

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 562**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6804** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027602**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14152673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14720376 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2971098**

54 Título: **Evaluación cuantitativa de la eficacia de tapa de ARN mensajero**

30 Prioridad:

**14.03.2013 US 201361784253 P**

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

**10.04.2019**

73 Titular/es:

**TRANSLATE BIO, INC. (100.0%)  
29 Hartwell Avenue  
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**HEARTLEIN, MICHAEL;  
DEROSA, FRANK y  
DIAS, ANUSHA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 708 562 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Evaluación cuantitativa de la eficacia de tapa de ARN mensajero

## 5 ANTECEDENTES

[0001] La terapia de ARN mensajero ("ARNm") se está convirtiendo en un enfoque cada vez más importante para el tratamiento de una variedad de enfermedades. La terapia de ARNm efectiva requiere la administración efectiva del ARNm al paciente y la producción eficiente de la proteína codificada por el ARNm dentro del cuerpo del paciente. Para optimizar el suministro de ARNm y la producción de proteínas *in vivo*, generalmente se requiere un límite adecuado en el extremo 5' de la construcción, que protege al ARNm de la degradación y facilita la traducción exitosa de proteínas. Por lo tanto, la caracterización precisa de la eficiencia de tapa es particularmente importante para determinar la calidad del ARNm para aplicaciones terapéuticas. Nojima et al. (2007) J Biol Chem, 282:21, describe la provisión de una sustancia de unión específica de tapa para la investigación de complejos de RNA con tope.

## 15 SUMARIO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención proporciona métodos mejorados para determinar de forma precisa y cuantitativa la eficacia de la limitación del ARNm sintetizado *in vitro*. Como se mencionó anteriormente, la limitación adecuada es importante para la producción exitosa de proteínas *in vivo*. Sin embargo, antes de la presente invención, la mayoría de los ensayos de límites son cualitativos, lo que no es suficiente para evaluar la calidad de un producto terapéutico basado en ARNm y la seguridad y eficacia relacionadas para el uso *in vivo*. De hecho, antes de la presente invención, no hay ningún método disponible que permita la cuantificación de la eficacia de la limitación sin alteraciones permanentes de los ARNm en una muestra. Como se describe en detalle a continuación, la presente invención se basa en la formación y cuantificación de un complejo entre un anticuerpo específico de tapa y un ARNm cubierto usando ELISA. Por lo tanto, la presente invención proporciona un enfoque cuantitativo simple, confiable y eficiente para evaluar la eficacia de la limitación del ARNm. La presente invención es particularmente útil para el control de calidad durante la fabricación de ARNm y para la caracterización de ARNm como un ingrediente farmacéutico activo (API) en productos terapéuticos finales.

[0003] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para cuantificar la eficacia de la limitación del ARNm, comprendiendo el método:

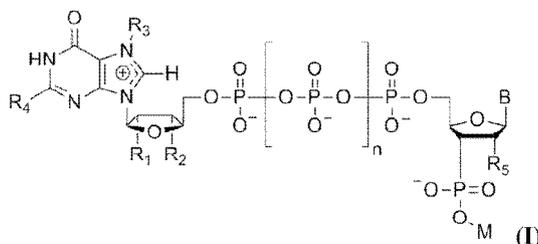
transcribiendo ARNm *in vitro*;

tomar una muestra alícuota representativa de la reacción de síntesis *in vitro*;

proporcionar una sustancia de unión de tapa específica en condiciones que permiten la formación de un complejo entre la sustancia de unión de tapa específica y el ARNm cubierto, en donde la sustancia de unión de tapa específica es un anticuerpo específico de la tapa; y

determinar cuantitativamente la cantidad del complejo en la muestra alícuota representativa en comparación con un control, cuantificando así la eficacia de la capacidad de límite del ARNm para determinar su calidad como ingrediente farmacéutico activo (API) en un producto terapéutico final, en el que la etapa de determinar cuantitativamente la cantidad del complejo comprende realizar un ensayo ELISA.

[0004] En algunas realizaciones, se puede usar un método de la presente invención para cuantificar una tapa que tiene una estructura de fórmula I:



en donde,

B es una nucleobase;

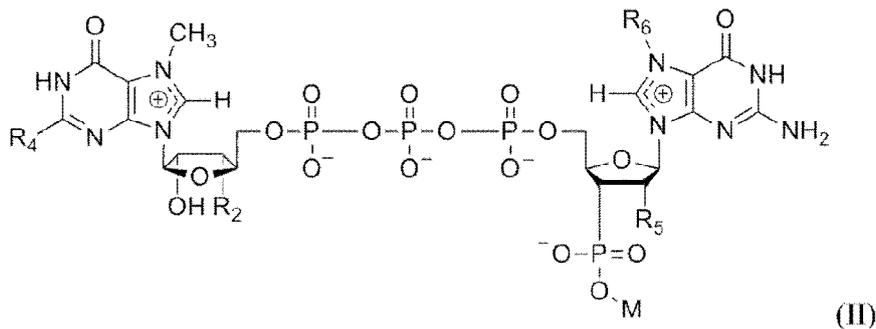
R<sup>1</sup> se selecciona de un halógeno, OH y OCH<sub>3</sub>;

R<sup>2</sup> se selecciona de H, OH y OCH<sub>3</sub>;

R<sup>3</sup> es CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o vacío;  
 R<sub>4</sub> es NH<sub>2</sub>;  
 R<sup>5</sup> se selecciona de OH, OCH<sub>3</sub> y un halógeno;  
 n es 1, 2 o 3; y  
 M es un nucleótido del ARNm.

[0005] En algunas realizaciones, la nucleobase es guanina.

[0006] En algunas realizaciones, un método de la presente invención se puede usar para cuantificar una tapa m<sup>7</sup>G con una estructura de fórmula II:



en donde,

R<sub>2</sub> es H o CH<sub>3</sub>;

R<sub>4</sub> es NH<sub>2</sub>;

R<sub>5</sub> es OH u OCH<sub>3</sub>;

R<sub>6</sub> es H o CH<sub>3</sub>; y

M es un nucleótido del ARNm.

[0007] En algunas realizaciones, una sustancia de unión de tapa específica adecuada es un anticuerpo anti-m<sup>7</sup>G.

[0008] En algunas realizaciones, la etapa de determinar cuantitativamente la cantidad del complejo midiendo una señal detectable asociada al complejo. En algunas realizaciones, la señal detectable está directamente asociada con la sustancia de unión de tapa específica. En algunas realizaciones, la señal detectable está asociada indirectamente con la sustancia de unión de tapa específica a través de un agente secundario que se une a la sustancia de unión de tapa específica. En algunas realizaciones, un agente secundario adecuado es un anticuerpo secundario.

[0009] En algunas realizaciones, una señal detectable adecuada es una señal fluorescente, una señal colorimétrica o una señal radiactiva. En algunas realizaciones, se genera una señal fluorescente adecuada convirtiendo un sustrato enzimático en un producto cromogénico, quimi fluorescente o quimioluminiscente por una enzima asociada directa o indirectamente con la sustancia de unión de tapa específica. En algunas realizaciones, un sustrato enzimático adecuado se selecciona de los grupos que consisten en sal disódica de fosfato de p-nitrofenilo (PNPP), sal de 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-diamonio (ABTS), dihidrocloruro de fenilendiamina (OPD) y 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). En algunas realizaciones, una enzima adecuada es la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante.

[0010] En algunas realizaciones, un control adecuado para la determinación cuantitativa es una muestra de ARNm con una cantidad predeterminada de ARNm con tapa. En algunas realizaciones, un control adecuado para la determinación cuantitativa comprende una cantidad predeterminada de tapa sintetizada.

[0011] En algunas realizaciones, la cuantificación de la eficacia del límite del ARNm comprende la cuantificación de la cantidad absoluta de ARNm con límite en la muestra del ARNm. En algunas realizaciones, la cuantificación de la eficacia del límite del ARNm comprende la cuantificación del porcentaje de ARNm con límite en la muestra del ARNm.

[0012] En algunas realizaciones, el método de acuerdo con la presente invención comprende además una etapa de captura del ARNm sobre un sustrato. En algunas realizaciones, el ARNm es capturado por un oligo poli-T que se une a la cola poli-A del ARNm. En algunas realizaciones, el ARNm es capturado por una proteína o anticuerpo de

unión a poli-A. En algunas realizaciones, un sustrato adecuado es una microplaca, perla magnética, partícula, perla polimérica, resina cromatográfica, papel de filtro, nitrocelulosa, diazocelulosa, vidrio, látex, poliestireno, cloruro de polivinilo, propileno, polietileno, dextrano, sefariosa, agar, almidón, nailon, gel de silicona, o hidrogel. En algunas realizaciones, el sustrato está recubierto con avidina o estreptavidina. En algunas realizaciones, una proteína o anticuerpo de unión a oligo poli-T o poli-A usado para capturar el ARNm está biotinilado.

