1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL), arginasa 1 (ARG1), glucosa-6-fosfatasa, glucosa-6-fosfato translocasa, enzima desramificante de glucógeno, alfa-glucosidasa lisosomal, enzima ramificante de 1,4-alfa-glucano, glucógeno fosforilasa, fosfofructocinasa, fosforilasa hepática, GLUT-2, UDP glucógeno sintasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfato sulfatasa, heparán sulfato sulfamidasa, alfa-N-acetilglucosa amidasa, alfa-glucosaminid-N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, apolipoproteína E, receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), factores de coagulación, tal como, por ejemplo, factor VIII y factor IX, neurona motora espinal 1 (SMN1), fenilalanina hidroxilasa, propionil-CoA carboxilasa, porfobilinógeno desaminasa, metilmalonil-CoA mutasa, urato oxidasa, inhibidor de la C1 esterasa y ácido alfa-glucosidasa.

En ciertas realizaciones, las moléculas de ARNm de la invención se pueden administrar como ARNm desnudo o sin empaquetar. En algunas realizaciones, la administración del ARNm en las composiciones de la invención se puede facilitar mediante la inclusión de un vehículo adecuado. En ciertas realizaciones, el vehículo se selecciona basándose en su capacidad para facilitar la transfección de una célula diana con uno o más ARNm.

Como se usa en el presente documento, el término "vehículo" incluye cualquiera de los vehículos, diluyentes, excipientes y similares farmacéuticamente estándar que generalmente están destinados para su uso en conexión con la administración de agentes biológicamente activos, incluyendo ARNm. Las composiciones y, en particular, los vehículos descritos en el presente documento, son capaces de administrar y / o estabilizar ARNm de diferentes tamaños a sus células o tejidos diana. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden vehículos que son capaces de administrar ARNm grandes (por ejemplo, ARNm de al menos 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa o más, o de al menos 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500, 5,000, 5,500, 6,000, 6,500 o 7,000 restos en longitud). Los ARNm de acuerdo con la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con cualquiera de diversos métodos conocidos. Por ejemplo, los ARNm de acuerdo con la presente invención se pueden sintetizar mediante transcripción *in vitro* (IVT). Brevemente, la IVT se realiza típicamente con un molde de ADN lineal o circular que contiene un promotor, una combinación de ribonucleótido trifosfatos que incluye la cantidad o cantidades deseadas de ribonucleótidos estándar y / o no estándar modificados con 4'-tio (por ejemplo, uno o más 4'-tio-NTP) y, opcionalmente, mezclado con ribonucleótido trifosfatos no modificados, un sistema tampón que puede incluir DTT o iones de magnesio, y una ARN polimerasa apropiada (por ejemplo, ARN polimerasa T3, T7 o SP6), ADNasa I, pirofosfatasa y / o inhibidor de ARNasa. Las condiciones exactas variarán según la aplicación específica. Se observa que los ribonucleótidos estándar y / o no estándar modificados con 4'-tio se pueden incorporar eficazmente en un ARNm de longitud completa de cualquier longitud.

En algunas realizaciones, para la preparación de ARNm de acuerdo con la invención, un molde de ADN se transcribe *in vitro*. Un molde de ADN adecuado típicamente tiene un promotor, por ejemplo un promotor de T3, T7 o SP6, para la transcripción *in vitro*, seguido de la secuencia de nucleótidos deseada para codificar una proteína de interés y una señal de terminación. Típicamente, la síntesis de ARNm incluye la adición de un "capuchón" en el extremo N-terminal (5') y una "cola" en el extremo C-terminal (3'). La presencia del capuchón es importante para proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucarióticas. La presencia de una "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación de la exonucleasa.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, los ARNm según la presente invención incluyen una estructura de capuchón en 5'. Normalmente, un capuchón en 5' se añade del siguiente modo: primero, una fosfatasa terminal de ARN elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido 5', dejando dos fosfatos terminales; a continuación,



se añade trifosfato de guanosina (GTP) a los fosfatos terminales a través de una guanilil transferasa, produciendo un enlace trifosfato 5'5'5'; y, después, el nitrógeno 7 de la guanina es metilado mediante una metiltransferasa. Entre los ejemplos de estructuras de capuchón se incluyen, pero sin limitación, m7G(5')ppp (5'(A,G(5'))ppp(5')A y G(5')ppp(5')G.

5 En algunas realizaciones, los ARNm según la presente invención incluyen una estructura de cola en 3'. Una estructura de cola en 3' adecuada incluye, pero no se limita a, una cola de poli-A, poli-U y / o poli-C. Ejemplos de colas de poli-A, poli-U y poli-C adecuadas se han descrito anteriormente. La cola de poli-U o de poli-C se puede añadir a la cola poli-A o puede sustituir la cola de poli-A.

10 En algunas realizaciones, los ARNm según la presente invención incluyen una estructura no traducida en 5' y/o en 3'. En algunas realizaciones, una región no traducida en 5' incluye uno o más elementos que afectan a la estabilidad o traducción de un ARNm, por ejemplo, un elemento sensible al hierro. En algunas realizaciones, una región no traducida en 5' puede tener entre aproximadamente 50 y 500 nucleótidos de longitud (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y 400 nucleótidos de longitud, aproximadamente 50 y 300 nucleótidos de longitud, aproximadamente 50 y 200 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 50 y 100 nucleótidos de longitud).

15 En ciertas realizaciones de la presente invención, el vehículo puede seleccionarse y / o prepararse para optimizar la administración del ARNm a una célula, tejido u órgano diana. Por ejemplo, si la célula diana es un neumocito, las propiedades del vehículo (por ejemplo, el tamaño, la carga y / o el pH) pueden optimizarse para administrar de forma eficaz dicho vehículo a la célula u órgano diana, reducir la eliminación inmunitaria y / o promover la retención en ese órgano objetivo. Como alternativa, si el tejido diana es el sistema nervioso central (por ejemplo, para facilitar la ad de polinucleótidos de ARNm a región (s) del cerebro objetivo o tejido espinal) la selección y preparación del transportador debe considerar la penetración y la retención dentro de la barrera hematoencefálica y / o el uso de medios alternativos para administrar directamente dicho vehículo a dicho tejido diana. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se pueden combinar con agentes que facilitan la transferencia de polinucleótidos exógenos desde los tejidos u órganos locales en los que tales composiciones se administraron a uno o más órganos o tejidos diana periféricos.

20 En ciertas realizaciones, los vehículos empleados en las composiciones de la invención pueden comprender una vesícula liposomal u otros medios para facilitar la transferencia de un ARNm a células y tejidos diana. Entre los vehículos adecuados se incluyen, pero no se limitan a, vehículos basados en polímeros, tales como polietilenoimina (PEI), nanopartículas y liposomas de lípidos, nanoliposomas, nanoliposomas que contienen ceramida, proteoliposomas, exosomas tanto naturales como sintéticos, cuerpos lamelares naturales, sintéticos y semisintéticos, nanopartículas, nanopartículas de fósforo y silicato de calcio, sol-geles, nanopartículas de fosfato de calcio, nanopartículas de dióxido de silicio, partículas nanocristalinas, nanopartículas de semiconductores, poli (D-arginina), nanodendrimeros, sistemas de administración basados en almidón, micelas, emulsiones, niosomas, plásmidos, virus, nucleótidos de fosfato de calcio, aptámeros, péptidos y otros marcadores vectoriales. También se contempla el uso de bionanocápsulas y otros conjuntos de proteínas de la cápside viral como vehículos adecuados. (Hum. Gene Ther. 19(9):887-95 (2008)).

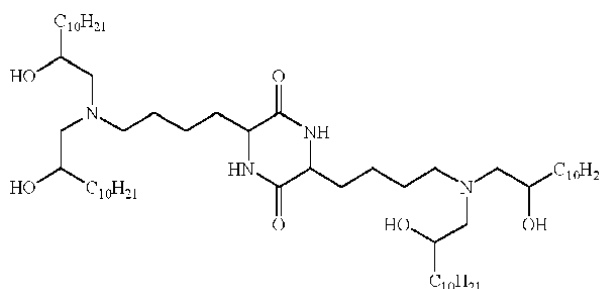
25 En ciertas realizaciones de la invención, el vehículo se formula usando un polímero como vehículo, solo o en combinación con otros vehículos. Los polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliacrilatos, poliacediacrilatos, polilactida, copolímeros de polilactida-poliglicólidos, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas, protamina, protamina PEGilada, PLL, PLL PEGilada y polietilenoimina (PEI), incluyendo, pero no limitado a, PEI ramificado (25 kDa). En algunas realizaciones, un polímero puede ser uno o más polímeros de bloques multidominio. En algunas realizaciones, un polímero puede comprender una formulación en polvo seco del polímero o polímeros.

30 El uso de vehículos liposómicos para facilitar la liberación polinucleótidos en células diana también se contempla en la presente invención. Los liposomas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas liposómicas) son generalmente útiles en diversas aplicaciones en investigación, industria y medicina, particularmente para su uso como vehículos de compuestos diagnósticos o terapéuticos *in vivo* (Lasic et al., Trends Biotechnol., 16:307-321 (1998); Drummond et al., Pharmacol. Rev., 51:691-743 (1999)) y habitualmente se caracterizan como vesículas microscópicas que tienen un espacio acuoso interior secuestrado de un medio externo por una membrana de una o más bicapas. Las membranas de bicapa de los liposomas están formadas típicamente por moléculas anfifílicas, tales como lípidos de origen sintético o natural que comprenden dominios hidrofílicos e hidrofóbicos espacialmente separados. Las membranas de bicapa de los liposomas también se pueden formar mediante polímeros anfifílicos y tensioactivos (por ejemplo, polimerasomas, niosomas, etc.).

35 En ciertas realizaciones, las moléculas de ARNm forman complejos con nanopartículas de lípidos para facilitar la liberación en la célula diana. Entre los ejemplos de lípidos adecuados se incluyen, por ejemplo, los compuestos de fosfatidilo (por ejemplo, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos). En ciertas realizaciones, las moléculas de ARNm y las composiciones de la invención se pueden combinar con una mezcla de lípidos multicomponente de proporciones variables que emplean uno o más lípidos catiónicos, lípidos auxiliares y lípidos PEGilados diseñados para encapsular diversos materiales basados en

ácidos nucleicos.

Los lípidos catiónicos pueden incluir, pero sin limitación **DOTAP** (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), **DODAP** (1,2-1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), **cKK-E12** (3,6-bis(4-(bis(2-hidroxidodecil)amino)butil)piperazin-2,5-diona), basado en dialquilamino, basado en imidazol, basado en guanidinio, **XTC** (2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano), **MC3** (((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-i14-(dimetilamino)butanoato), **ALNY-100** ((3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina)), **NC98-5** (4,7,13-tris(3-oxo-3-(undecilamino)propil)-N1,N16-diundecil-4,7,10,13-tetraazahexadecano-1,16-diamida), **HGT4003** (descrito en el documento WO 2012/170889), **ICE** (descrito en el documento WO 2011/068810), **HGT5000** (descrito en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/617.468) o **HGT5001** (cis o trans) (descrito en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/617.468), lipidoides de aminoalcohol tales como los descritos en el documento WO2010/053572, **DOTAP** (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), **DOTMA** (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano), **DLinDMA** (Heyes, et al., J. Contr. Rel. 107:276-287(2005)), **DLin-KC2-DMA** (Semple, et al., Nature Biotech. 28:172-176 (2010)), **C12-200** (Love, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 107:1864-1869(2010)). En algunas realizaciones, un lípido catiónico es cKK-E12:



Los lípidos auxiliares adecuados incluyen, pero sin limitación, **DSPC** (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), **DPPE** (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), **DOPE** (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), **DPPE** (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), **DMPE** (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), **DOPG** (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)) y colesterol.

Los lípidos PEGilados para su uso en formulaciones de nanopartículas incluyen, pero sin limitación, una cadena de poli(etilén)glicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena o cadenas alquilo de longitud C6-C20, DMG-PEG2K, PEG-DSG, PEG-DMG y PEG-ceramidas.

En ciertas realizaciones, el vehículo de nanopartículas lipídicas comprende una de las siguientes formulaciones lipídicas:

C12-200, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K;  
 DODAP, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K;  
 HGT5000, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K;  
 HGT5001, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K;  
 XTC, DSPC, colesterol, PEG-DMG;  
 MC3, DSPC, colesterol, PEG-DMG;  
 ALNY-100, DSPC, colesterol, PEG-DSG.

En ciertas realizaciones, los ARNm de la invención y las composiciones que comprenden dichos ARNm pueden administrarse de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en un tejido diana, preferiblemente en una formulación de liberación sostenida. La liberación local puede verse afectada de varias maneras, dependiendo del tejido al que se va a dirigir. Por ejemplo, los aerosoles que contienen los ARNm y las composiciones de la invención se pueden inhalar (para administración nasal, traqueal o bronquial); los ARNm y las composiciones de la invención se pueden inyectar en el sitio de la lesión, manifestación de enfermedad o dolor, por ejemplo; se pueden proporcionar las composiciones en pastillas para chupar para aplicación oral, traqueal o esofágica; se pueden proporcionar en forma de líquido, comprimido o cápsula para liberación en el estómago o los intestinos, se pueden suministrar en forma de supositorio para aplicación rectal o vaginal; o incluso se pueden liberar en el ojo mediante el uso de cremas, gotas o incluso inyección.

También se contemplan en el presente documento composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden una o más de las nanopartículas liposómicas descritas en el presente documento y métodos relacionados para el uso de tales composiciones liofilizadas como se describe, por ejemplo, en la publicación de patente internacional WO 2012/170889. Por ejemplo, el ARNm liofilizado y las composiciones de la invención se pueden reconstituir antes

de la administración o se pueden reconstituir *in vivo*. Por ejemplo, un ARNm y / o composición liofilizada pueden formularse en una forma de dosificación apropiada (por ejemplo, una forma de dosificación intradérmica tal como un disco, varilla o membrana) y administrarse de tal manera que la forma de dosificación se rehidrata con el tiempo *in vivo* por los fluidos corporales del individuo.