**[0013]** La invención proporciona además un método para fabricar ARNm que comprende una etapa de cuantificación de la eficacia de limitación del ARNm de acuerdo con el método descrito en los párrafos anteriores.

**[0014]** Entre otras cosas, la presente descripción también proporciona composiciones y kits para realizar los métodos de la invención descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un kit para cuantificar la eficacia de la limitación del ARNm, comprendiendo el kit una sustancia de unión de tapa específica; uno o más reactivos para detectar un complejo entre la sustancia de unión de tapa específica y un ARNm con tapa, y un control para cuantificar el ARNm con tapa. En algunas realizaciones, una sustancia de unión de tapa específica adecuada es un anticuerpo específico de la tapa. En algunas realizaciones, un anticuerpo específico de tapa adecuado es un anticuerpo anti-m<sup>7</sup>G. En algunas realizaciones, un kit de la presente descripción contiene además un sustrato para capturar ARNm.

**[0015]** Como se usa en esta solicitud, los términos "aproximadamente" y "alrededor de" se usan como equivalentes. Cualquier número utilizado en esta solicitud con o sin aproximadamente/alrededor de está destinado a cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica relevante.

**[0016]** Otras características, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada que sigue. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, si bien indica realizaciones de la presente invención, se proporciona solo a modo de ilustración, no de limitación. Varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención como se reivindica serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0017]** Los dibujos tienen fines ilustrativos y no son limitativos de ninguna manera.

**FIG. 1** ilustra una representación ejemplar de una realización de la invención basada en ELISA tipo sándwich en la que un anticuerpo de anti-m<sup>7</sup>G de tapa de ratón primario monoclonal se une específicamente a la tapa de un ARNm. El ARNm se ha capturado indirectamente en un sustrato sólido mediante la hibridación de su cola de poli(A) con un cebador oligo-dT biotinilado, que se une directamente al sustrato sólido recubierto con estreptavidina.

**FIG. 2** es un diagrama de estructuras limitadas de ARNm a modo de ejemplo y una estructura sin tapar presente en diversas realizaciones de la invención.

**FIG. 3** es un gráfico de barras que demuestra la cuantificación de los niveles de proteína de alfa-galactosidasa humana secretada (GLA) medida a través de ELISA. La proteína detectada es el resultado de su producción a partir de ARNm de GLA administrado por vía intravenosa a través de una dosis única de nanopartículas lipídicas (30 ug de ARNm de GLA encapsulado) seis horas después de la administración.

**FIG. 4** muestra un gráfico ejemplar que demuestra la cuantificación del límite en varias cantidades de ARNm con y sin límite según se mide por ELISA. La señal detectada se deriva de la interacción del anticuerpo anti-tapa con la estructura de tapa en las muestras de ARN.

**FIG. 5** muestra un gráfico de barras ejemplar que demuestra la cuantificación del límite interno en la casa y el ARNm protegido sintetizado comercialmente junto con un ARN estándar N7 Metilo cubierto como medido por ELISA. La señal detectada se deriva de la interacción del anticuerpo anti-tapa con la estructura de tapa en las muestras de ARN.

## DEFINICIONES

**[0018]** Para que la presente invención se entienda más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

**[0019]** *Afinidad*: como se conoce en la técnica, la "afinidad" es una medida de la estrechez con la que se une un ligando particular (por ejemplo, se asocia de manera no covalente con) y/o la velocidad o frecuencia con la que se disocia, su pareja. Como se conoce en la técnica, se puede utilizar cualquiera de una variedad de tecnologías para determinar la afinidad. En muchas realizaciones, la afinidad representa una medida de unión específica.

**[0020]** *Recocado o hibridación*: como se usa en este documento, los términos "recocado", "hibridación" y equivalente

gramatical, se refieren a la formación de complejos (también llamados dúplex o híbridos) entre secuencias de nucleótidos que son suficientemente complementarias para formar complejos a través de Watson-Crick de bases de pareja o emparejamiento de bases no canónicas. Se apreciará que las secuencias de hibridación o recocido no necesitan tener un complemento perfecto para proporcionar híbridos estables. En muchas situaciones, se formarán híbridos estables donde menos del 10% de las bases son desajustes. En consecuencia, como se usa en el presente documento, el término "complementario" se refiere a una molécula de ácido nucleico que forma un dúplex estable con su complemento en condiciones particulares, generalmente donde hay aproximadamente un 90% o más de homología (por ejemplo, aproximadamente un 95% o más, aproximadamente un 98% o más, o aproximadamente homología del 99% o más). Los expertos en la materia entienden cómo estimar y ajustar la rigurosidad de las condiciones de hibridación, de modo que las secuencias que tienen al menos un nivel deseado de complementariedad se hibriden de manera estable, mientras que las que tienen una menor complementariedad no lo harán. Para ver ejemplos de condiciones y parámetros de hibridación, consulte, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, Segunda edición, Cold Spring Harbor Press: Plainview, NY y Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", 1994, John Wiley & Sons: Secaucus, NJ. Se dice que la complementariedad entre dos moléculas de ácido nucleico es "completa", "total" o "perfecta" si todas las bases del ácido nucleico son iguales, y se dice que es "parcial" de lo contrario.

**[0021] Anticuerpo:** como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican típicamente como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican típicamente en gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Se sabe que una unidad estructural típica de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos "cadena ligera variable" (VL) y "cadena pesada variable" (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. Un anticuerpo puede ser específico para un antígeno particular (por ejemplo, tapas ARNm m<sup>7</sup>G). El anticuerpo o su antígeno pueden ser un analito o una pareja de unión. Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)<sup>2</sup>, un dímero de Fab que es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab)<sup>2</sup> puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero (Fab)<sup>2</sup> en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (ver, Fundamental Immunology, WE Paul, ed., Raven Press, NY (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Aunque se definen varios fragmentos de anticuerpos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la técnica apreciará que tales fragmentos Fab' pueden sintetizarse de novo químicamente o utilizando una metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término "anticuerpo", como se usa en este documento, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo utilizando metodologías de ADN recombinante. En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos de cadena simple, como los anticuerpos Fv de cadena única (scFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen (directamente o a través de un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo. Un polipéptido Fv de una sola cadena ("scFv") es un heterodímero VH:VL enlazado covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican VH y VL, ya sea unidas directamente o unidas por un enlazador codificador de péptidos, por ejemplo, Huston, et al. (1988) PROC. NAT. ACAD. SCI. EE.UU., 85:5879-5883.). Existen varias estructuras para convertir las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas naturalmente agregadas, pero separadas químicamente, de una región V de anticuerpo en una molécula scFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N<sup>os</sup> 5.091.513 y 5.132.405 y 4.956.778.

**[0022] Aproximadamente:** como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" o "alrededor de", aplicado a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto (excepto cuando dicho número supere el 100% de un valor posible).

**[0023] Sustancia de unión:** como se usa en este documento, el término "sustancia de unión" incluye cualquier molécula, como una proteína (por ejemplo, un péptido, un anticuerpo, etc.), un ácido nucleico, un oligonucleótido, un compuesto químico, que se une un objetivo (por ejemplo, un antígeno, un nucleótido, un péptido, un polinucleótido, etc.). Una sustancia vinculante también se conoce como un agente de captura.

**[0024] Compuesto y agente:** los términos "compuesto" y "agente" se usan aquí de manera intercambiable. Se

refieren a cualquier molécula de origen natural o no natural (es decir, sintética o recombinante), como una macromolécula biológica (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido o proteína), molécula orgánica o inorgánica, o un extracto hecho de materiales biológicos, como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (especialmente mamíferos, incluidos los humanos). El compuesto puede ser una sola molécula o una mezcla o

5 compleje de al menos dos moléculas.

**[0025] Control:** tal como se usa en el presente documento, el término "control" tiene su significado en la técnica de ser un estándar contra el que se comparan los resultados. Normalmente, los controles se usan para aumentar la integridad en los experimentos al aislar las variables para llegar a una conclusión acerca de dichas variables. En algunas realizaciones, un control es una reacción o ensayo que se realiza simultáneamente con una reacción o ensayo de prueba para proporcionar un comparador. En un experimento, se aplica la "prueba" (es decir, la variable que se está ensayando). En el segundo experimento, el "control", la variable que se está ensayando no se aplica. En algunas realizaciones, un control es un control histórico (es decir, de una prueba o ensayo realizado anteriormente, o una cantidad o resultado que es conocido previamente). En algunas realizaciones, un control es o comprende un tronco impreso o guardado de otro modo. Un control puede ser un control positivo o un control negativo.

10

15

**[0026] Señal detectable:** como se usa en el presente documento, el término "señal detectable" se refiere a una señal que puede ser detectada o medida por un ser humano o una máquina. En algunas realizaciones, una señal detectable se puede cuantificar de tal manera que la intensidad de la señal esté relacionada con (por ejemplo, proporcional a) la cantidad del compuesto asociado con la señal. Dependiendo de la naturaleza de la señal, una señal detectable puede ser detectada, medida o cuantificada por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Una "señal detectable" también se conoce como "agente detectable" o "resto detectable" en esta solicitud.

20

**[0027] Kit:** como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de administración para entregar materiales. Dichos sistemas de administración pueden incluir sistemas que permitan el almacenamiento, transporte o administración de diversos reactivos de diagnóstico o terapéuticos (por ejemplo, oligonucleótidos, anticuerpos, enzimas, etc. en los contenedores apropiados) y/o materiales de apoyo (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar el ensayo, etc.) de un lugar a otro. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recintos (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción relevantes y/o materiales de soporte. Tal como se usa en el presente documento, el término "kit fragmentado" se refiere a sistemas de administración que comprenden dos o más contenedores separados que contienen cada uno una subporción de los componentes totales del kit. Los contenedores se pueden entregar al destinatario previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para uso en un ensayo, mientras que un segundo recipiente contiene oligonucleótidos. El término "kit fragmentado" pretende abarcar kits que contienen reactivos específicos de analito (ASR) regulados en la sección 520(e) de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, pero no están limitados a los mismos. De hecho, cualquier sistema de administración que comprenda dos o más contenedores separados que contengan una subporción de los componentes totales del kit se incluye en el término "kit fragmentado". En contraste, un "kit combinado" se refiere a un sistema de administración que contiene todos los componentes en un solo contenedor (por ejemplo, en una sola caja que contiene cada uno de los componentes deseados). El término "kit" incluye kits fragmentados y combinados.

25

30

35

40

**[0028] Etiquetado:** como se usa en este documento, el término "marcado" se refiere a la unión de una señal, agente o resto detectable a un compuesto. Ver la definición de señal detectable.

45

**[0029] Nucleósido:** el término "nucleósido" o "nucleobase", como se usa en el presente documento, se refiere a adenina ("A"), guanina ("G"), citosina ("C"), uracilo ("U"), timina ("T") y sus análogos unidos a un carbohidrato, por ejemplo, D-ribosa (en ARN) o 2'-deoxi-D-ribosa (en ADN), a través de un enlace N-glicosídico entre el carbono anomérico del carbohidrato (átomo de 1'-carbono del carbohidrato) y la nucleobase. Cuando la nucleobase es purina, por ejemplo, A o G, el azúcar ribosa generalmente se une a la posición N9 del anillo heterocíclico de la purina. Cuando la nucleobase es pirimidina, por ejemplo, C, T o U, el azúcar está generalmente unido a la posición N1 del anillo heterocíclico. El carbohidrato puede estar sustituido o no sustituido. Los azúcares de ribosa sustituidos incluyen, pero no se limitan a, aquellos en los que uno o más de los átomos de carbono, por ejemplo el átomo de carbono 2', está sustituido con uno o más de Cl, F, -R, O, -NR<sub>2</sub> o grupos halógenos iguales o diferentes, donde cada R es independientemente H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo o C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> arilo. Los ejemplos de ribosa incluyen ribosa, 2'-desoxirribosa, 2',3'-didesoxirribosa, 2'-halorribosa, 2'-fluororribosa, 2'-clororribosa y 2'-alquilribosa, por ejemplo, 2'-O-metilo, 4'-nucleótidos alfa-anoméricos, nucleótidos IA-anoméricos (Asseline et al., NUCL. ACIDS RES., 19:4067-74 [1991]), modificaciones de azúcar bicíclico con enlaces 2'-4'- y 3'-4' y otras "bloqueadas" o "LNA", (documentos WO 98/22489; WO 98/39352; WO 99/14226).

50

55

60

**[0030] Nucleótido:** el término "nucleótido", como se usa en este documento, significa un nucleósido en una forma fosforilada (un éster de fosfato de un nucleósido), como una unidad monomérica o dentro de un polímero polinucleótido. "Nucleótido 5'-trifosfato" se refiere a un nucleótido con un grupo éster trifosfato en la posición 5', a veces indicado como "NTP" o "dNTP" o "ddNTP" para señalar particularmente las características estructurales del azúcar ribosa. El grupo éster trifosfato puede incluir sustituciones de azufre para los diversos restos de oxígeno, por ejemplo, alfa-tio-nucleótido 5'-trifosfatos. Los nucleótidos pueden existir en las formas mono-, di- o tri-fosforiladas.

65

Los átomos de carbono de la ribosa presentes en los nucleótidos se designan con un carácter principal (') para distinguirlos de la numeración del esqueleto en las bases. Para una revisión de la química de polinucleótidos y ácidos nucleicos, consulte Shabarova, Z. y Bogdanov, A. *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, VCH, Nueva York, 1994.

**[0031]** *Ácido nucleico*: los términos "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "polinucleótido" u "oligonucleótido" se pueden usar aquí de manera intercambiable. Se refieren a polímeros de nucleótidos o análogos de los mismos, como el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN) y sus combinaciones. Los nucleótidos pueden ser de origen genómico, sintético o semisintético. A menos que se indique lo contrario, los términos abarcan estructuras similares a los ácidos nucleicos con esqueletos sintéticos, así como productos de amplificación. Como apreciará un experto en la materia, la longitud de estos polímeros (es decir, el número de nucleótidos que contiene) puede variar ampliamente, a menudo dependiendo de su función o uso previsto. Los polinucleótidos pueden ser moléculas lineales, ramificadas o circulares. Los polinucleótidos también tienen contraiones asociados, tales como H<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, trietilamonio, Mg<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y similares. Un polinucleótido puede estar compuesto completamente de desoxirribonucleótidos, completamente de ribonucleótidos, o mezclas químicas de los mismos. Los polinucleótidos pueden estar compuestos de nucleobase de nucleótido y análogos de azúcar.

**[0032]** En algunas realizaciones, el término "oligonucleótido" se usa en el presente documento para denotar un polinucleótido que comprende entre aproximadamente 5 y aproximadamente 150 nucleótidos, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 75 nucleótidos, o entre aproximadamente 15 y unos 50 nucleótidos. A lo largo de la especificación, cada vez que un oligonucleótido está representado por una secuencia de letras (elegidas, por ejemplo, de las cuatro letras básicas: A, C, G y T, que denotan adenosina, citidina, guanosa y timidina, respectivamente), los nucleótidos se presentan en el orden 5' a 3' de la izquierda a la derecha. Una "secuencia de polinucleótidos" se refiere a la secuencia de monómeros de nucleótidos a lo largo del polímero. A menos que se indique lo contrario, siempre que se represente una secuencia de polinucleótidos, se entenderá que los nucleótidos están en orientación 5' a 3' de izquierda a derecha.

**[0033]** Los ácidos nucleicos, polinucleótidos y oligonucleótidos pueden estar compuestos por bases de nucleótidos estándar o sustituirse por análogos de isoformas de nucleótidos, que incluyen, entre otros, bases iso-C e iso-G, que pueden hibridar más o menos permisiblemente que las bases estándar, y que se hibridarán preferentemente con bases análogas de isoformas complementarias. Muchas de estas bases de isoformas se describen, por ejemplo, por Benner et al., (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 53-63. Los análogos de los monómeros de nucleótidos naturales incluyen, por ejemplo, 7-deazaadenina, 7-deaza-guanina, 7-deaza-8-azaguanina, 7-deaza-8-azaadenina, 7-metilguanina, inosina, nebularina, nitropirrol (Bergstrom, *J Amer Chem. Soc.*, 117: 1201-1209 [1995]), nitroindol, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina, pseudouridina, pseudocitosina, pseudoisocitosina, 5-propinilo-citosina, isocitosina, isoguanina (Seela, patente de EE.UU. N° 6.147.199), 7-deazaguanina (patente Seela, patente de EE.UU. n.º 5.990.303), 2-azapurina (Seela, WO 01/16149), 2-tiopirimidina, 6-tioguanina, 4-tiogimina 4-tiouracilo, 0-6-metilguanina, N-6-metiladenina, O-4-metilimidina, 5,6-dihidrotimina, 5,6-dihidrouracilo, 4-metilindol, pirazolo [3,4-D]pirimidinas, "PPG" (Meyer, Patentes de EE.UU. N°s 6.143.877 y 6.127.121; Gall, WO 01/38584), y etenoadenina (Fasman (1989) en *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla.).