5 En ciertas realizaciones, también se contemplan métodos para tratar a un sujeto que comprenden administrar un ARNm o una composición de la invención. Por ejemplo, se describen métodos para tratar o prevenir afecciones en las que la producción de una proteína en particular y / o la utilización de una proteína en particular es inadecuada o está comprometida. También se describen métodos para modular (por ejemplo, aumentar, mejorar o potenciar de otro modo) la eficacia traduccional de uno o más ARNm en una célula diana. Como se usa en el presente documento, la frase "eficiencia traduccional" se refiere al grado en que se traduce un ARNm y se produce la proteína terapéutica codificada.

10 En ciertas realizaciones, una molécula de ARNm o composición de la invención que comprende dicho ARNm se administra a un paciente.

15 En algunas realizaciones, una molécula de ARNm o composición de la invención que comprende dicho ARNm se usa para la producción de proteínas en un sistema *in vitro* o *in vivo*. Un sistema *in vitro* adecuado puede ser un sistema sin células *in vitro* o un sistema basado en células *in vitro*. Un sistema *in vivo* adecuado puede ser cualquier organismo vivo tal como un animal no humano (por ejemplo, rata, ratón, cerdo, perro, pollo, oveja, primate no humano, etc.) o ser humano.

## EJEMPLOS

25 Los siguientes ejemplos específicos deben considerarse simplemente ilustrativos y no limitativos del alcance de la divulgación. Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, según la descripción del presente documento, utilizar la presente invención en su máxima extensión.

### EJEMPLO 1: Síntesis y expresión de ARNm que incorpora anillo de furanosa 4'-tio-sustituido

30 Se sintetiza un ARNm que codifica una proteína. El ARNm contiene al menos un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido. El ARNm se formula en una composición farmacéutica y se administra a un sujeto. El ARNm puede exhibir una semivida más larga y dar como resultado una mayor cantidad de síntesis de la proteína codificada por el ARNm que un ARNm de control que no contiene un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido.

#### I. Detalles experimentales de la formulación:

##### I-a. Material de ARN mensajero

40 La luciferasa de luciérnaga (FFL), la eritropoyetina humana (EPO) y la alfa-galactosidasa humana (GLA) se sintetizan mediante transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN plasmídico que codifica el gen, que es seguido por la adición de una estructura de capuchón en 5' (cap. 1) (Fechter y Brownlee, J. Gen. Virology 86:1239–1249(2005)) y una cola de poli(A) en 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud determinado por electroforesis en gel. Las regiones 5' y 3' no traducidas presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente, y se definen como se indica (véase más adelante).

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

50 X<sub>1</sub>AUGGGGGUGCACGAAUGUCCUGCCUGGCUGUGGGCUUCUCCUGUCCCUGCUGUC  
 GCUCCUCUGGGCCUCCCAGUCCUGGGCGCCCCACCACGCCUCAUCUGUGACAGCC  
 GAGUCCUGGAGAGGUACCUCUUGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAAUAUCACGACGG  
 GCUGUGCUGAACACUGCAGCUUGAAUGAGAAUAUCACUGUCCCAGACACCAAAGU  
 55 UAAUUUCUAUGCCUGGAAGAGGAUGGAGGUCGGGCAGCAGGCCGUAGAAGUCUG  
 GCAGGGCCUGGCCUGCUGUCGGAAGCUGUCCUGCGGGGCCAGGCCUGUUGGUC  
 AACUCUCCCAGCCUGGGAGCCCCUGCAGCUGCAUGUGGAUAAAGCCGUCAGUG  
 GCCUUCGCAGCCUCACCACUCUGCUUCGGGCUCUGGGAGCCCAGAAGGAAGCCAU  
 CUCCCCUCCAGAUGCAGGCCUCAGCUGCUCCACUCCGAACAACUCUGCUGACACU  
 60 UUCGCAAACUCUUCGAGUCUACUCCAAUUUCCUCCGGGGAAAGCUGAAGCUGU  
 ACACAGGGGAGGCCUGCAGGACAGGGGACAGAUGAY<sub>1</sub>

65 ARN, de alfa-galactosidasa humana (GLA) (SEQ ID NO:2):

ES 2 647 832 T3

X<sub>1</sub>AUGCAGCUGAGGAACCCAGAACUACAUCUGGGCUGCGCGCUUGCUCUUCGCUU  
CCUGGCCUCGUUCCUGGGACAUCUCCUGGGGCUAGAGCACUGGACAAUGGAUUG  
GCAAGGACGCCUACCAUGGGCUGGCUGCACUGGGAGCGCUUCAUGUGCAACCUUG  
ACUGCCAGGAAGAGCCAGAUUCCUGCAUCAGUGAGAAGCUCUUCAUGGAGAUGG  
5 CAGAGCUCAUGGUCUCAGAAGGCUGGAAGGAUGCAGGUUAUGAGUACCUCUGCA  
UUGAUGACUGUUGGAUGGCUCUCCCAAAGAGAUUCAGAAGGCAGACUUCAGGCAG  
ACCCUCAGCGCUUCCUCAUGGGAUUCGCCAGCUAGCUAAUUAUGUUCACAGCAA  
AGGACUGAAGCUAGGGAUUUAUGCAGAUGUUGGAAUAAAACCUGCGCAGGCUU  
10 CCCUGGGAGUUUUGGAUACUACGACAUUGAUGCCCAGACCUUUGCUGACUGGGG  
AGUAGAUCUGCUAAAAUUUGAUGGUUGUACUGUGACAGUUUGGAAAAUUUGGC  
AGAUGGUUAUAAGCACAUUGUCCUUGGCCUGAAUAGGACUGGCAGAAGCAUUGU  
GUACUCCUGUGAGUGGCCUCUUUAUAUGUGGCCUUUCAAAAAGCCCAAUAUACA  
15 GAAAUCCGACAGUACUGCAAUCACUGGCGAAAUUUUGCUGACAUUGAUGAUUCC  
UGGAAAAGUAUAAAGAGUAUCUUGGACUGGACAUUCUUUAACCAGGAGAGAAU  
GUUGAUGUUGCUGGACCAGGGGGUUGGAAUGACCCAGAUUGUUAGUGAUUGGC  
AACUUUGGCCUCAGCUGGAAUCAGCAAGUAACUCAGAUGGCCUCUGGGCUAUC  
20 UGGCUGCUCCUUUAUUC AUGUCUAAUGACCUCCGACACAUCAGCCUCAAGCCAA  
AGCUCUCCUUCAGGAUAAGGACGUAAUUGCAUCAAUUCAGGACCCCUUGGGCAAG  
CAAGGGUACCAGCUUAGACAGGGAGACAACUUUGAAGUGUGGGAACGACCUCUC  
UCAGGCUUAGCCUGGGCUGUAGCUAUGAUAACCGGCAGGAGAUUGGUGGACCU  
25 CGCUCUUAUACCAUCGAGUUGCUUCCUGGGUAAAGGAGUGGCCUGUAAUCCUG  
CCUGCUUCAUCACACAGCUCCUCCUGUGAAAAGGAAGCUAGGGUUCUAUGAAUG  
GACUUCAAGGUUAAGAAGUCACAUAUAUCCACAGGCACUGUUUUGCUUCAGCU  
AGAAAAUACAAUGCAGAUGUCAUUAUAAGACUUACUUUAAY<sub>1</sub>

30 ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) optimizada por codones (SEQ ID NO:3):

X<sub>2</sub>AUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGA  
AGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUUGGUG  
35 CCCGGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCG  
AGUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGAAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGA  
AUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUC AUGC  
CCGUGUUGGGUGCCCUGUUC AUGGUGUGGCUGUGGCCCCAGCUAACGACAUCUA  
40 CAACGAGCGGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCACCGUCGUAUUC  
GUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAGAUCCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGAUC  
AUACAAAAGAUCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCGGGCUUCCAAAGCA  
UGUACACCUUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGU  
45 GCCCGAGAGCUUCGACCGGGACAAAACCAUCGCCUGAUC AUGAACAGUAGUGGC  
AGUACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAU  
UCAGUCAUGCCCGGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCGACACCGCUAU  
CCUCAGCGUGGUGCAUUCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUUGGGCUAC  
50 UUGAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUC AUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUC  
UUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUUCAAUUCUGCCCUGCUGGUGCCCACACUAU  
UUAGCUUCUUCGUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA  
CGAGAUCGCCAGCGGGCGGGCGCCGUCAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCC  
55 AAACGCUUCCACCUACCGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCA  
GCGCCAUUCUGAUCACCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGU  
GGUGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGG  
UGUGAACAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCUGGCCCAUGAUC AUGAGCGGCUAC  
60 GUUAACAACCCGAGGCUACAAACGUCUCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCACA  
GCGGGCACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUC AUGGACCGGCU

65

GAAGAGCCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGC  
 AUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGUCGCCGCCUGCCCCGACG  
 ACGAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGACGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAU  
 GACCGAGAAGGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUACAACCGCCAAGAA  
 GCUCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAA  
 GUUGGACGCCCGCAAGAUCGCGGAGAUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAG  
 AUCGCCGUGUAY<sub>2</sub>

X<sub>1</sub> (secuencia no traducida en 5') (SEQ ID NO:4):

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC  
 GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGGG  
 UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG

X<sub>2</sub> (secuencia no traducida en 5') (SEQ ID NO:5):

GGGAUCCUACC

Y<sub>1</sub> (secuencia no traducida en 3') (SEQ ID NO:6):

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCC  
 ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC

Y<sub>2</sub> (secuencia no traducida en 3') (SEQ ID NO:7):

UUUGAAUU

**I-b. Protocolos de formulación**

Protocolo A: Se mezclan alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg / ml de C12-200, DOPE, Chol y DMG-PEG2K y se diluyen con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Separadamente, se prepara una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM / NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de GLA a partir de una solución madre de 1 mg / ml. La solución lipídica se inyecta rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtra, se diafiltra con 1x PBS (pH 7,4), se concentra y se almacena a 2-8 °C. Concentración final= 0,85 mg/ml de ARNm de GLA (encapsulado). Zave = 81,2 nm (Dv(50) = 63,2 nm; Dv(90) = 104 nm).

Protocolo B: Se mezclan alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg / ml de DODAP, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyen con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Separadamente, se prepara una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM / NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de EPO a partir de una solución madre de 1 mg / ml. La solución lipídica se inyecta rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C. Concentración final= 1,35 mg/ml de ARNm de EPO (encapsulado). Zave = 75,9 nm (Dv(50) = 57,3 nm; Dv(90) = 92,1 nm).

Protocolo C: Se mezclan alícuotas de una solución acuosa de 2,0 mg / ml de PEI (ramificado, 25 kDa) con una solución acuosa de ARNm de CFTR (1,0 mg / ml). La mezcla en complejo resultante se pipetea hacia arriba y hacia abajo varias veces y se deja de lado durante 20 minutos antes de la inyección. Concentración final = 0,60 mg / ml de ARNm de CFTR (encapsulado). Zave = 75,9 nm (Dv(50) = 57,3 nm; Dv(90) = 92,1 nm).

**II. Análisis de ARN mensajero modificado frente a ARNm no modificado:**

**II-a. Cuantificación de la base modificada dentro de la construcción de ARN mensajero**

El ARN mensajero modificado con 4'-Tio-NTP se somete a ARNasa I o Nucleasa P1 durante varios periodos de tiempo para permitir una degradación suficiente. Al completarse, los nucleótidos monofosfato resultantes se degradan adicionalmente con fosfatasa alcalina para proporcionar los respectivos nucleósidos. La mezcla de nucleósidos se aplica a una columna de giro Amicon (30.000 MWCO) para la eliminación eficiente de enzimas. La solución de nucleósido resultante se analiza mediante HPLC y se cuantifica mediante comparación del área del pico con el nucleósido no modificado respectivo.

**II-b. Estabilidad de la construcción de ARN mensajero modificado con 4'-Tio-NTP**

El ARN mensajero modificado con 4'-Tio-NTP se somete a ARNasa I o Nucleasa P1 durante varios períodos de tiempo para evaluar la resistencia a la degradación por nucleasas. De forma similar, el ARN mensajero modificado con 4'-tio-NTP se trató con suero (que contenía nucleasas) durante diversos períodos de tiempo para evaluar la degradación por la nucleasa. En momentos específicos, las reacciones de nucleasa se inactivan con un inhibidor y la solución resultante se aplica a una columna de giro Amicon (30.000 MWCO) para la eliminación eficiente de la enzima. Una vez completado, el producto retenido se aplica a un gel de agarosa al 1 % y se analiza la viabilidad de la construcción de ARNm (tamaño, productos de degradación, etc.). Se realizan experimentos idénticos en ARNm no modificado y se pueden realizar comparaciones e inferencias directas.

## 10 II-c. Efectos del ARN mensajero modificado con 4'-Tio-NTP sobre la producción de proteínas

Estudios *in vitro*: Se realizan transfecciones *in vitro* del ARNm modificado con 4'-tio NTP y el ARNm no modificado usando células HEK293T. Las transfecciones de un microgramo de cada construcción de ARNm se realizan en pocillos separados usando lipofectamina. Las células se recogen en puntos de tiempo seleccionados (por ejemplo, 4 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, etc.) y se analiza la producción de proteínas respectivas. Para el ARNm de FFL, los lisados celulares se analizan para determinar la producción de luciferasa mediante ensayos de bioluminiscencia. Para los estudios de ARNm de EPO y GLA, los sobrenadantes celulares se obtienen y se analizan para determinar las proteínas EPO y GLA, respectivamente, usando métodos basados en ELISA. Se puede efectuar una comparación de la producción de proteínas a lo largo del tiempo con el ARNm modificado no modificado frente al modificado con 4'-tio-NTP.

Estudios *in vivo*: Se realiza una comparación de la producción de proteínas a lo largo del tiempo mediante inyección de nanopartículas encapsuladas con ARNm modificado con 4'-tio-NTP (lipídicas o poliméricas) en ratones de tipo salvaje (CD-1) frente a ARNm no modificado liberados de manera idéntica. El suero y los órganos se recogieron en puntos de tiempo seleccionados (por ejemplo, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas) y se controlan los niveles de proteínas respectivos. Para el ARNm de FFL, los homogeneizados hepáticos se analizan para determinar la producción de luciferasa mediante ensayos de bioluminiscencia. Para los estudios de ARNm de EPO y GLA, se obtienen y se analizan los sueros de ratón para determinar las proteínas EPO y GLA, respectivamente, usando métodos basados en ELISA. Se efectúa una comparación de la producción de proteínas a lo largo del tiempo con el ARNm modificado no modificado frente al modificado con 4'-tio-NTP.

De forma similar, se inyectan ARNm modificado con 4'-tio-NTP no encapsulado (desnudo) y ARNm no modificado mediante administración intravenosa, subcutánea o intratraqueal y se pueden realizar análisis idénticos como se ha descrito anteriormente para evaluar las diferencias de estabilidad y producción de proteínas.

## 35 III. Análisis de las proteínas FFL, EPO y GLA producidas a través de ARNm modificado desnudo o nanopartículas cargadas con ARNm:

### 40 III-a. Protocolo de inyección

Todos los estudios se realizan utilizando ratones CD-1 macho de aproximadamente 6-8 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Las muestras se introducen mediante una única inyección en bolo en la vena de la cola de una dosis total equivalente de 30-200 microgramos de ARNm de FFL, EPO o GLA (modificado o no modificado) no encapsulado o encapsulado. Se sacrifica a los ratones y se perfunden con solución salina en los puntos de tiempo designados.

### III-b. Aislamiento de tejidos de órganos para el análisis

El hígado y el bazo de cada ratón se recolectan, se distribuyen en tres partes y se almacenan en formalina tamponada neutra al 10 % o se congelan rápidamente y se almacenan a -80 °C para su análisis.

### III-c. Aislamiento de suero para análisis

Todos los animales son sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub> 48 horas después de la administración de la dosis (± 5 %) seguido de toracotomía y extracción terminal de la sangre cardíaca. La sangre completa (volumen máximo obtenible) se recoge mediante punción cardíaca en animales sacrificados en tubos separadores de suero, se deja coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, se centrifuga a 22 °C ± 5 °C a 9.300 g durante 10 minutos, y se extrae el suero. Para las recolecciones de sangre intermedias, se recolectan aproximadamente 40-50 µl de sangre entera a través de la punción de la vena facial o un corte e la cola. Las muestras recogidas de animales sin tratamiento se usan como niveles basales de GLA para la comparación con animales de estudio.

### III-d. Análisis de ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA)

ELISA DE EPO: La cuantificación de la proteína EPO se realiza siguiendo los procedimientos informados para el kit de ELISA de EPO humana (Quantikine IVD, R & D Systems, n.º de catálogo Dep-00). Los controles positivos que pueden emplearse consisten en proteína de eritropoyetina humana recombinante de calidad de cultivo de tejido y

ultrapura (R & D Systems, Catálogo n.º de catálogo 286-EP y 287-TC, respectivamente). Las muestras de sangre se toman en puntos de tiempo designados y se procesan como se ha descrito anteriormente. La detección se controla mediante absorción (450 nm) en un instrumento Molecular Device Flex Station.

- 5 ELISA de GLA: se siguen procedimientos de ELISA estándar empleando IgG anti-REPLAGAL® G-188 de oveja como anticuerpo de captura con IgG anti-REPLAGAL® TK-88 de conejo como anticuerpo secundario (detección) (Shire Human Genetic Therapies). Se usa IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para la activación de la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se interrumpe usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N después de 20 minutos. La detección se controla mediante absorción (450 nm) en un instrumento  
10 Molecular Device Flex Station. El suero de ratón no tratado y la proteína REPLAGAL® humana se usan como controles negativos y positivos, respectivamente.

### III-e. Análisis de bioluminiscencia

- 15 Ensayo de la luciferasa: El ensayo de bioluminiscencia se realiza utilizando un sistema de ensayo de luciferasa Promega (artículo n.º E1500). El reactivo de ensayo de luciferasa se prepara añadiendo 10 ml de tampón de ensayo de luciferasa al sustrato de ensayo de luciferasa y se mezcla a través de vortex. Aproximadamente 20 µl de muestras homogeneizadas se cargan en una placa de 96 pocillos seguido de 20 µl de control de placa para cada muestra. Por separado, se añaden 120 µl de reactivo de ensayo de luciferasa (preparado como se ha descrito  
20 anteriormente) a cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos. A continuación, cada placa se inserta en las cámaras apropiadas utilizando un instrumento Molecular Device Flex Station y mide la luminiscencia (medida en unidades de luz relativa (ULR)).

### 25 Ejemplo 2. Formulaciones de liposomas de ejemplo para liberación y expresión de ARNm con modificaciones con 4'-tio

Este ejemplo proporciona formulaciones de liposomas de ejemplo para la liberación y expresión eficaces de ARNm modificado con 4'-tio *in vivo*.

#### 30 *Materiales lipídicos*

- Las formulaciones descritas en el presente documento incluyen una mezcla de lípidos multicomponente de proporciones variables que emplean uno o más lípidos catiónicos, lípidos auxiliares (por ejemplo, lípidos no catiónicos y / o lípidos basados en colesterol) y lípidos PEGilados diseñados para encapsular diversos materiales basados en ácidos nucleicos. Los lípidos catiónicos pueden incluir (pero no exclusivamente) DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamoniopropano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamoniopropano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamoniopropano), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. Contr. Rel. 2005, 107, 276-287), DLin-KC2-DMA (Semple, S.C. et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" Nature Biotech. 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love, K.T. et al. "Lipid-like materials for low-dose *in vivo* gene silencing" PNAS 2010, 107, 1864-1869), HGT4003, HGT5000, HGT5001, MC3, cKK-E12 (3,6-bis(4-(bis(2-hidroxidodecil)amino)butil)piperazin-2,5-diona), ICE, basado en dialquilamino, basado en imidazol, basado en guanidinio, etc. Los lípidos auxiliares pueden incluir (aunque no exclusivamente) DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)), colesterol, etc. Los lípidos PEGilados pueden incluir (pero no exclusivamente) una cadena de poli(etilen)glicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena o cadenas de alquilo ) de C6-C20 de longitud.

#### 50 *Materiales poliméricos*

Entre las formulaciones adicionales descritas en el presente documento se incluyen diversos materiales poliméricos cargados que pueden incluir (pero no exclusivamente) polietilenimina (PEI) ramificada (25 kDa) (Sigma N.º 408727), protamina, protamina PEGilada, PLL, PLL PEGilada, etc.

#### 55 *Materiales de ARNm*

- La luciferasa de luciérnaga (FFL), la eritropoyetina humana (EPO) y la alfa-galactosidasa humana (GLA) se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN plasmídico que codifica el gen, seguido por la adición de una estructura de capuchón en 5' (cap. 1) (Fechter, P.; Brownlee, G.G. "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249) y una cola de poli(A) en 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud determinado por electroforesis en gel. Las regiones 5' y 3' no traducidas presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente, y se definen como se indica (véase más adelante).

- 65 Ejemplos de secuencias de ARNm de eritropoyetina humana (EPO), alfa-galactosidasa humana (GLA) y

luciferasa de luciérnaga optimizada por codones (FFL) se representan en las SEQ ID No. 1, 2 y 3, respectivamente. Ejemplos de secuencias UTR 5' y 3' se describen en las SEQ ID Nos. 4, 5, 6 y 7.

#### Protocolos de formulación de ejemplo

5

##### A. C12-200 y GLA

Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg / ml de C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Separadamente, se preparó una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM / NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de GLA a partir de una solución madre de 1 mg / ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentra y se almacena a 2-8 °C. Concentración final= 0,85 mg/ml de ARNm de GLA (encapsulado).  $Z_{ave} = 81,2$  nm (Dv(50) = 63,2 nm; Dv(90) = 104 nm).

15

##### B. DODAP y EPO

Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg / ml de DODAP, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyen con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Separadamente, se preparó una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM / NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de EPO a partir de una solución madre de 1 mg / ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agita para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C. Concentración final= 1,35 mg/ml de ARNm de EPO (encapsulado).  $Z_{ave} = 75,9$  nm (Dv(50) = 57,3 nm; Dv(90) = 92,1 nm).

25

##### C. PEI y CFTR

Se mezclaron alícuotas de una solución acuosa de 2,0 mg / ml de PEI (ramificado, 25 kDa) con una solución acuosa de ARNm de CFTR (1,0 mg / ml). La mezcla en complejo resultante se pipeteó hacia arriba y hacia abajo varias veces y se deja de lado durante 20 minutos antes de la inyección. Concentración final = 0,60 mg / ml de ARNm de CFTR (encapsulado).  $Z_{ave} = 75,9$  nm (Dv(50) = 57,3 nm; Dv(90) = 92,1 nm).

30

#### **Ejemplo 3. Análisis de la estabilidad y la producción de proteínas *in Vivo* del ARNm modificado frente a ARNm no modificado**

35

Este ejemplo ilustra métodos de ejemplo para analizar la estabilidad del ARNm modificado y la expresión de proteínas en diversos tejidos diana *in vivo*.

##### *Cuantificación de la base modificada dentro de la construcción del ARNm*

40

El ARNm modificado con 4'-Tio-NTP se sometió a ARNasa I o Nucleasa P1 durante varios períodos de tiempo para permitir una degradación suficiente. Al completarse, los nucleótidos monofosfato resultantes se degradaron adicionalmente con fosfatasa alcalina para proporcionar los respectivos nucleósidos. La mezcla de nucleósidos se aplicó a una columna de giro Amicon (30.000 MWCO) para la eliminación eficiente de enzimas. La solución de nucleósido resultante se analizó mediante HPLC y se cuantifica mediante comparación del área del pico con el nucleósido no modificado respectivo.

45

##### *Estabilidad de la construcción de ARNm modificado con 4'-tio-NTP*

50

El ARNm modificado con 4'-Tio-NTP se sometió a ARNasa I o Nucleasa P1 durante varios períodos de tiempo para evaluar la resistencia a la degradación por nucleasas. En momentos específicos, las reacciones de nucleasa se inactivaron con un inhibidor y la solución resultante se aplicó a una columna de giro Amicon (30.000 MWCO) para la eliminación eficiente de la enzima. Una vez completado, el producto retenido se aplicó a un gel de agarosa al 1 % y se analiza la viabilidad de la construcción de ARNm (tamaño, productos de degradación, etc.). Se realizaron experimentos idénticos en ARNm no modificado y se realizaron comparaciones e inferencias directas.

55

Efectos del ARNm modificado con 4'-tio NTP sobre la producción de proteínas

##### Estudios *in vitro*:

60

Se realizaron transfecciones *in vitro* del ARNm modificado con 4'-tio NTP y el ARNm no modificado usando células HEK293T. Las transfecciones de un microgramo de cada construcción de ARNm se realizaron en pocillos separados usando lipofectamina. Las células se recogieron en puntos de tiempo seleccionados (por ejemplo, 4 horas, 8 horas, 32 horas, 48 horas, 56 horas, 80 horas etc.) y se analizó la producción de proteínas respectivas. Para el ARNm de FFL, los lisados celulares se analizaron para determinar la producción de luciferasa mediante ensayos de bioluminiscencia. Para los estudios de ARNm de EPO y GLA, los sobrenadantes celulares se obtuvieron

65



y se analizaron para determinar las proteínas EPO y GLA, respectivamente, usando métodos basados en ELISA. Se efectuó una comparación de la producción de proteínas a lo largo del tiempo con el ARNm modificado no modificado frente al modificado con 4'-tio-NTP. Los resultados de ejemplo se muestran en la Figura 2.

#### 5 Estudios in vivo:

Se realizó una comparación de la producción de proteínas a lo largo del tiempo mediante inyección de nanopartículas encapsuladas con ARNm modificado con 4'-tio-NTP (lipídicas o poliméricas) en ratones de tipo salvaje (CD-1) frente a ARNm no modificado liberados de manera idéntica. El suero y los órganos se recogieron en puntos de tiempo seleccionados (por ejemplo, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas) y se controlaron los niveles de proteínas respectivos. Para el ARNm de FFL, los homogeneizados hepáticos se analizaron para determinar la producción de luciferasa mediante ensayos de bioluminiscencia. Para los estudios de ARNm de EPO y GLA, se obtuvieron y se analizaron los sueros de ratón para determinar las proteínas EPO y GLA, respectivamente, usando métodos basados en ELISA. Se efectuó una comparación de la producción de proteínas a lo largo del tiempo con el ARNm modificado no modificado frente al modificado con 4'-tio-NTP.

De forma similar, se inyectaron ARNm modificado con 4'-tio-NTP no encapsulado (desnudo) y ARNm no modificado mediante administración intravenosa, subcutánea o intratraqueal y se realizaron análisis idénticos para evaluar las diferencias de estabilidad y producción de proteínas.

#### 20 **Ejemplo 4. Análisis de la producción de las proteínas FFL, EPO y GLA después de la administración de nanopartículas cargadas con ARNm modificado desnudo o ARNm**

Este ejemplo describe el protocolo para analizar la producción de proteínas de ejemplo después de administrar nanopartículas cargadas con ARNm desnudo, modificado o ARNm y demuestra la estabilidad del ARNm y la producción de proteínas para el ARNm modificado con 4'-tio en comparación con el ARNm no modificado.

Todos los estudios se realizaron utilizando ratones CD-1 macho de aproximadamente 6-8 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Las muestras se introdujeron mediante una única inyección en bolo en la vena de la cola de una dosis total equivalente de 30-200 microgramos de ARNm de FFL, EPO o GLA (modificado o no modificado) no encapsulado o encapsulado. Se sacrificó a los ratones y se perfunden con solución salina en los puntos de tiempo designados.

El hígado y el bazo de cada ratón se recolectaron, se distribuyeron en tres partes y se almacenaron en formalina tamponada neutra al 10 % o se congelan rápidamente y se almacenan a -80 °C para su análisis.

Todos los animales fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub> 48 horas después de la administración de la dosis ( $\pm$  5 %) seguido de toracotomía y extracción terminal de la sangre cardíaca. La sangre entera (volumen máximo obtenible) se recogió mediante punción cardíaca en animales sacrificados en tubos separadores de suero, se deja coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, se centrifuga a 22 °C  $\pm$  5 °C a 9.300 g durante 10 minutos, tiempo tras el cual se extrajo el suero. Para las recolecciones de sangre intermedias, se recolectaron aproximadamente 40-50  $\mu$ l de sangre entera a través de la punción de la vena facial o un corte en la cola. Las muestras recogidas de animales sin tratamiento se usaron como niveles basales de GLA para la comparación con animales de estudio.