**[0034]** El término "3'" se refiere a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 3' (es decir, aguas abajo) desde otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido. El término "5'" se refiere a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 5' (es decir, aguas arriba) de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido. Los términos "extremo 3'" y "extremo 3'", como se usan en el presente documento en referencia a una molécula de ácido nucleico, se refieren al extremo del ácido nucleico que contiene un grupo hidroxilo libre unido al carbono 3' del azúcar pentosa terminal. El término "extremo 5'" y "terminal 5'", como se usa en el presente documento con referencia a una molécula de ácido nucleico, se refiere al extremo de la molécula de ácido nucleico que contiene un grupo hidroxilo o fosfato libre unido al carbono 5' del terminal de azúcar pentosa. En algunas realizaciones, los cebadores oligonucleotídicos comprenden tramos de poli-adenosina en sus extremos 5'.

**[0035]** *Anticuerpo primario y secundario*: como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo primario" generalmente se refiere a un anticuerpo que se une directamente a un objetivo de interés. El término "anticuerpo secundario", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a otro anticuerpo (primario) que, a su vez, está unido a un objetivo de interés.

**[0036]** *Diana*: como se usa en el presente documento, el término "diana" se refiere a una molécula de interés.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0037]** La presente invención proporciona un método para cuantificar la eficacia de la limitación del ARNm basándose en la formación y la determinación cuantitativa de un complejo entre un anticuerpo específico de la tapa y el ARNm cubierto como se describe en las reivindicaciones.

**[0038]** La presente invención es útil para cuantificar la eficacia de la limitación de la síntesis de ARNm *in vitro*. Por lo tanto, la presente invención proporciona un importante enfoque de control de calidad para la fabricación de ARNm y, en particular, para evaluar la seguridad, eficacia y viabilidad comercial de los ARNm con aplicaciones terapéuticas.

**[0039]** Varios aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta aplicación, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

### **Tapado de ARNm y/o metilación**

**[0040]** Típicamente, los ARNm eucariotas tienen una estructura de "tapa" en sus extremos 5', que desempeña un papel importante en la traducción. Por ejemplo, la tapa desempeña un papel fundamental en el metabolismo del ARNm y se requiere en diversos grados para el procesamiento y la maduración de un transcrito de ARN en el núcleo, el transporte del ARNm desde el núcleo al citoplasma, la estabilidad del ARNm y la traducción eficiente del ARNm a la proteína. La estructura de la tapa 5' está involucrada en el inicio de la síntesis de proteínas de ARNm eucariotas celulares y eucariotas y en el procesamiento y la estabilidad de ARNm *in vivo* (ver, por ejemplo, Shatkin, AJ, CELL, 9: 645-653 (1976); Furuichi, et al., NATURE, 266: 235 (1977); FEDERATION OF EXPERIMENTAL BIOLOGISTS SOCIETY LETTER 96: 1-11 (1978); Sonenberg, N., PROG. Nuc. ACID RES MOL BIOL, 35: 173-207 (1988)). Existen proteínas de unión a tapa específicas que son componentes de la maquinaria requerida para el inicio de la traducción de un ARNm (ver, por ejemplo, Shatkin, CELL, 40: 223-24 (1985); Sonenberg, N., PROG. Nuc. ACID RES MOL BIOL, 35: 173-207 (1988)). El límite del ARNm se reconoce por el factor de iniciación de la traducción eIF4E (Gingras, et al., ANN. REV. BIOCHEM. 68:913-963 (1999); Rhoads, RE, J. BIOL. CHEM. 274: 30337-3040, (1999)). La estructura de la tapa 5' también proporciona resistencia a la actividad de la exonucleasa 5' y su ausencia da como resultado una rápida degradación del ARNm (véase, por ejemplo, Ross, J., MOL. BIOL. MED. 5: 1-14 (1988); Green, MR et al., CELL, 32: 681-694 (1983)). Dado que las transcripciones primarias de muchos genes celulares eucariotas y genes virales eucariotas requieren un procesamiento para eliminar las secuencias intermedias (intrones) dentro de las regiones codificantes de estas transcripciones, el beneficio de la tapa también se extiende a la estabilización de dicho pre-ARNm.

**[0041]** Se ha informado que los ARN tapados *in vitro* se traducen de manera más eficiente que los transcritos no encapsulados en una variedad de sistemas de traducción *in vitro*, como el lisado de eritrocitos de conejo o los sistemas de traducción de germen de trigo (véase, por ejemplo, Shimotohno, K., et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. EE.UU., 74: 2734-2738 (1977); Paterson y Rosenberg, NATURE, 279: 692 (1979)). También se cree que este efecto se debe en parte a la protección del ARN de las exoribonucleasas presentes en el sistema de traducción *in vitro*, así como a otros factores.

**[0042]** Las estructuras de la cápsula que se producen naturalmente comprenden una 7-metilguanosina que está unida a través de un puente trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, lo que resulta en una cápsula de dinucleótido de m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')N, donde N es cualquier nucleósido *in vivo*, la tapa se añade enzimáticamente. La tapa se agrega en el núcleo y es catalizada por la enzima transferasa de guanililo. La adición de la tapa al extremo 5' terminal del ARN se produce inmediatamente después del inicio de la transcripción. El nucleósido terminal es típicamente una guanosina, y está en la orientación inversa a todos los otros nucleótidos, es decir, G(5')ppp(5')GpNpNp.

**[0043]** Una tapa común para el ARNm producido por transcripción *in vitro* es m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G, que se ha usado como la tapa dinucleótido en la transcripción con polimerasa de ARN T7 o SP6 *in vitro* para obtener ARN que tienen una estructura de tapa en sus 5'-terminales. El método predominante para la síntesis *in vitro* de ARNm bloqueado emplea un dinucleótido preformado de la forma m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G ("m<sup>7</sup>GpppG") como iniciador de la transcripción. Una desventaja de usar m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G, un dinucleótido pseudimétrico, es la propensión del 3'-OH del resto G o m<sup>7</sup>G para servir como el nucleófilo iniciador para el alargamiento transcripcional. En otras palabras, la presencia de un 3'-OH en los restos m<sup>7</sup>G y G conduce a que hasta la mitad de los ARNm incorporen un límite en una orientación incorrecta. Esto conduce a la síntesis de dos ARN isoméricos de la forma m<sup>7</sup>G(5')pppG(pN)*n* y G(5')pppm<sup>7</sup>G(pN)*n*, en proporciones aproximadamente iguales, dependiendo de las condiciones iónicas de la reacción de transcripción. Las variaciones en las formas isoméricas pueden tener un efecto adverso en la traducción *in vitro* y son indeseables para un producto terapéutico homogéneo.

**[0044]** Hasta la fecha, la forma habitual de una tapa de dinucleótido sintético usado en experimentos de traducción *in vitro* es el análogo de tapa anti-inverso ("ARCA"), que generalmente es un análogo de tapa modificado en el que el grupo 2' o 3' OH se sustituye por -OCH<sub>3</sub>. ARCA y los análogos de la tapa triple metilada se incorporan en la orientación hacia adelante. La modificación química de m<sup>7</sup>G en el grupo 2' o 3' OH del anillo de ribosa hace que la tapa se incorpore únicamente en la orientación hacia adelante, aunque el grupo 2' OH no participa en el enlace fosfodiéster. (Jemielity, J. et al., "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003)). Se ha establecido el procedimiento selectivo para la metilación de guanosina en N7 y O-metilación 3' y síntesis de difosfato 5' (Kore, A. y Parmar, G. NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES, AND NUCLEIC ACIDS, 25:337-340, (2006) y Kore, A. R., et al. NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES, AND NUCLEIC ACIDS 25 (3):

307-14, (2006).