#### 45 *Análisis de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA):*

La cuantificación de la proteína EPO se realizó siguiendo los procedimientos informados para el kit de ELISA de EPO humana (Quantikine IVD, R & D Systems, n.º de catálogo Dep-00). Los controles positivos empleados consistieron en proteína de eritropoyetina humana recombinante de calidad de cultivo de tejido y ultrapura (R & D Systems, Catálogo n.º de catálogo 286-EP y 287-TC, respectivamente). Las muestras de sangre se tomaron en puntos de tiempo designados y se procesan como se ha descrito anteriormente. La detección se controló mediante absorción (450 nm) en un instrumento Molecular Device Flex Station.

Para el análisis de la proteína GLA se realizaron procedimientos estándar de ELISA usando IgG anti-Replagal G-188 de oveja como anticuerpo de captura con IgG anti-Replagal de conejo como anticuerpo secundario (detección). Se usó IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para la activación de la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se interrumpió usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N después de 20 minutos. La detección se controló mediante absorción (450 nm) en un instrumento Molecular Device Flex Station. El suero de ratón no tratado y la proteína Replagal® humana se usaron como controles negativos y positivos, respectivamente.

#### *Análisis de bioluminiscencia*

65 El ensayo de bioluminiscencia se realizó utilizando un sistema de ensayo de luciferasa Promega (artículo n.º E1500). El reactivo de ensayo de luciferasa se preparó añadiendo 10 ml de tampón de ensayo de luciferasa al

5 sustrato de ensayo de luciferasa y se mezcló a través de vortex. Se cargaron 20  $\mu$ l de muestras homogeneizadas en una placa de 96 pocillos seguido de 20  $\mu$ l de control de placa para cada muestra. Por separado, se cargaron 120  $\mu$ l de reactivo de ensayo de luciferasa (preparado como se ha descrito anteriormente) en cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos. A continuación, cada placa se insertó en las cámaras apropiadas utilizando un instrumento Molecular Device Flex Station y se midió la luminiscencia (medida en unidades de luz relativa (ULR).

### Resultados de ejemplo

10 La producción de la proteína FFL a través de la transfección de ARNm de FFL modificado con 4'-tio o no modificado con 4'-tio se analizó en células HEK 293T. La Figura 2 representa las puntuaciones ponderadas de las unidades de fluorescencia relativas (RLU) tomadas 4 horas, 8 horas, 32 horas, 56 horas y 80 horas después de la transfección. En cada punto de tiempo, las células transfectadas con 25 % de ARNm de FFL de 4'-tio uridina (25 % de 4'-S-U) o 100 % de 4'-tio uridina (100 % de 4'-S-U) tenían puntuaciones de RLU ponderadas más altos que las células transfectadas con FFL DE SNIM® o FFL comercial.

15 También se analizó la estabilidad del ARNm de FFL modificado con 4'-tio y no modificado a lo largo del tiempo. Se expusieron tres microgramos de ARNm a suero de ratón y se controlaron en el transcurso de una hora. Como puede verse en la figura 3, en comparación con FFL SNIM® y ARNm de comercial, el ARNm modificado con 4'-tio, en particular, 100 % del ARNm de FFL de 4'-tio uridina (100 % de 4'-S-U) parece ser más estable durante hora.

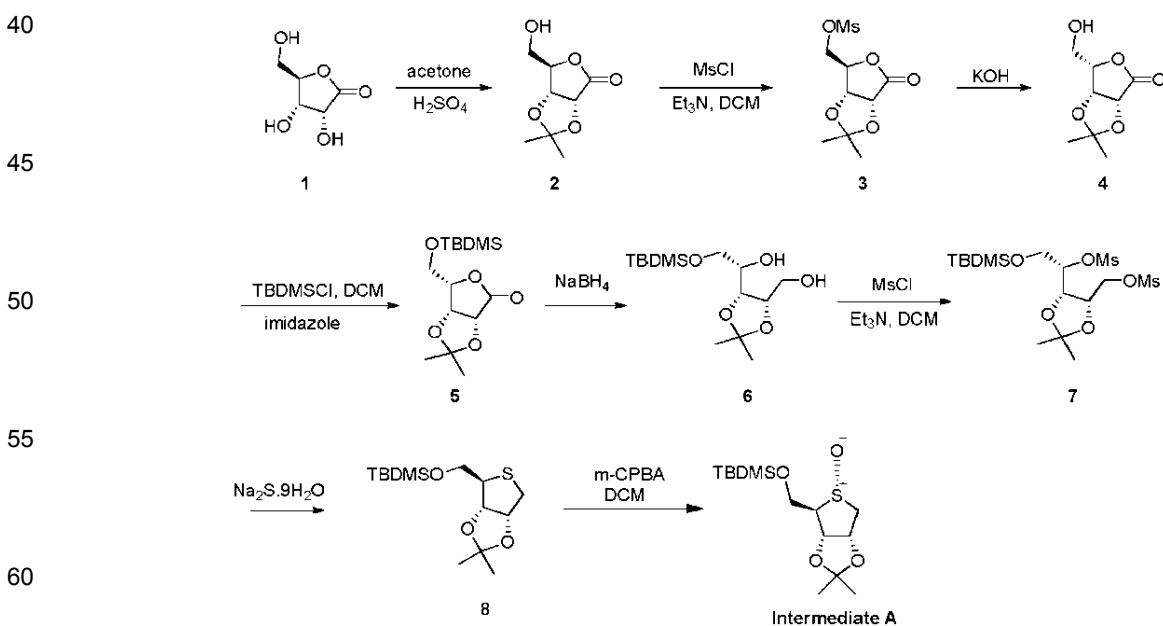
20 La producción de la proteína FFL a través de la transfección de ARNm de FFL modificado con 4'-tio o no modificado con 4'-tio se analizó en ratones de tipo salvaje. Se administró una dosis de 1,0 mg/kg de nanopartículas lipídicas cargadas con C12-200 por vía intravenosa y se sacrificó a los animales y se extrajeron los hígados para su análisis, como se ha descrito anteriormente. La Figura 4 representa las puntuaciones de RLU / mg de proteínas totales tomadas seis horas después de la administración. Los hígados de los ratones tratados con 25 % de 4'-tio uridina (25 % 4'-S-U) y 100 % 4'-tio-uridina (100 % de 4'-S-U) tuvieron puntuaciones más altas de RLU / mg que los hígados de ratones tratados con ARNm no modificado.

30 Entre otras cosas, los ejemplos de resultados descritos en el presente documento demostraron que un ARNm proporcionado que comprende un nucleótido 4'-tio-modificado puede sintetizarse con éxito, tener una estabilidad aumentada, y puede usarse con éxito para producir proteína en las células.

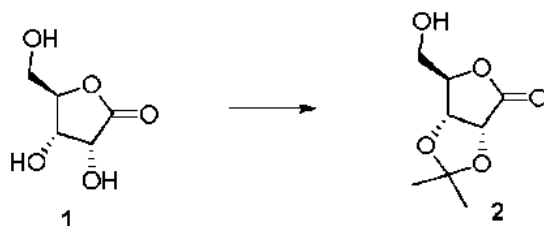
### Ejemplo 5. Síntesis de ejemplo de nucleótidos modificados con 4'-tio

35 Procedimientos sintéticos:

Preparación de intermedios:



65 Síntesis de ácido 2,3-O-isopropiliden-D-ribónico-1,4-lactona



5

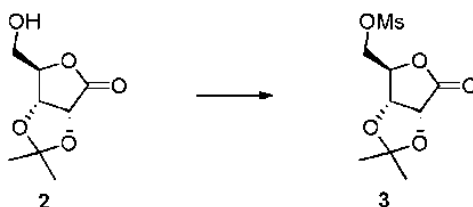
10

*Carbohydrate Research 2008, 1790–1800*

Una solución de ácido D-ribónico-1,4-lactona (270,0 g, 1,823 mol) y ácido sulfúrico (18,0 g, 0,182 mol, 0,1 equiv.) en acetona (2,79 l) se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de bicarbonato sódico sólido (~450 g), se filtró y el filtrado se evaporó. El residuo se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo; las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el producto deseado como un sólido blanco (318,8 g, 93 %). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,83 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 4,77 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 4,64–4,62 (m, 1H), 3,99 (ddd,  $J = 2,3, 5,5$  and  $12,4$  Hz, 1H), 3,81 (ddd,  $J = 2,3, 5,5$  and  $12,4$  Hz, 1H), 2,67 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 1,46 (s, 3H), 1,37 (s, 3H).

20

Síntesis de ácido 5-O-metanosulfonyl-2,3-O-isopropiliden-D-rib-1,4-lactona



25

30

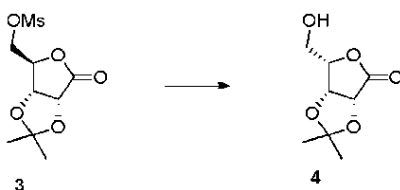
*Organic Process Research and Development 2006, 487–492*

Se añadió cloruro de metanosulfonyl (116,0 g, 1,014 mol, 1,2 equiv) gota a gota a 0 °C a una solución de ácido 2,3-O-isopropiliden-D-ribónico-1,4-lactona (159,0 g, 0,845 mol) y trietilamina (128,0 g, 1,267 mol) en diclorometano (2,43 l). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se diluyó con diclorometano y se lavó con agua,  $\text{NaHCO}_3$  acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar ácido 5-O-metanosulfonyl-2,3-O-isopropilideno-D-ribónico-1,4-lactona como un aceite naranja (231,0 g, aproximadamente 100 %). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,82–4,77 (m, 2H); 4,49–4,41 (m, 2H); 3,04 (s, 2H); 1,47 (s, 3H); 1,38 (s, 3H).

35

40

Síntesis de ácido 2,3-O-isopropiliden-L-lixónico-1,4-lactona



45

50

*Organic Process Research and Development 2006, 487–492*

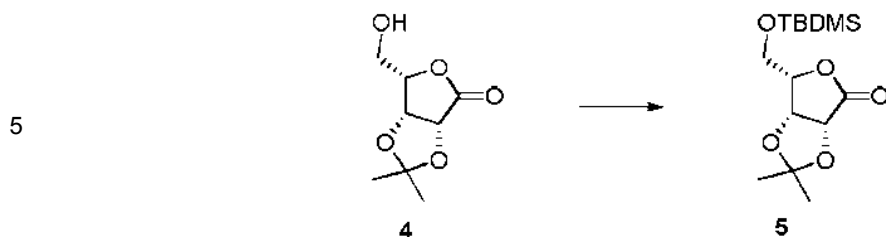
55

60

Se añadió hidróxido potásico (137,0 g, 2,45 mol) en agua (1,1 l) a ácido 5-O-metanosulfonyl-2,3-O-isopropiliden-D-ribónico-1,4-lactona (225,0 g, 0,85 mol) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción se acidificó a pH 3 con HCl 2M acuoso HCl (usando un peachimetro), después se evaporó. El residuo se calentó a reflujo en acetona y la acetona se decantó (x 3). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar ácido 2,3-O-isopropiliden-L-lixónico-1,4-lactona como un sólido amarillo claro (115,4 g, 73 %). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,89–4,84 (m, 2H), 4,63–4,59 (m, 1H), 4,08–3,91 (m, 2H), 1,46 (s, 3H), 1,38 (s, 3H).

Síntesis de ácido 5-O-terc-butildimetilsilil-2,3-O-isopropiliden-L-lixónico-1,4-lactona

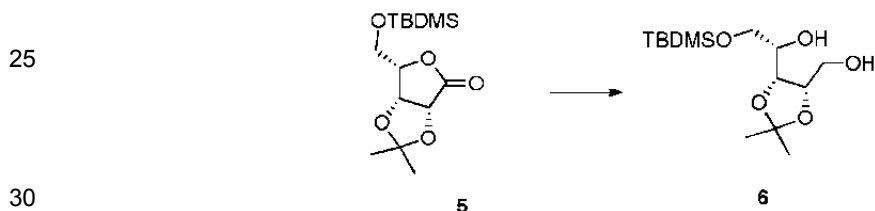
65



*Carbohydrate Research 2008, 1790–1800*

15 A una solución de ácido 2,3-O-isopropiliden-L-lixónico-1,4-lactona (5,0 g, 0,027 mol) en diclorometano (85,0 ml) se añadió imidazol (2,2 g, 32 mmol) seguido de cloruro de terc-butildimetilsililo (4,4 g, 29 mmol, 1,1 equiv) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acoso saturado, salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar ácido 5-O-terc-butildimetilsilil-2,3-O-isopropiliden-L-lixónico-1,4-lactona como un aceite de color amarillo claro (7,3 g, 89 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,79 (s, 2H), 4,54–4,49 (m, 1H), 4,00–3,86 (m, 2H), 1,45 (s, 3H), 1,38 (s, 3H), 0,89 (s, 9H), 0,08 (s, 6H).

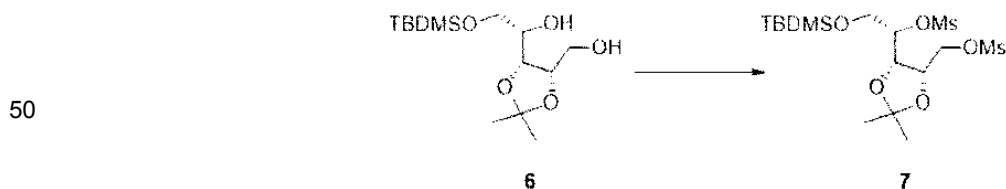
20 Síntesis de 5-O-terc-butildimetilsilil-2,3-O-isopropiliden-L-lixitol



*Carbohydrate Research 2008, 1790–1800*

35 A una solución de ácido 5-O-terc-butildimetilsilil-2,3-O-isopropiliden-L-lixónico-1,4-lactona (7,2 g, 24 mmol) en tetrahidrofurano (63 ml) y metanol (13 ml) se añadió borohidruro de sodio (1,4 g, 0,036 mol, 1,5 equiv.) en porciones a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre acetato de etilo y ácido cítrico acuoso 1M. La capa orgánica se lavó con ácido cítrico acuoso 1M, salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar 5-O-terc-butildimetilsilil-2,3-O-isopropiliden-L-lixitol como un aceite incoloro que cristalizó al dejarlo reposar (6,3 g, 86 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,26–4,20 (m, 2H), 3,84–3,59 (m, 5H), 1,51 (s, 3H), 1,37 (s, 3H), 0,89 (s, 9H), 0,07 (s, 6H).

45 Síntesis de 5-O-terc-butildimetilsilil-2,3-O-isopropiliden-1,4-di-O-metanosulfonil-L-lixitol

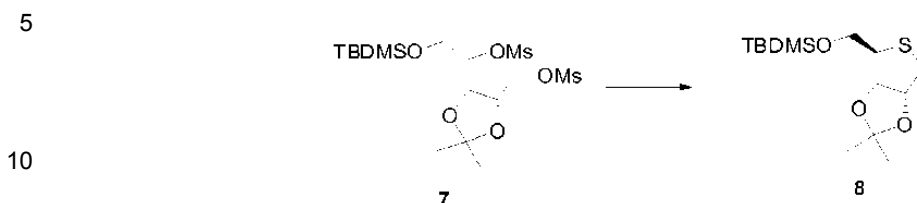


*Carbohydrate Research 2008, 1790–1800*

60 Se añadió cloruro de metanosulfonilo (15,2 ml, 0,196 mol, 10 equivalentes) gota a gota a <10 °C a piridina (15,8 ml, 0,196 mol, 10 equivalentes). Se añadió una solución de 5-O-terc-butildimetilsilil-2,3-O-isopropiliden-L-lixitol (6 g, 0,0196 mol) en diclorometano (16 ml) gota a gota a <10 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El baño de enfriamiento se reemplazó y el exceso de cloruro de metanosulfonilo se hidrolizó mediante la adición de hielo. A continuación, la mezcla de reacción se vertió en agua (300 ml) y se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con ácido cítrico acuoso 1M, NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y salmuera, se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice con acetato de etilo / heptano 1:6 para dar 5-O-terc-butildimetilsilil-2,3-O-isopropiliden-1,4-di-O-metanosulfonil-L-lixitol como aceite de color amarillo (8 g, 91 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,76–4,69 (m, 1H), 4,46–4,34 (m, 4H), 3,95 (dd, J = 5,5 and 11,0 Hz, 1H), 3,82 (dd, J = 6,0

and 11,0 Hz, 1H), 3,11 (s, 3H), 3,07 (s, 3H), 1,51 (s, 3H), 1,37 (s, 3H), 0,89 (s, 9H), 0,09 (s, 6H).

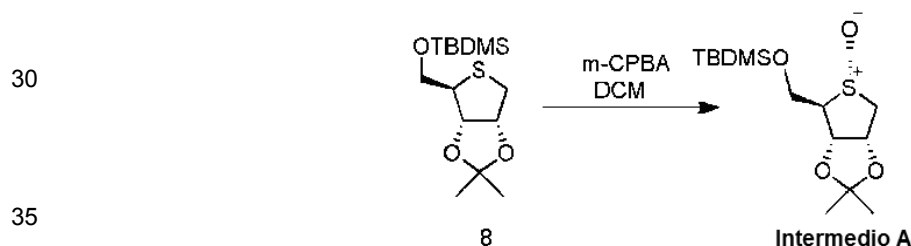
Síntesis de terc-butil(((3aS, 4R, 6aR) -2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)metoxi)dimetilsilano



15 A una solución de 5-O-terc-butildimetilsilil-2,3-O-isopropiliden-1,4-di-O-metanosulfonil-L-lixitol (25,1 g, 0,056 mol) en dimetilformamida (250 ml) se añadió Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (16,1 g, 0,067 mol, 1,2 eq.) y la mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se repartió entre agua y acetato de etilo. Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó por

20 cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con acetato de etilo / heptano (10:1) para dar terc-butil(((3aS, 4R, 6aR)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-ilmetoxi)-dimetil-silano (10,3 g, 60 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,89 (dt, J = 1,4 and 4,6 Hz, 1H), 4,79 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 3,80 (dd, J = 5,0 and 10,5 Hz, 1H), 3,60 (dd, J = 6,4 and 10,6 Hz, 1H), 3,33 (t, J = 5,0 Hz, 1H), 3,16 (dd, J = 5,0 and 12,4 Hz, 1H), 2,85 (dd, J = 0,9 and 12,8 Hz, 1H), 1,52 (s, 3H), 1,32 (s, 3H), 0,89 (s, 9H), 0,06 (s, 6H).

25 Síntesis de 5-óxido de (3aS,4R,5R,6aR)-4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol

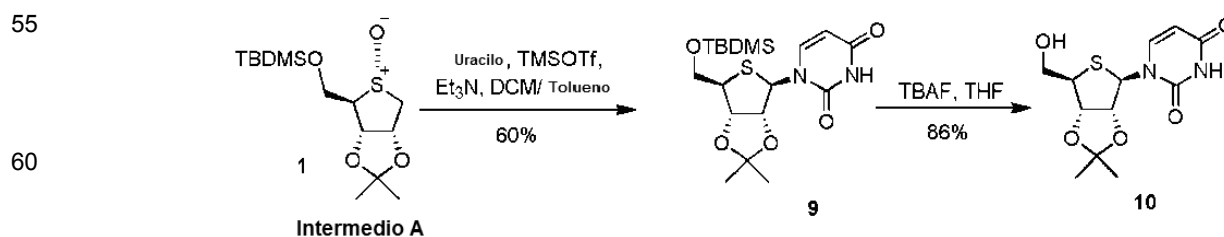


40 Una solución de aproximadamente 70 % de ácido m-cloroperbenzoico (16 g, 66 mmol) en diclorometano (150 ml) se secó sobre sulfato de magnesio y se filtró. Después de lavar con diclorometano (50 ml), el filtrado combinado se añadió gota a gota a una solución de terc-butil(((3aS, 4R, 6aR)-2,2-dimetiltetrahidrotieno [3,4-d] [1,3 ] dioxol-4-il) metoxi) dimetilsilano (20 g, 66 mmol) en diclorometano (400 ml) a -78 °C. Después de agitar durante una hora a -78 °C, la reacción se inactivó con una solución saturada de bicarbonato de sodio y se diluyó con diclorometano. Las

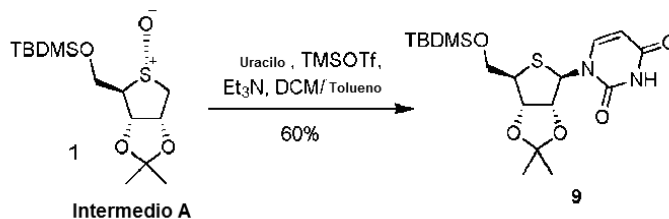
45 capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice/diclorometano: éter dietílico (30: 1) para dar 5-óxido de (3aS,4R,5S,6aR)-4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol (8,8 g, 42 %) y 5-óxido de (3aS,4R,5R,6aR)-4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetra- hidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol (7,3 g, 35 %).

50 Síntesis de intermedios nucleosídicos:

1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d] [1,3]dioxol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona



65 Síntesis de 1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetil-tetrahidrotieno[3,4-d][1,3] dioxol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona



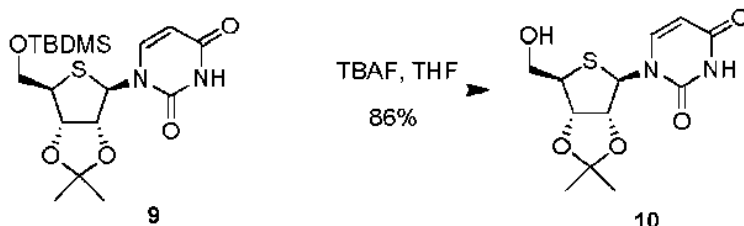
5

A una suspensión de uracilo (1,40 g, 12,5 mmol) en tolueno (62 ml) se añadió trietilamina (3,5 ml, 2,53 g, 25 mmol) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (9,01 ml, 11,1 g, 50 mmol). Después de agitar durante una hora a temperatura ambiente se añadió diclorometano (34 ml) a la mezcla bifásica, para dar una solución; a continuación, esto se añadió gota a gota a una solución de 5-óxido de 1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (2,0 g, 6,25 mmol) en diclorometano (34 ml) y después se añadió trietilamina (3,5 ml, 25 mmol). Después de agitar durante 90 minutos a temperatura ambiente, se inactivó la reacción con hielo y después se diluyó con acetato de etilo. Se separaron las capas y la fase orgánica se lavó con una solución de bicarbonato sódico saturado (x 2) y, después, con salmuera. Después de secar sobre sulfato de magnesio, la concentración a presión reducida dio el producto bruto que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo: diclorometano 1: 5), para dar 1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (1,55 g, 60%). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,43 (s, 1H), 7,96 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,12 (d, J=2,3 Hz, 1H), 5,74 (dd, J=1,9 and 7,8 Hz, 1H), 4,71 (m, 2H), 3,89 (m, 2H), 3,74 (m, 1H), 1,60 (s, 3H), 1,32 (s, 3H), 0,92 (s, 9H), 0,11 (s, 3H), 0,10 (s, 3H).

Síntesis de 1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona

25

30



35

40

Una solución de 1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((tert-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (3,70 g, 8,92 mmol) en tetrahidrofurano (85 ml) se enfrió en un baño de hielo en argón; se añadió una solución de fluoruro de tetrabutilamonio 1M en tetrahidrofurano (10,7 ml, 10,7 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El producto bruto se recogió mediante filtración, se lavó con tetrahidrofurano y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice:metanol: diclorometano 1: 30), para dar 1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (2,30 g, 86%). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,97 (brs, 1H), 7,76 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 5,76 (d, J = 8,3 Hz), 4,91 (s, 2H), 3,96 (dd, J = 4,6 and 11,0 Hz, 1H), 3,89 (dd, J = 4,6 and 11,0 Hz, 1H), 3,79 (t, J = 4,6 Hz, 1H), 2,64 (brs, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,33 (s, 3H).

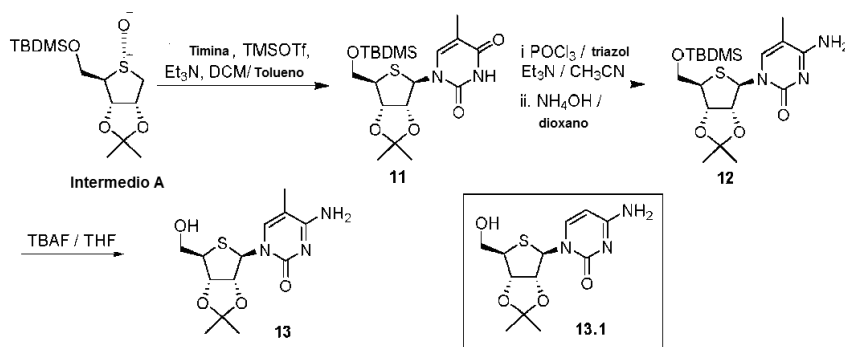
45

4-amino-1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-5-metilpirimidin-2(1H)-ona

50

55

60



65

Usando un procedimiento análogo al siguiente, pero sustituyendo citosina por timina se puede sintetizar 4-amino-

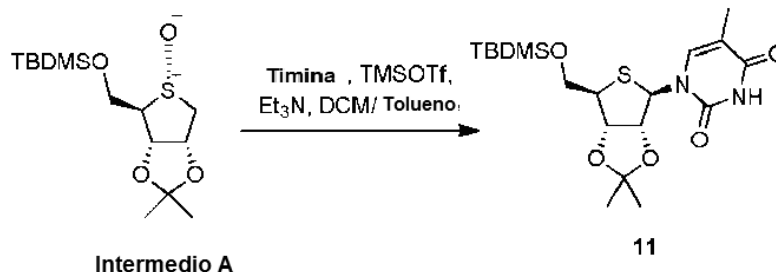
1-((3aR, 4R, 6R, 6aS)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)pirimidin-2(1H)-ona (**13.1**).

Síntesis de 1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-5-metilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona

5

10

15



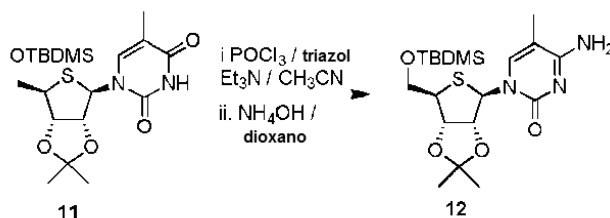
A una suspensión de timina (2,60 g, 20,6 mmol) en tolueno (112 ml) se añadió trietilamina (4,17 g, 41,2 mmol) y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (18,3 g, 11,1 g, 82,5 mmol). Después de agitar durante una hora a temperatura ambiente se añadió diclorometano (34 ml) a la mezcla bifásica, para dar una solución; a continuación, esto se añadió gota a gota a una solución de 5-óxido de (3aS,4R,5R,6aR)-4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol (3,30 g, 10,3 mmol) en diclorometano (56 ml) y después se añadió trietilamina (4,17 g, 41,2 mmol). Después de agitar durante 60 minutos a temperatura ambiente, se inactivó la reacción con hielo y después se diluyó con acetato de etilo. Se separaron las capas y la fase orgánica se lavó con una solución de bicarbonato sódico saturado (x 2) y, después, con salmuera. Después de secar sobre sulfato de magnesio, la concentración a presión reducida dio el producto bruto que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, acetato de etilo: Heptano 0-50 %) para dar 1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-5-metilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona (2,9 g, 66 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,43 (s, 1H), 7,46 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 6,07 (d, J = 32 Hz, 1H), 5,72 (m, 2H), 3,87 (m, 2H), 3,71 (m, 1H), 1,93 (s, 3H), 1,59 (s, 3H), 1,32 (s, 3H), 0,92 (s, 9H), 0,10 (s, 3H), 0,09 (s, 3H).