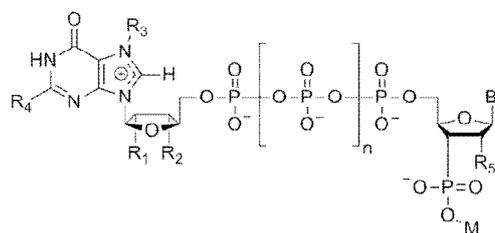
**[0045]** La transcripción de ARN usualmente comienza con un trifosfato de nucleósido (usualmente una purina, A o G). La transcripción *in vitro* típicamente comprende una polimerasa de ARN de fago tal como T7, T3 o SP6, una plantilla de ADN que contiene un promotor de polimerasa de fago, nucleótidos (ATP, GTP, CTP y UTP) y un tampón que contiene sal de magnesio. La síntesis de ARN con tapa incluye la incorporación de un análogo de tapa (por ejemplo, m<sup>7</sup>GpppG) en la reacción de transcripción, que en algunas realizaciones se incorpora mediante la adición de transferasa de guanililo recombinante. El exceso de m<sup>7</sup>GpppG a GTP (4:1) aumenta la oportunidad de que cada transcripción tenga un límite de 5'. Los kits para el límite de los ARNm transcritos *in vitro* están disponibles comercialmente, incluido el kit mMMESSAGE mMACHINE® (Ambion, Inc., Austin, T́exas). Normalmente, estos kits producirán un 80% de ARN limitado a un 20% de ARN sin tapar, aunque los rendimientos totales de ARN son menores a medida que la concentración de GTP se convierte en una limitación de la velocidad a medida que se necesita GTP para el alargamiento de la transcripción. Sin embargo, actualmente no hay tecnología/método disponible que permita la cuantificación de la eficiencia de la limitación sin alteraciones permanentes de los ARNm en una muestra.

**[0046]** Los métodos para estimar la eficiencia de la limitación son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la polimerasa de ARN de T7 se puede incubar con un dinucleótido de tapa, los cuatro trifosfatos de ribonucleótido, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP, y una plantilla corta de ADN en la que G es el primer ribonucleótido especificado después del promotor (ver Grudzien, et al. al. "Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNA with high translation efficiency", RNA, 10: 1479-1487 (2004)). Cualquier nucleótido en el lado 5' de un residuo G adquiere un grupo 3'-fosfato marcado con <sup>32</sup>P después de la digestión con ARNasa T2 mediante la transferencia del vecino más cercano. La cromatografía de intercambio aniónico se usa luego para resolver los nucleósidos marcados 3'-monofosfatos, resultantes de las posiciones internas en el ARN, de los productos 5'-terminales. Los productos 5'-terminales son de dos tipos. Los ARN no tapados producen guanosina 5'-trifosfato 3'-monofosfato (p3Gp\*; en donde \* indica el grupo fosfato marcado). Los ARN tapados producen varias estructuras 5'-terminales, dependiendo de la naturaleza del análogo de tapa utilizado (m<sup>7</sup>Gp3Gp\* y Gp3m<sup>7</sup>Gp\* cuando el análogo de tapa es m<sup>7</sup>Gp3G).

**[0047]** Sin embargo, un inconveniente importante de estos métodos es que toda la muestra se vuelve radioactiva o se destruye de otra manera, y por lo tanto no se puede usar en aplicaciones terapéuticas posteriores. Aunque en teoría se podría realizar una reacción de cuantificación separada junto con una reacción de síntesis terapéutica, tales arreglos son inadecuados. Las muestras simultáneas pero separadas son intrínsecamente variables debido a un error entre operadores y variaciones mínimas en las condiciones de reacción. Esto es particularmente cierto para las cuantificaciones que usan una curva estándar, en la cual un valor para un punto en la curva estándar en un día dado puede no ser el mismo al día siguiente. Para obtener resultados precisos en el cálculo de la eficiencia de limitación, es deseable utilizar una muestra representativa tomada de la reacción de síntesis terapéutica, una muestra para la cual la eficiencia de limitación puede evaluarse en relación con los controles y que es representativo de la eficacia de la limitación en la reacción de síntesis terapéutica.

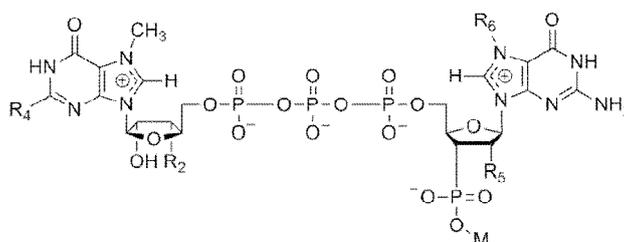
**[0048]** Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos mejorados para cuantificar directamente la eficacia de la capacidad de cobertura del ARNm en una muestra representativa de alícuotas a partir de una reacción de síntesis *in vitro*. La invención comprende el uso de un anticuerpo de unión específica a la tapa en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo de unión específica de la tapa y el ARNm cubierto. La formación de un complejo entre el anticuerpo de unión específica a la tapa y el ARNm cubierto permite la determinación cuantitativa de la cantidad del complejo (es decir, los ARNm protegidos) en relación con un control positivo de productos con límite o control negativo de productos sin tapar. En otras palabras, la unión indica la cantidad de dianas de ARNm limitadas en la muestra y la eficiencia de limitación en una reacción de la cual se deriva la muestra. Por lo tanto, la etapa de determinar cuantitativamente la cantidad del complejo comprende realizar un ensayo de tipo ELISA en el que el anticuerpo de unión específica a la tapa se une específicamente a una cubierta de ARNm. (Consulte la Figura 1) La formación del complejo se puede cuantificar mediante la adición de un agente de detección específico para el anticuerpo de enlace específico de la tapa (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón de cabra que se une a un anticuerpo anti-m<sup>7</sup>G de ratón) y que produce una señal directamente proporcional a la cantidad de ARNm capsulado. El método descrito se puede usar para cuantificar la eficacia de la limitación de una amplia variedad de especies de ARN, incluido el ARNm transcrito *in vitro*, el ARNm eucariótico aislado y el ARN viral. Las realizaciones de la invención se pueden usar para cuantificar cualquiera de la estructura de la tapa y los análogos de la tapa descritos en el presente documento.

**[0049]** Los métodos descritos en el presente documento son generalmente susceptibles de cuantificación de cualquier tipo de límite de ARNm. En algunas realizaciones, la tapa tiene una estructura de fórmula I:



en donde B es una nucleobase, R<sup>1</sup> se selecciona de un halógeno, OH y OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> se selecciona de H, OH, y OCH<sub>3</sub>, R<sup>3</sup> es CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o vacío, R<sub>4</sub> es NH<sub>2</sub>, R<sub>5</sub> se selecciona de OH, OCH<sub>3</sub> y un halógeno, n es 1, 2 o 3, y M es un nucleótido, es decir, la tercera base del ARNm. En realizaciones particulares, B es guanina, pero puede ser cualquier nucleobase. En algunas realizaciones, la tapa es m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G en la que está presente un residuo 2'-O-metilo en el grupo 2' OH del anillo de ribosa de la base 1 (es decir, en la posición R<sub>5</sub> de Fórmula I).

**[0050]** En algunas realizaciones, la tapa tiene una estructura de fórmula II:



en donde R<sub>2</sub> es H o CH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> es NH<sub>2</sub>, R<sub>5</sub> es OH u OCH<sub>3</sub>, R<sub>6</sub> es H o CH<sub>3</sub>, y M es un nucleótido del ARNm.

**[0051]** Los análogos de tapa incluyen, pero no se limitan a, estructuras químicas seleccionadas del grupo que consiste en m<sup>7</sup>GpppG, m<sup>7</sup>GpppA, m<sup>7</sup>GpppC; análogos de tapa no metilados (por ejemplo, GpppG); análogo de tapa dimetilado (por ejemplo, m<sup>2,7</sup>GpppG), análogo de tapa trimetilado (por ejemplo, m<sup>2,2,7</sup>GpppG), análogos de tapa simétricos dimetilados (por ejemplo, m<sup>7</sup>Gpppm<sup>7</sup>G), o análogos de tapa inverso (por ejemplo, ARCA; m<sup>7,2'</sup>OmeGpppG, m<sup>7,2'd</sup>GpppG, m<sup>7,3'</sup>OmeGpppG, m<sup>7,3'd</sup>GpppG y sus derivados de tetrafosfato (ver, por ejemplo, Jemielity, J. et al., "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003)).