Síntesis de 4-amino-1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-5-methylpyrimidin-2(1H)-ona

35

40

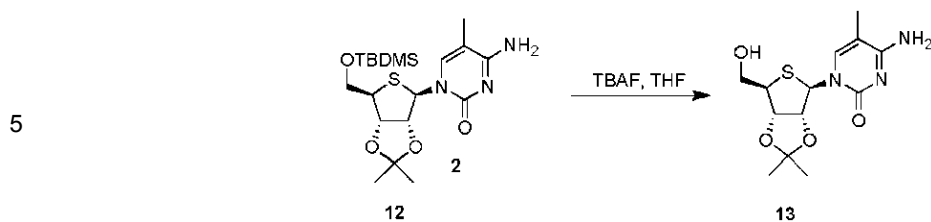
45



Una suspensión de 1,2,4-triazol (6,55 g, 94,8 mmol) en acetonitrilo (140 ml) se enfrió en un baño de hielo a 0 °C; se añadió oxicluro de fósforo (2,53 ml, 27,1 mmol) gota a gota, seguido de trietilamina (18,9 ml, 135 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 minutos y, después, se añadió gota a gota una solución de 1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-5-metilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona (2,9 g, 6,77 mmol) en acetonitrilo (25 ml). La reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 150 minutos y después se repartió entre acetato de etilo y una solución de bicarbonato sódico saturado. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo obtenido se disolvió en dioxano (62 ml) en un autoclave; se añadió hidróxido amónico (62 ml) y el recipiente se selló y agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y agua; la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice: metanol: acetato de etilo 1:10) da 4-amino-1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-5-metilpirimidin-2(1H)-ona (2,60g, 90 %). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,74 (brs, 2H), 7,49 (s, 1H), 6,00 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 4,82 (dd, J = 2,3 and 5,5 Hz, 1H), 4,74 (dd, J = 3,2 and 5,5 Hz, 1H), 3,91 (dd, J = 5,5 and 10,5 Hz, 1H), 3,81 (dd, J = 6,4 and 10,5 Hz, 1H), 3,65 (m, 1H), 1,91 (s, 3H), 1,56 (s, 3H), 1,27 (s, 3H), 0,89 (s, 9H), 0,07 (s, 3H), 0,06 (s, 3H).

Síntesis de 4-amino-1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(hidroximetil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-5-metilpirimidin-2(1H)-ona

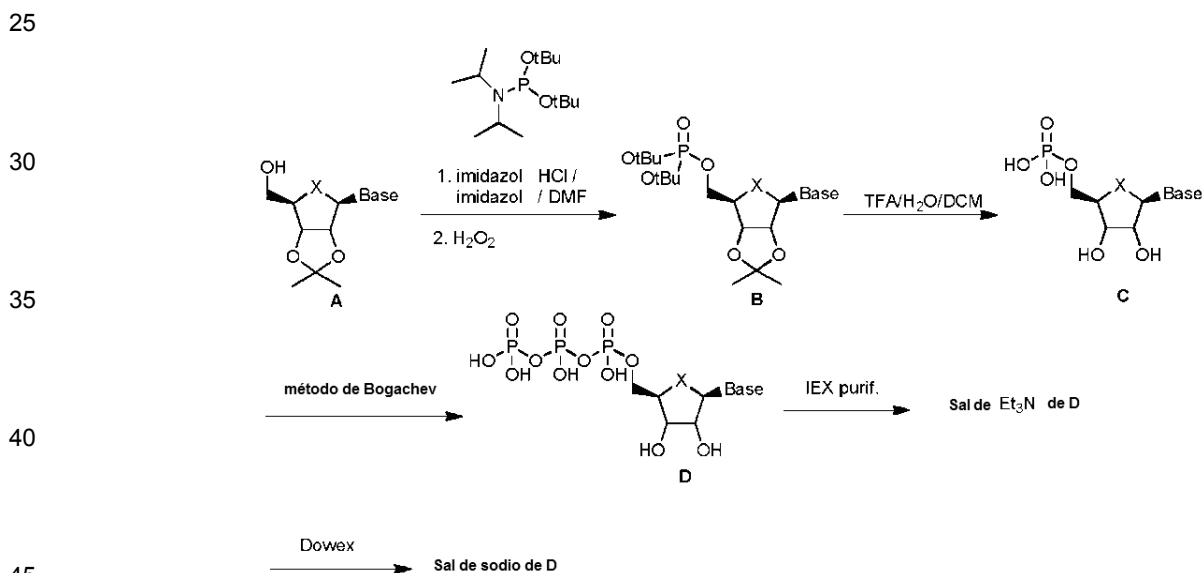
65



10 Una solución de 4-amino-1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidro-tieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-5-metilpirimidin-2(1H)-ona (500 mg, 1,17 mmol) en tetrahidrofurano (1,4 ml) se enfrió en un baño de hielo en argón; se añadió una solución de fluoruro de tetrabutilamonio 1M en tetrahidrofurano (1,4 ml, 1,90 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. El producto bruto se recogió mediante filtración, se lavó con tetrahidrofurano y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice:metanol: acetato de etilo 1 : Síntesis de 4-amino-1-((3aR,4R,6R,6aS)-6-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-2,2-dimetiltetrahidrotieno[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-5-methylpyrimidin-2(1H)-ona RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO)  $\delta$  7,64 (s, 1H), 7,38 (brs, 1H), 6,85 (brs, 1H), 5,97 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 5,19 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 4,8 (dd, J = 2,8 and 5,35 Hz, 1H), 4,80 (dd, J = 3,2 and 5,9 Hz, 1H), 3,67 (m, 1H), 3,54 (m, 1H), 3,47 (td, J = 2,8 and 6,4 Hz, 1H), 1,80 (s, 3H), 1,43 (s, 3H), 1,21 (s, 3H).

20 Síntesis de dianas nucleotídicas:

Esquema general



50 La síntesis de los nucleósidos 5'-trifosfatos se ha mostrado anteriormente. El nucleósido **A** se hace reaccionar con reactivo de fosforamidita en presencia de imidazol.HCl / imidazol en dimetilformamida seguido de oxidación posterior del fósforo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  para dar **B** con buen rendimiento (después de la purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice, típicamente 60 a 83 % de rendimiento). La escisión de los grupos protectores mediante tratamiento con ácido trifluoroacético en  $\text{H}_2\text{O}$  / diclorometano da el monofosfato **C**, típicamente en rendimiento cuantitativo. Finalmente, el trifosfato **D** se obtiene utilizando un método desarrollado por Bogachev (Bogachev, V.S. Synthesis of deoxynucleoside 5'-triphosphates using trifluoroacetic anhydride as activation reagent. Russ. J. Bioorg. Chem., 1996, 22, 599-604).

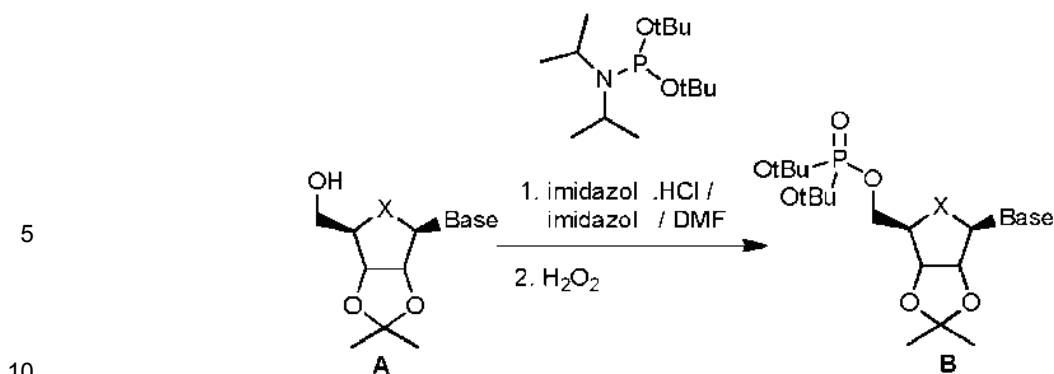
Procedimientos experimentales generales:

60 Síntesis de **B**

60

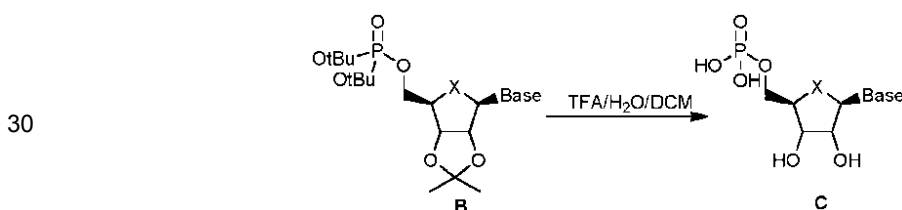
65





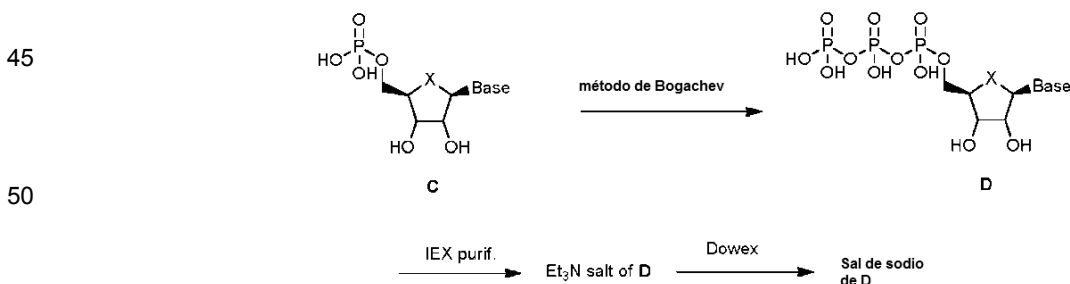
15 A una solución de **A** (1 eq.), imidazol.HCl (1.5 eq.) e imidazol (1 eq.) en dimetilformamida (3 ml / mmol de **A**) se agrega gota a gota di-terc-butil diisopropilfosforamidita (1,5 eq.) a temperatura ambiente en argón. La mezcla de reacción se agita hasta que se observó el consumo completo del material de partida (LC-MS o TLC) (típicamente 30-90 min). A continuación se enfría la mezcla de reacción en un baño de agua con hielo y se trata gota a gota con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 35 % (2,6 eq.). La mezcla de reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita hasta que se observa una reacción completa (LC-MS o TLC); después se enfría en un baño de agua helada y se inactiva cuidadosamente con tiosulfato sódico acuoso saturado. El producto se extrae con acetato de etilo; la capa orgánica se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de magnesio, se filtra y se concentra a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con un eluyente apropiado (generalmente metanol / diclorometano) da **B**, típicamente con un rendimiento del 60 al 85%.

25 Síntesis de **C**



Una mezcla de **B** (1 eq.) en diclorometano (2 ml / mmol de **B**), agua (3 ml / mmol de **B**) y ácido trifluoroacético (3 ml / mmol de **B**) se agita durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida (baño de agua <50 °C) para dar **C**, típicamente en rendimiento cuantitativo.

40 Síntesis de **D**



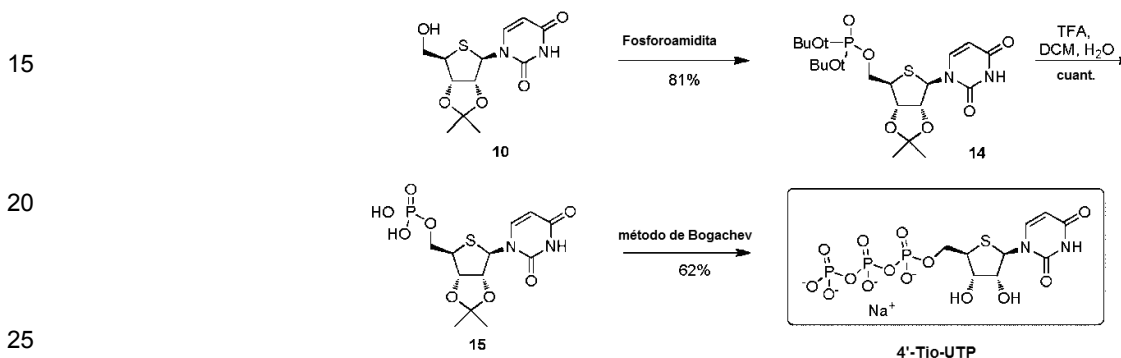
55 Gota a gota se añade una solución enfriada (baño de agua helada) de anhídrido trifluoroacético (5 eq.) en acetonitrilo (0,3 ml / mmol de anhídrido trifluoroacético) a una suspensión enfriada de **C** (1 eq.) en acetonitrilo (4 ml / mmol de **C**), trietilamina (1 eq.) y N, N-dimetilanilina (4 eq.) en argón. A continuación, la reacción se deja calentar a temperatura ambiente, se agita a TA durante 30 minutos y los volátiles se eliminan a presión reducida.

60 El jarabe resultante se disuelve en acetonitrilo (4 ml / mmol de **C**), se enfría en un baño de agua helada y se añaden 1-metilimidazol (3 eq.) y trietilamina (5 eq.) en argón. La mezcla de reacción se agita durante 15 minutos y después se deja calentar a temperatura ambiente.

65 Gota a gota se añade una solución de tris(tetrabutilamonio)pirofosfato (1,5 eq.) en acetonitrilo (1 ml / mmol de pirofosfato) en atmósfera de argón a temperatura ambiente y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 45

minutos. A continuación se inactiva la reacción con agua desionizada (aproximadamente 10–15 ml / mmol de **C**) y se agita durante 1 hora. La mezcla se lava con cloroformo (3 x 10 ml), las capas orgánicas combinadas se vuelven a extraer una vez con agua desionizada (5 ml). Las capas acuosas combinadas se cargan directamente en una columna empaquetada con DEAE Sepharose de flujo rápido y se eluyen con un gradiente de tampón de bicarbonato de trietilamonio de 0,01 M a 0,5 M. Las fracciones que contienen producto se combinan y liofilizan. La sal de trietilamina de nucleósido trifosfato resultante se disuelve en agua desionizada y después se somete a una columna de intercambio iónico Dowex 50 W 8. Las fracciones que muestran actividad UV se combinan y el agua se elimina por liofilización para dar el nucleósido 5'-trifosfato como su sal de sodio.

10 Sal de sodio de ((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxitetra-hidrotiofen-2-il)metiltrifosfato

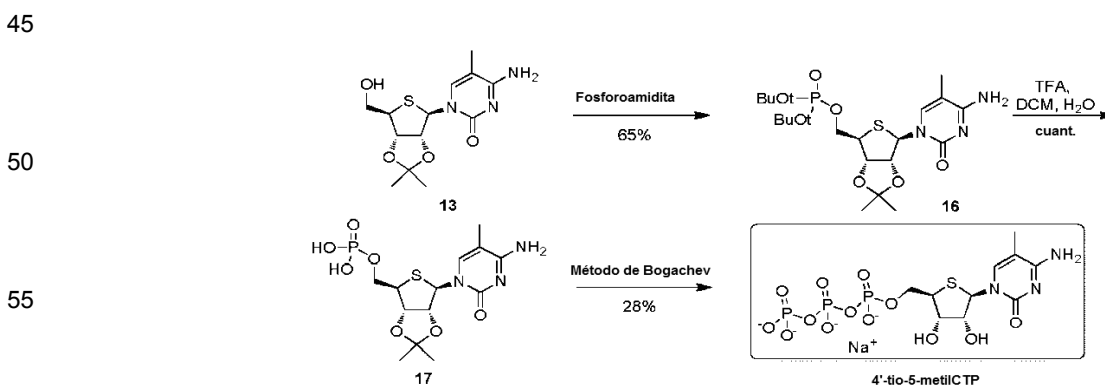


Usando el método descrito anteriormente para la conversión de **A** a **B**, **10** (935 mg, 3,11 mmol) se convirtió en **14** (1,25 g, 81 %). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,38 (brs, 1H), 7,74 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 6,05 (s, 1H), 5,79 (d,  $J = 8,3$  Hz), 4,85 (m, 2H), 4,19 (m, 2H), 3,83 (t,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 1,54 (s, 3H), 1,49 (s, 18H), 1,31 (s, 3H).

Usando el método descrito anteriormente para la conversión de **B** a **C**, **14** (1,25 g, 2,58 mmol) se convirtió en **15** (0,9 g cuant.). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,13 (d,  $J = 7,8$ Hz, 1H), 5,81 (d,  $J = 5,5$ Hz, 1H), 5,76 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 4,24 (dd,  $J = 4,1$  and 6,0 Hz, 1H), 4,11 (t,  $J = 4,1$  Hz, 1H), 3,98 (m, 2H), 3,43 (m, 1H).

Usando el método descrito anteriormente para la conversión de **C** a **D**, **15** (200 mg, 0,59 mmol) se convirtió en **4'-Tio-UTP** (215 mg, 62 % (SI 4Na<sup>+</sup> sal)). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,14 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 5,85 (d,  $J = 6,4$  Hz, 1H), 5,81 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 4,31 (dd,  $J = 3,7$  and 6,4 Hz, 1H), 4,24 (t,  $J = 3,7$  Hz, 1H), 4,12 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,44 (m, 1H). RMN de  $^{31}\text{P}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  -8,57 (d), -10,91 (d), -22,09 (t). HPLC/MS: RT 9,638min,  $m/z$  501 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

Sal de sodio (((2R,3S,4R,5R)-5-(4-amino-5-metil-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroxitetra-hidrotiofen-2-il)metil trifosfato)



Usando el método descrito anteriormente para la conversión de **A** a **B**, **13** (400 mg, 1,28 mmol) se convirtió en **16** (910 mg, 65 %). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,19 (brs, 2H), 7,45 (s, 1H), 5,92 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 4,98 (dd,  $J = 1,8$  and 6,0 Hz, 1H), 4,95 (dd,  $J = 2,3$  and 5,5 Hz, 1H), 4,24 (m, 2H), 3,80 (td,  $J = 1,8$  and 6,0 Hz, 1H), 1,99 (s, 3H), 1,56 (s, 3H), 1,49 (s, 9H), 1,48 (s, 9H), 1,29 (s, 3H).

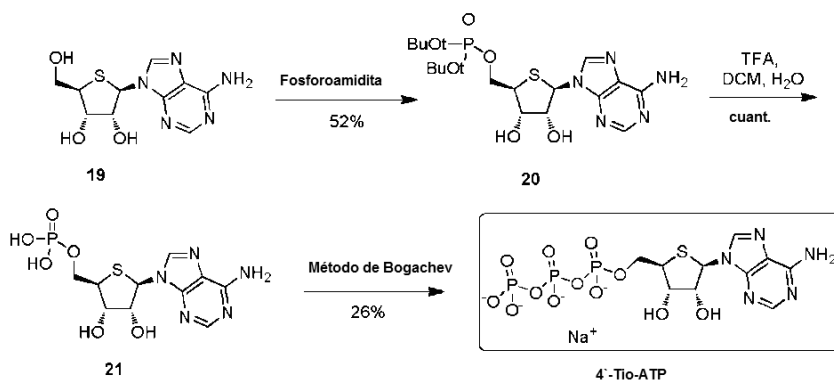
Usando el método descrito anteriormente para la conversión de **B** a **C**, **16** (480 mg, 0,977 mmol) se convirtió en

**17** (350 mg, cuant.). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,16 (s, 1H), 5,80 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 4,25 (dd,  $J = 4,1$  and  $5,5$  Hz, 1H), 4,10 (t,  $J = 4,6$  Hz, 1H), 4,00 (m, 2H), 3,45 (m, 1H), 1,92 (s, 3H). RMN de  $^{31}\text{P}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  0,41.

Usando el método descrito anteriormente para la conversión de **C** a **D**, **15** (300 mg, 0,849 mmol) se convirtió en **4'-tio-metilCTP** (136 mg, 28 % (SI  $4\text{Na}^+$  sal)). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7,84 (s, 1H), 5,85 (d,  $J = 6,4$  Hz, 1H), 4,23 (m, 2H), 4,09 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 3,40 (m, 1H), 1,82 (s, 3H). RMN de  $^{31}\text{P}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  -8,96 (d), -11,00 (d), -22,28 (t). RMN de  $^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  165,52 (Cq), 158,09 (Cq), 139,80 (CH), 105,40 (Cq), 77,26 (CH), 73,25 (CH), 66,06 (CH), 64,04 (CH<sub>2</sub>), 50,09 (CH), 12,33 (CH<sub>3</sub>). HPLC/MS: RT 10,280 min,  $m/z$  514 (M+H)<sup>+</sup>.

Usando un procedimiento análogo a la síntesis anterior de 4'-Tio-5-MetilCTP, pero sustituyendo **13.1** por **13** se puede preparar **4'-Tio-CTP**.

Sal de sodio de ((2R,3S,4R,SR)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihidroxitetrahidrotiofen-2-il)metiltrifosfato

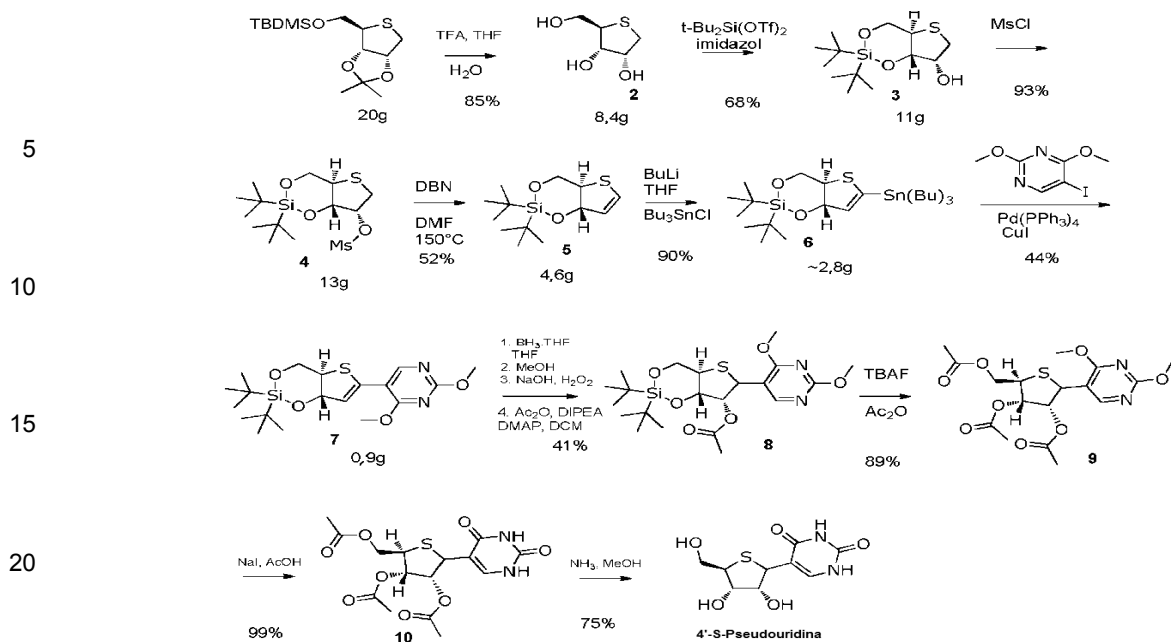


Usando el método descrito anteriormente para la conversión de **A** a **B**, **19** (504 mg, 1,81 mmol) se convirtió en **20** (444 mg, 52 %). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,24 (s, 1H), 8,19 (brs, 1H), 7,71 (brs, 1H), 7,09 (s, 1H), 6,20 (brs, 2H), 6,01 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 4,76 (m, 1H), 4,50 (m, 1H), 4,23 (m, 2H), 3,77 (m, 1H), 1,48 (s, 18H).

Usando el método descrito anteriormente para la conversión de **B** a **C**, **20** (430 mg, 0,904 mmol) se convirtió en **21** (330 mg cuant.). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,64 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 5,86 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 4,54 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 4,06 (m, 2H), 3,54 (m, 1H).

Usando el método descrito anteriormente para la conversión de **C** a **D**, **21** (82 mg, 0,162 mmol) se convirtió en **4'-Tio-ATP** (35 mg, 26 % (SI  $4\text{Na}^+$  sal)). RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,49 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 5,76 (d,  $J = 5,6$  Hz, 1H), 4,54 (dd,  $J = 3,7$  and  $5,6$  Hz, 1H), 4,35 (t,  $J = 4,1$  Hz, 1H), 4,13 (m, 2H), 3,54 (dd,  $J = 4,1$  and  $8,7$  Hz, 1H). RMN de  $^{31}\text{P}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  -9,07 (d), -10,81 (d), -22,15 (t). HPLC/MS: RT 10,467 min,  $m/z$  524 (M+H)<sup>+</sup>.

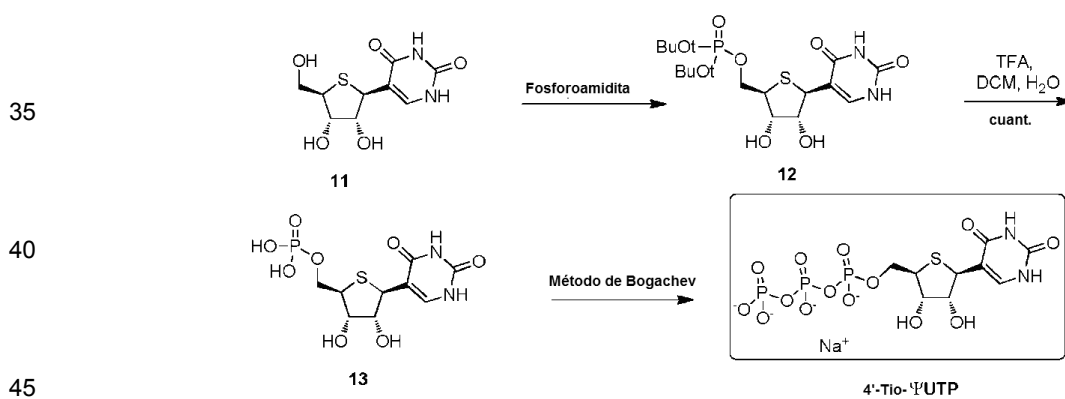
5-((3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrotiofen-2-il)pirimidina 2,4(1H,3H) diona (4'-S-Pseudouridina). Este compuesto se puede preparar siguiendo el esquema siguiente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.



25

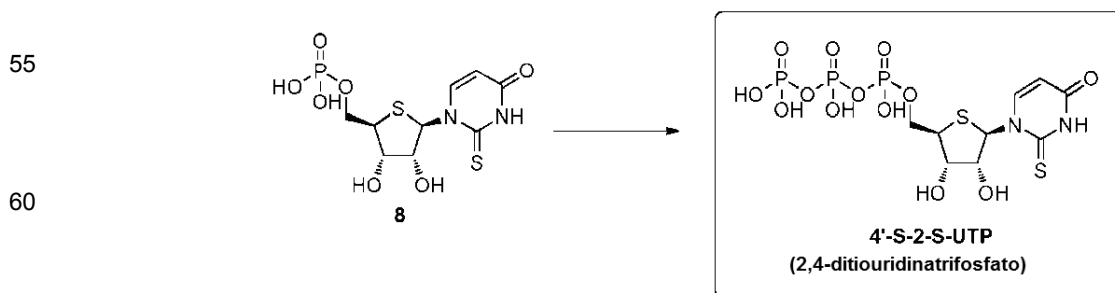
30

Sal de sodio de ((2R,3S,4R,5S)-5-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)-3,4-dihidroxitetrahidrotiofen-2-il)metiltrifosfato Este compuesto se puede preparar siguiendo el esquema siguiente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.



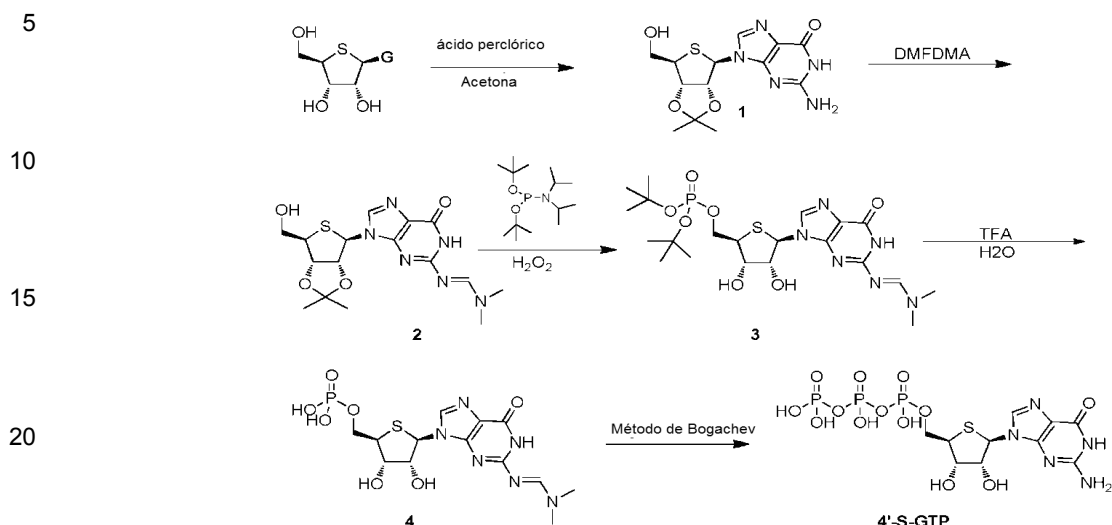
50

Sal de sodio de ((2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-(4-oxo-2-tioxi-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)tetrahidrotiofen-2-il)metiltetrahidrógenotrifosfato (4'-S-2-S-UTP). Este compuesto se puede preparar siguiendo el esquema siguiente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.