**[0052]** En una realización preferida, la tapa es un 7-metilo guanilato ("m<sup>7</sup>G") unido a través de un puente trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, dando como resultado m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')N, donde N es cualquier nucleósido. Una realización preferida de una tapa m<sup>7</sup>G utilizada en realizaciones de la invención es m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G.

**[0053]** En algunas realizaciones, el ARNm está destapado. (Figura 2A) El ARNm sin tapar puede estar presente en una muestra (es decir, como resultado de un taponamiento incompleto en una reacción de transcripción *in vitro*) y/o puede usarse como control para cuantificar el nivel de especies sin tapar en una muestra. En algunas realizaciones, la tapa es una estructura Tapa0. (Figura 2B). Las estructuras de Tapa0 carecen de un residuo 2'-O-metilo de la ribosa unida a las bases 1 y 2. En algunas realizaciones, la tapa es una estructura de Tapa1. (Figura 2C) Las estructuras Tapa1 tienen un residuo 2'-O-metilo en la base 1. En algunas realizaciones, la tapa es una estructura de Tapa2. Las estructuras de Tapa2 tienen un residuo 2'-O-metilo unido a ambas bases 1 y 2.

**[0054]** Se conocen en la técnica una variedad de análogos de tapa m<sup>7</sup>G, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Estos incluyen los m<sup>7</sup>GpppG descritos anteriormente, así como los análogos de tapa ARCA 3'-OCH<sub>3</sub> y 2'-OCH<sub>3</sub> (Jemielity, J. et al., RNA, 9: 1108-1122 (2003)). Los análogos de tapa adicionales para uso en realizaciones de la invención incluyen análogos de tetrafosfato de dinucleósido bencilado en N7 (descritos en Grudzien, E. et al., RNA, 10: 1479-1487 (2004)), análogos de tapa de fosforotioato (descritos en Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13: 1745-1755 (2007)), y análogos de tapa (incluidos análogos de tapa biotilados) descritos en las patentes de EE.UU. N<sup>os</sup> 8.093.367 y 8.304.529.

**Producción de ARNm tapados**

**[0055]** Los ARNm tapados adecuados para los métodos cuantitativos descritos en el presente documento pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica.

**[0056]** En algunas realizaciones, el ARNm tapado se produce por transcripción *in vitro*, originalmente desarrollado por Krieg y Melton (METHODS ENZYMOL., 1987. 155:397-415) para la síntesis de ARN utilizando una polimerasa de fago de ARN. Típicamente, estas reacciones incluyen al menos una polimerasa de ARN de fago (T7, T3 o SP6), una plantilla de ADN que contiene un promotor de la polimerasa de fago, nucleótidos (ATP, CTP, GTP y UTP), y un tampón que contiene una sal de magnesio. Los rendimientos de la síntesis de ARN pueden optimizarse aumentando las concentraciones de nucleótidos, ajustando las concentraciones de magnesio e incluyendo pirofosfatasa inorgánica (Patente de EE.UU. N° 5.256.555; Gurevich, et al., ANAL. BIOCHEM. 195: 207-213 (1991); Sampson, JR y Uhlenbeck, OC, PROC. NATL. ACAD. SCI. EE.UU. 85, 1033-1037 (1988); Wyatt, JR, et al., BIOTECHNIQUES, 11: 764-769 (1991)). Algunas realizaciones utilizan kits comerciales para la síntesis a gran escala de transcritos *in vitro* (por ejemplo, MEGAscript®, Ambion). El ARN sintetizado en estas reacciones generalmente se caracteriza por un nucleótido terminal 5' que tiene un trifosfato en la posición 5' de la ribosa. Típicamente, dependiendo de la combinación de polimerasa de ARN y promotor utilizada, este nucleótido es una guanósina, aunque puede ser una adenosina (ver por ejemplo, Coleman, TM, et al., NUCLEIC ACIDS RES., 32: e14 (2004)). En estas reacciones, los cuatro nucleótidos se incluyen típicamente en concentraciones equimolares y ninguno de ellos es limitante.

**[0057]** Algunas realizaciones de la invención son reacciones discontinuas, es decir, todos los componentes se combinan y luego se incuban a aproximadamente 37°C para promover la polimerización del ARN hasta que finaliza la reacción. Típicamente, una reacción discontinua se usa por conveniencia y para obtener tanto ARN como sea necesario de tales reacciones para sus experimentos. En algunas formas de realización, se utiliza un sistema "alimentado por lotes" (ver, por ejemplo, JEFFREY A. KERN, BATCH AND FED-BATCH STRATEGIES FOR LARGE-SCALE PRODUCTION OF RNA BY IN VITRO TRANSACTION (Universidad de Colorado) (1997)) para aumentar la eficiencia de la reacción de transcripción *in vitro*. Todos los componentes se combinan, pero luego se agregan cantidades adicionales de algunos de los reactivos a lo largo del tiempo, como los nucleótidos y el magnesio, para tratar de mantener condiciones de reacción constantes. Además, en algunas realizaciones, el pH de la reacción se puede mantener en 7,4 al monitorearlo con el tiempo y agregar KOH según sea necesario.

**[0058]** Para sintetizar un ARN tapado por transcripción *in vitro*, se incluye un análogo de tapa (por ejemplo, *n*-7 metilo GpppG; es decir, m<sup>7</sup>GpppG) en la reacción de transcripción. En algunas realizaciones, la polimerasa de ARN incorporará el análogo de la tapa tan fácilmente como cualquiera de los otros nucleótidos; es decir, no hay sesgo para el análogo de tapa. En algunas realizaciones, el análogo de tapa se incorporará en el extremo 5' por la enzima transferasa de guanililo. En algunas realizaciones, el análogo de la tapa se incorporará solo en el extremo 5' porque no tiene un trifosfato 5'. En algunas realizaciones que utilizan una polimerasa de ARN T7, T3 y SP6, el nucleótido +1 de sus promotores respectivos suele ser un residuo G y si tanto GTP como m<sup>7</sup>GpppG están presentes en concentraciones iguales en la reacción de transcripción, entonces cada uno tiene la misma posibilidad de incorporarse en la posición +1. En algunas realizaciones, m<sup>7</sup>GpppG está presente en estas reacciones en concentraciones varias veces más altas que el GTP para aumentar las posibilidades de que una transcripción tenga un límite de 5'. En algunas realizaciones, se usa un kit mMMESSAGE mMACHINE® (Cat. N° 1344, Ambion, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, donde se recomienda que la relación de tapa a GTP sea 4:1 (6 mM: 1,5 mM). En algunas realizaciones, a medida que aumenta la relación del análogo de tapa a GTP en la reacción, la proporción de capturado a ARN sin límite aumenta proporcionalmente. Las consideraciones sobre la eficiencia de la limitación deben equilibrarse con las consideraciones de rendimiento. El aumento de la proporción de análogo de tapa a GTP en la reacción de transcripción produce rendimientos más bajos de ARN total porque la concentración de GTP se vuelve limitante cuando se mantiene constante la concentración de tapa y GTP. Por lo tanto, el rendimiento final de ARN depende de la concentración de GTP, que es necesaria para el alargamiento de la transcripción. Los otros nucleótidos (ATP, CTP, UTP) están presentes en exceso.

**[0059]** En realizaciones particulares, el ARNm se sintetiza por transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN plasmídico que codifica un gen de elección. En algunas realizaciones, la transcripción *in vitro* incluye la adición de una estructura de tapa 5', Tapa1 (Figura 2C), que tiene un residuo 2'-O-metilo en el grupo 2' OH del anillo de ribosa de la base 1, por conjugación enzimática de GTP a través de transferasa de guanililo. En algunas realizaciones, la transcripción *in vitro* incluye la adición de una estructura de tapa 5', Tapa0 (FIG. 2B), que carece del residuo 2'-O-metilo, por conjugación enzimática de GTP a través de transferasa de guanililo. En algunas realizaciones, la transcripción *in vitro* incluye la adición de una tapa 5' de cualquiera de las estructuras de tapa descritas en este documento mediante conjugación enzimática de GTP a través de transferasa de guanililo. En algunas realizaciones, se incorporó una cola poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud (determinada por electroforesis en gel) a través de la adición de ATP junto con la polimerasa PoliA. En algunas realizaciones, la cola de poli(A) tiene una longitud de aproximadamente 100-250 nucleótidos. En algunas realizaciones, la cola de poli(A) tiene una longitud de aproximadamente 50-300 nucleótidos. En algunas realizaciones, los productos de transcripción *in vitro* incluyen regiones no traducidas 5' y 3'.