Sal de sodio de ((2R,3S,4R,5R)-5-(2-amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-il)-3,4-dihidroxitetrahidrotiofen-2-il)metiltrifosfato

ii) metiltetrahidrógenotrifosfato Este compuesto se puede preparar siguiendo el esquema siguiente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.



La memoria descriptiva se entiende mejor a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria descriptiva. Las realizaciones en la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las formas de realización de la invención y no deben interpretarse que limitan el alcance de la invención según lo reivindicado. El experto en la técnica reconoce fácilmente que muchas otras realizaciones están abarcadas por la invención tal como se reivindica. La mención de cualquier referencia en el presente documento no es una admisión de que dichas referencias son la técnica anterior a la presente invención.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. usados en la memoria deben entenderse como aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener. Cada parámetro numérico debería interpretarse a la luz del número de dígitos significativos y aplicando técnicas de redondeo habituales. La mención de series de números con diferentes cantidades de dígitos significativos en la memoria no debe interpretarse como que implica que los números con menos dígitos significativos proporcionados tienen la misma precisión que los números con dígitos más significativos.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar "y / o" a menos que se indique de forma explícita para referirse únicamente a las alternativas o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere sólo a las alternativas y a "y / o".

A menos que se indique lo contrario, la expresión "al menos" precediendo a una serie de elementos debe entenderse que hace referencia a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más de una experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen los procedimientos y materiales preferidos.

Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar confirmarse de forma independiente.

Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la especificación y la práctica de la invención divulgada en el presente documento. Se pretende que la memoria y los ejemplos se consideren únicamente como ejemplos.

**Reivindicaciones**

1. Una molécula de ARNm que tiene una región codificante y, opcionalmente, una o más regiones no codificantes, en la que al menos el 1 % de los restos de nucleótidos del ARNm incorpora un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido, en la que el ARNm modificado tiene una estabilidad y eficacia traduccional modificadas cuando se compara con el ARNm no modificado.
2. La molécula de ARNm de la reivindicación 1, en la que
- (i) al menos el 1% de los restos de nucleótidos de adenosina incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido, y / o
- (ii) al menos el 1 % de los restos de guanosina incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido, y / o
- (iii) al menos el 1% de los restos de uridina incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido, y / o
- (iv) al menos el 1% de los restos de citidina incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido.
3. La molécula de ARNm de la reivindicación 1 o 2, en la que el 1-10 % de los restos de nucleótidos incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido.
4. La molécula de ARNm de la reivindicación 1 o 2, en la que al menos el 50 % o al menos el 99 % de los restos incorporan un anillo de furanosa 4'-tio-sustituido.
5. La molécula de ARNm de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la región no codificante comprende una cola de poli-A y en la que la cola de poli-A comprende restos de 4'-tio-adenosina, opcionalmente en la que la cola de poli-A tiene al menos aproximadamente 90 o al menos aproximadamente 500 restos de nucleótidos de longitud.
6. La molécula de ARNm de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el ARNm comprende además al menos un resto nucleotídico no estándar, opcionalmente en la que el resto de nucleótido no estándar se elige de entre uno o más de 5-metil-citidina, pseudouridina y 2-tio-uridina, opcionalmente en la que el uno o más restos de nucleósidos no estándar se modifica adicionalmente para incluir una 4'-tio-furanosa.
7. La molécula de ARNm de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la molécula comprende al menos 200 o al menos 5000 restos de nucleótidos.
8. La molécula de ARNm de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la región codificante codifica una proteína terapéutica, opcionalmente en la que la proteína terapéutica se elige de entre eritropoyetina, hormona del crecimiento humano, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), insulina, alfa-galactosidasa A, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N -acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparán sulfamidasa, hialuronidasa, galactocerebrosidasa, ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS 1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL), arginasa 1 (ARG1), glucosa-6-fosfatasa, glucosa-6-fosfato translocasa, enzima desramificante de glucógeno, alfa-glucosidasa lisosomal, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, glucógeno fosforilasa, fosfofructocinasa, fosforilasa hepática, GLUT-2, UDP glucógeno sintasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfato sulfatasa, heparán sulfato sulfamidasa, alfa-N-acetilglucosa amidasa, alfa-glucosaminid-N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, apolipoproteína E, receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), factores de coagulación, tal como, por ejemplo, factor VIII y factor IX, neurona motora espinal 1 (SMN1), fenilalanina hidroxilasa, propionil-CoA carboxilasa, porfobilinógeno desaminasa, metilmalonil-CoA mutasa, urato oxidasa, inhibidor de la C1 esterasa y ácido alfa-glucosidasa.
9. Una composición que comprende al menos una molécula de ARNm de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que el vehículo comprende un lípido.
11. La composición de la reivindicación 10, en la que el ARNm está encapsulado dentro de una nanopartícula lipídica, opcionalmente en la que la nanopartícula lipídica comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos auxiliares y / o un lípido pegilado.
12. La composición de la reivindicación 11, en la que la nanopartícula lipídica comprende:
- (i) uno o más lípidos catiónicos seleccionados de entre XTC (2,2- Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano), MC3 (((6Z,9Z,28Z,31Z)- heptatriaconta-6,9,28,3 1-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato), ALNY-100 ((3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina)), NC98-5 (4,7,13-tris(3-oxo-3-(undecilamino)propil)-N1,N16-diundecil-4,7,10,13-tetraazahexadecano-

1,16- diamida), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamoniopropano), HGT4003, ICE, HGT5000, cis o trans HGT5001, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamoniopropano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamoniopropano), DLinDMA, DLin-KC2-DMA y C12-200 y/o

5 (ii) uno o más lípidos auxiliares seleccionados de entre DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)) y colesterol.

10 **13.** La composición de la reivindicación 9, en la que el vehículo comprende un polímero, opcionalmente en la que el polímero es polietilenimina.

**14.** El ARNm de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13 para su uso como medicamento.

15

20

25

30

35

40

45

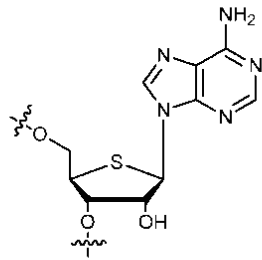
50

55

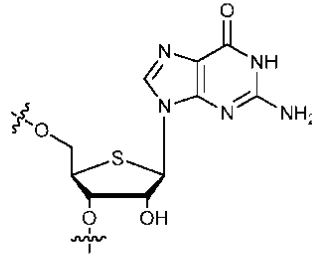
60

65

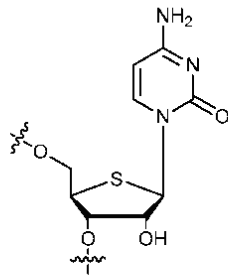
FIG. 1



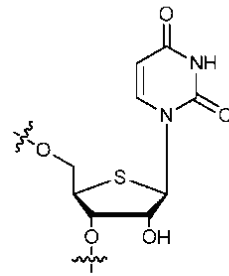
4'-tio-adenosina



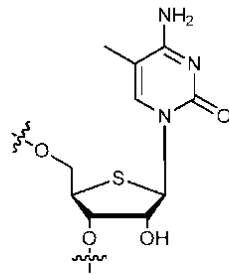
4'-tio-guanosina



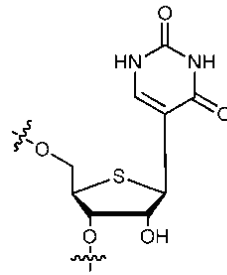
4'-tio-citidina



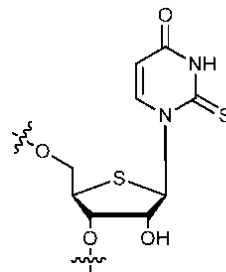
4'-tio-uridina



4'-tio-5-metil-citidina



4'-tio-pseudouridina



4'-tio-2-tiouridina  
o  
2,4'-ditiouridina



FIG. 2

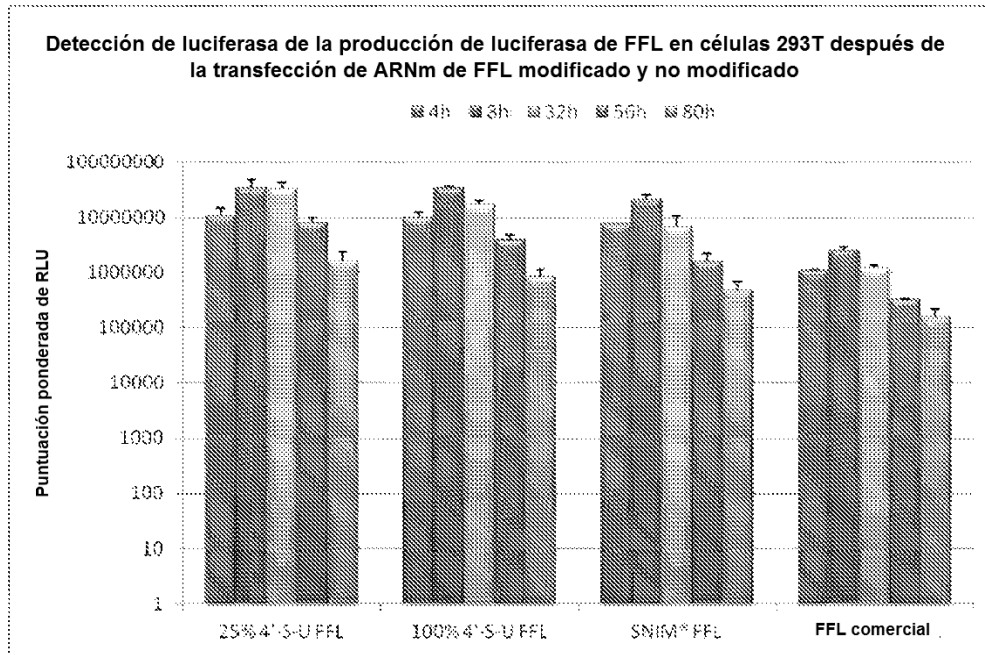


FIG. 3

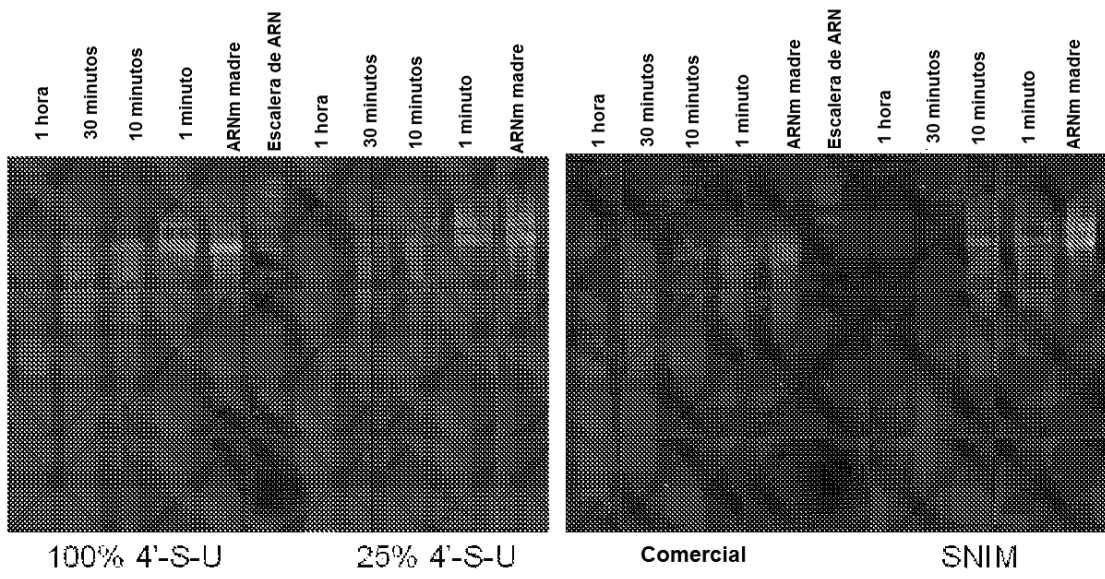
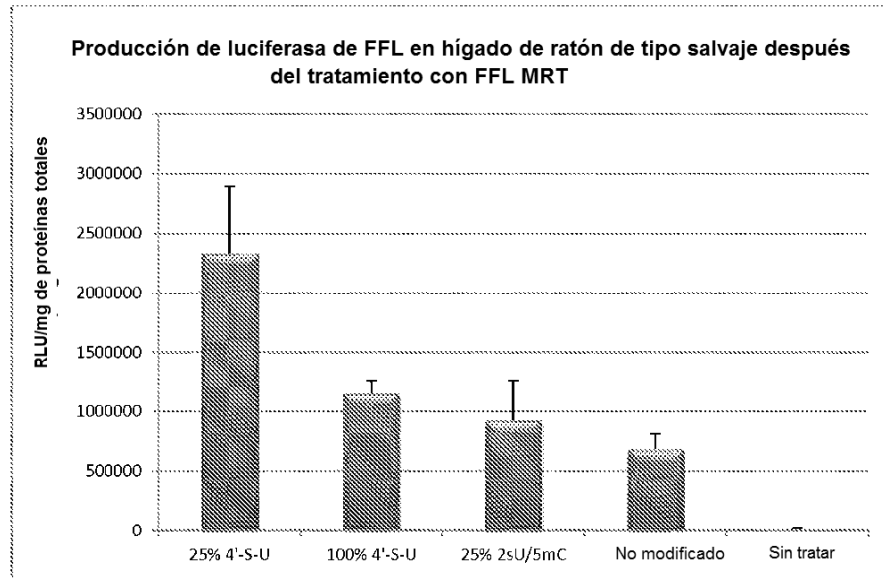


FIG. 4



Dosificación de nanopartículas lipídicas cargadas con C12-200 de varios ARNm de FFL modificados y no modificados en ratón WT. Se administró 1,0 mg/kg por vía intravenosa y se analizaron los hígados seis horas después de la administración.