#### **Sustratos sólidos para la captura de ARNm**

**[0060]** En algunas realizaciones, el ARNm cubierto se captura en un sustrato sólido antes de ponerse en contacto con una sustancia de unión específica de la cubierta. Estas realizaciones no están limitadas por el tipo de sustrato sólido. El único requisito de tales realizaciones es que el sustrato sólido debe poder unirse directa o indirectamente a los ARNm con tapa, y en algunas realizaciones también a los ARNm no tapados. El sustrato puede ser una microplaca, perla magnética, partícula, perla polimérica, resina cromatográfica, papel de filtro, nitrocelulosa, diazocelulosa, vidrio, látex, poliestireno, cloruro de polivinilo, propileno, polietileno, dextrano, sefarosa, agar, almidón, nylon, gel de sílice, o hidrogel.

**[0061]** En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende un primer agente de captura que se une al ARNm que está cubierto o no. En algunas realizaciones, el primer agente de captura es una secuencia polinucleotídica monocatenaria que corresponde (es decir, es complementaria con) una secuencia en el ARNm monocatenario. Por lo tanto, cuando se une a un soporte sólido, el agente de captura del primer polinucleótido puede hibridar con el ARNm. En un ejemplo particular, el primer agente de captura es un tracto de politimidina (por ejemplo, oligo-dT) que es capaz de hibridar con la cola poliA del ARNm. En algunas realizaciones, una región del 3' no traducida puede ser dirigida por un primer agente de captura (por ejemplo, un oligonucleótido de secuencia complementaria). En algunas realizaciones, las regiones codificantes específicas del gen del ARNm pueden ser dirigidas. El oligonucleótido de captura puede tener una longitud de aproximadamente 10-50 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 15, nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos o más.

**[0062]** Una amplia variedad de secuencias de ácido nucleico se pueden unir a un soporte sólido para facilitar la captura. Del mismo modo, la manera en que los agentes de captura de polinucleótidos se unen directa o indirectamente al soporte sólido no debe ser limitante de ninguna manera. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente de captura de polinucleótidos se puede sintetizar en la superficie de una manera adecuada para la desprotección pero no la escisión del soporte de síntesis (ver, por ejemplo, Weiler et al., NUCL. ACIDS RES., 25 (14): 2792-2799 (1997)). En algunas realizaciones, el agente de captura polinucleotídico puede estar unido covalentemente a una superficie mediante la reacción de un grupo funcional adecuado en las características de aislamiento con un grupo funcional de la superficie (ver, por ejemplo, Geiger et al., NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES 17 (9-11): 1717-1724 (1998)).

**[0063]** En una realización particular, el oligonucleótido del tracto de politimidina está biotinilado y, por lo tanto, es capaz de unirse a un soporte sólido recubierto de avidina o estreptavidina. Los oligonucleótidos del tracto de politimidina biotinilados están disponibles comercialmente (por ejemplo, Promega, Invitrogen). Alternativamente, los oligonucleótidos del tracto de politimidina o cualquier otro agente de captura de polinucleótidos se pueden sintetizar y biotinilar a la medida de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los residuos de biotina-11-dUTP se pueden agregar enzimáticamente, usando la desoxinucleotidil transferasa terminal, al extremo 3' de un oligonucleótido sintético (ver, por ejemplo, Riley, LK et al., DNA, 5: 333-337 (1986)). Una amplia variedad de soportes sólidos recubiertos con avidina y estreptavidina también están disponibles comercialmente (por ejemplo, microplacas recubiertas con estreptavidina de 96 pocillos Pierce; Thermo Scientific).

**[0064]** Los oligonucleótidos pueden sintetizarse por medios convencionales, por ejemplo, a través de la química de la fosforamidita en un sintetizador comercial de ADN. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos se sintetizan en un soporte en fase sólida como lo describen Gryaznov y Letsinger, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 20: 3403-3409 (1992). Brevemente, después de la desprotección, el hidroxilo 5' de una desoxitimidina unido a un soporte a través de un enlace succinilo estándar se fosforila por reacción con cloro-(diisopropiletilamino)-metoxifosfina en un disolvente apropiado, como diclorometano/diisopropiletil-amina. Después de la activación con tetrazol, la timidina 5'-fosforilada se hace reaccionar con un 5'-trilit-O-3'-amino-3'-desoxinucleósido para formar un dímero nucleósido-timidina en el que las fracciones de nucleósido están unidas covalentemente por un enlace de fosforamidato. El resto del oligonucleótido se sintetiza mediante la química estándar de la fosforamidita. Después de romper el enlace succinilo, el oligonucleótido con un grupo amino terminal 3' se genera al dividir el enlace fosforamidato mediante tratamiento ácido, por ejemplo, ácido acético acuoso al 80% durante 18-20 horas a temperatura ambiente.

**[0065]** En algunas realizaciones, el primer agente de captura es una proteína. Se puede usar cualquier proteína que se enlace selectivamente al ARNm. En algunas realizaciones, una primera proteína de agente de captura se une al extremo 3' del ARNm (por ejemplo, proteínas de unión a poli(A)). En otras realizaciones, las proteínas del primer agente de captura se unen al extremo 5' del ARNm (por ejemplo, anticuerpos anti-m<sup>7</sup>G). Las proteínas ejemplares que pueden funcionar como primeros agentes de captura incluyen proteínas de unión a poli(A) ("PABP"), anticuerpos anti-m<sup>7</sup>G y sus fragmentos de unión a antígeno, y factor de iniciación eucariótico 4E (eIF-4E). Los métodos de captura dependiente de tapa de ARNm dependiente de tapa se han descrito anteriormente (Edery, I. et al., MOL CELL BIOL, 15: 3363-3371 (1995)); la publicación preconcedida de EE.UU. 2007/0281336) y puede adaptarse a las realizaciones de la invención.

**[0066]** Métodos para la unión química de los primeros agentes de captura (ya sean proteínas o ácidos nucleicos) a superficies de soporte sólido pueden implicar la reacción de un grupo nucleófilo (por ejemplo, una amina o tiol) del agente de captura a inmovilizar, con un grupo electrófilo en la superficie de soporte sólido. Alternativamente, el nucleófilo puede estar presente en el soporte y el electrófilo (por ejemplo, ácido carboxílico activado) puede estar

presente en las características de anti-aislamiento. En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura se pueden unir a un soporte sólido mediante química clic. En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura se unen a través de una 1,3-cicloaddición de una azida con un alquino, opcionalmente en presencia de un catalizador de cobre. Los métodos para utilizar la química de clics son conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Rostovtsev et al., *Angew. CHEM. INT. Ed.* 41: 2596-99 (2002) y Sun et al., *BIOCONJUGATE CHEM.*, 17: 52-57 (2006).

[0067] En algunas realizaciones de la invención, los primeros agentes de captura se unen directamente a sustratos sólidos mediante procedimientos de acoplamiento de amina N-etilo-N'-(dimetilaminopropilo)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC /NHS) estándar. El acoplamiento de aminas introduce ésteres de N-hidroxisuccinimida en la matriz superficial mediante la modificación de los grupos carboximetil con una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS) y N-etilo-N'-(dimetilaminopropilo)-carbodiimida (EDC). Estos ésteres reaccionan espontáneamente con las aminas y otros grupos nucleófilos en el resto de captura para formar enlaces covalentes. Esta es una técnica de funcionalización superficial altamente estable y común. En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura se unen directamente al sustrato sólido utilizando un tampón de recubrimiento de NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, pH 9,6.

[0068] Se dispone comercialmente de numerosos tipos de soportes sólidos derivados con grupos amino, grupos ácido carboxílico, isocianatos, isotianocianatos y grupos malimida, que pueden facilitar el acoplamiento del primer agente de captura al sustrato.

[0069] En algunas realizaciones en las que los primeros agentes de captura son proteínas, las proteínas pueden biotinilarse de acuerdo con métodos conocidos, y posteriormente unirse a sustratos sólidos recubiertos con avidina o estreptavidina. Los reactivos y kits de marcado están disponibles comercialmente para anticuerpos biotinilados específicamente y otras proteínas o péptidos con marcadores de biotina en aminas primarias (lisina y extremo N), el grupo reactivo más abundante en la superficie de las proteínas, para la detección de estreptavidina. Por ejemplo, las microplacas ELISA recubiertas con estreptavidina pueden recubrirse con una proteína biotinilada que se une a la proteína de unión a poliA (PAIP2). En algunas realizaciones, el PAIP2 humano recombinante disponible en el mercado se biotinila mediante marcadores de biotina modificada con amina para biotinar específicamente el extremo C utilizando el EDC (reticulante de carbodiimida).

[0070] En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura se etiquetan o modifican de otro modo para facilitar la unión al sustrato. Por ejemplo, en realizaciones en las que el primer agente de captura es una proteína (por ejemplo, PABP), la proteína puede producirse de forma recombinante y etiquetarse. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las proteínas del primer agente de captura se etiquetan con glutatión S-transferasa (GST). En algunas realizaciones, los primeros agentes de captura están etiquetados con FLAG, etiquetados con HA, etiquetados con His o etiquetados con myctag.

[0071] En ciertas realizaciones, no es necesario usar un primer agente de captura. Como se mencionó anteriormente, las realizaciones de la invención incluyen la incorporación de análogos de tapa biotinilados en muestras de ARNm sintetizados *in vitro* para cuantificar. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 8.344.118, de Kore et al. Las muestras de ARNm bloqueadas biotiniladas pueden unirse directamente a sustratos sólidos recubiertos de avidina o estreptavidina.

[0072] En algunas realizaciones, un segundo agente de captura está unido directamente a un sustrato sólido, que a su vez se une al primer agente de captura. En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es estreptavidina o avidina, que puede unirse a un primer agente de captura biotinilado (por ejemplo, una proteína de unión a poli(A) biotinilada). En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es la proteína A o la proteína G. En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es el glutatión. En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es un sustrato recubierto de níquel, por ejemplo, Ni Sepharose, NTA-agarosa, His60 Ni, resina HisPur o resina TALON. En algunas realizaciones, el segundo agente de captura es un anticuerpo específico para el primer agente de captura; por ejemplo, un anticuerpo anti-HA o anti-myc.

[0073] Se apreciará que la elegancia de los métodos descritos en este documento radica, en parte, en su adaptabilidad. Todas las configuraciones de las disposiciones descritas anteriormente se contemplan en la presente descripción. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un ARNm es capturado por su extremo 3' (por ejemplo, por hibridación de oligo-dT inmovilizado o proteína de unión a poliA a la cola poliA), y la presencia de una tapa se cuantifica mediante la formación de un complejo entre una sustancia de unión de tapa específica y el ARNm cubierto. En otras realizaciones, sin embargo, es posible capturar ARNm tapado por su extremo 5'; por ejemplo, mediante la formación de un complejo entre el ARNm cubierto y una sustancia de unión específica de la cubierta inmovilizada sobre un soporte sólido, o si la cubierta está biotinilada por interacción con una placa recubierta con estreptavidina). La presencia de ARNm tapado se puede cuantificar luego mediante la adición del primer agente de detección que se une directamente a una cola poliA expuesta (es decir, una proteína de unión a poliA puede funcionar como un agente de detección en lugar de un agente de captura). La unión del primer agente de captura a la cola poliA puede visualizarse mediante la adición de un segundo agente de captura que genera una señal detectable (por ejemplo, un anticuerpo anti-PABP conjugado con HRP).

**Sustancia de unión de capa específica**

**[0074]** Una "sustancia de unión de tapa específica", como se usa en el presente documento, hace referencia a cualquier sustancia (proteína, molécula pequeña, etc.) que se une selectivamente a cápsulas de ARNm o análogos de cápsulas como se describió anteriormente. Es deseable que una sustancia de unión específica de tapa adecuada para la invención se una específicamente o selectivamente a una cápsula de ARNm o análogo de tapa (por ejemplo, las descritas en este documento), y que el evento de unión sea detectable.

**[0075]** En algunas realizaciones, una sustancia de unión de tapa específica es una proteína. En realizaciones particulares, la proteína es el factor de iniciación eucariótico 4E ("eIF-4E"). eIF-4E se ha utilizado en la purificación de ARNm basada en tapa (ver, por ejemplo, Edery, I. et al., "An efficient strategy to isolate full-length cDNAs based on an mRNA cap retention procedure (CAPture)", *MOL. CELL. BIOL.*, 15: 3363-3371 (1995)), y sus propiedades de unión específicas de tapa son adaptables para uso en la presente invención.

**[0076]** De acuerdo con la invención, una sustancia de unión de tapa específica es un anticuerpo específico de la tapa que incluye, pero no se limita a, anticuerpos que se unen específicamente a m<sup>7</sup>G, m<sup>7</sup>GpppG, m<sup>7</sup>GpppA, m<sup>7</sup>GpppC; análogos de tapa no metilados (por ejemplo, GpppG); análogo de tapa dimetilada (por ejemplo, m<sup>2,7</sup>GpppG), análogo de tapa trimetilada (por ejemplo, m<sup>2,2,7</sup>GpppG), análogos de tapa simétricos dimetilados (por ejemplo, m<sup>7</sup>Gpppm<sup>7</sup>G), o análogos de tapa inversa (por ejemplo, ARCA; OmeGpppG, m<sup>7,2'</sup>dGpppG, m<sup>7,3'Ome</sup>GpppG, m<sup>7,3'd</sup>GpppG y sus derivados tetrafosfato). Se pueden generar anticuerpos específicos de la tapa usando métodos estándar. Los ejemplos de anticuerpos anti-m<sup>7</sup>G se describen en detalle a continuación.

**[0077]** Otras proteínas de unión específicas de tapa que pueden utilizarse en los métodos descritos en este documento incluyen la subunidad de proteína de unión a tapa nuclear, la subunidad de proteína de unión a tapa nuclear, el complejo de unión de tapa nuclear, etc.

**[0078]** En algunas realizaciones, las proteínas de unión específicas de la tapa se modifican (por ejemplo, se biotinilan o se marcan) para facilitar la unión a un soporte sólido. Por ejemplo, los ensayos de unión de tapa basados en GST-eIF-4E son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, McCracken, S. et al., "'-capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II", *Genes & Dev.*, 11: 3306-3318 (1997)).

**[0079]** Como se mencionó anteriormente, la determinación cuantitativa de la cantidad del complejo entre la sustancia de unión de tapa específica y el ARNm cubierto comprende la medición de una señal detectable asociada con la formación del complejo. En algunas realizaciones, la señal detectable está directamente asociada con la sustancia de unión de tapa específica. En algunas realizaciones, en donde la señal detectable está asociada indirectamente con la sustancia de unión de tapa específica a través de un agente secundario que se une a la sustancia de unión de tapa específica (ver, por ejemplo, la discusión de ELISA a continuación, donde el agente secundario es un anticuerpo contra la sustancia de unión de tapa específica). Independientemente de si la señal detectable está directa o indirectamente asociada con la sustancia de unión de tapa específica, la señal detectable puede ser una señal fluorescente, una señal colorimétrica o una señal radiactiva. En general, la intensidad de la señal es directamente proporcional a la cantidad aproximada de objetivos de ARNm limitados en la muestra. Las señales también pueden seleccionarse del grupo que consiste en ficoeritrina, alexa 532, estreptavidina-ficoeritrina y estreptavidina-Alexa 532. En algunas realizaciones, la señal se detecta por actividad enzimática (es decir, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina), quimioluminiscencia, radioactividad, emisión de infrarrojos, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) o cualquier otro método conocido por un experto en la técnica.

**Anticuerpos de tapa anti-m<sup>7</sup>G**

**[0080]** En algunas realizaciones, una sustancia de unión de tapa específica es un anticuerpo anti-m<sup>7</sup>G. Los anticuerpos anti-m<sup>7</sup>G son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Los anticuerpos anti-m<sup>7</sup>G para uso en realizaciones de la invención incluyen los descritos en Meredith, RD y Erlanger, BF, "Isolation and characterization of rabbit anti-m<sup>7</sup>G-5'P antibodies of high apparent affinity", *NUCLEIC ACIDS RES.*, 6: 2179-2191 (1979). En realizaciones particulares, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-m<sup>7</sup>G-tapa (por ejemplo, disponible comercialmente de Synaptic Systems).

**[0081]** Los anticuerpos adicionales contra la tapa de m<sup>7</sup>G y los análogos de tapa están incluidos dentro del alcance de la presente invención y pueden generarse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Como se usa en este documento, los anticuerpos anti-m<sup>7</sup>G incluyen cualesquiera anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a cualquier epítopo de las capas m<sup>7</sup>G del ARNm. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" pretende incluir inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas que son específicamente reactivos a la proteína o péptido designado, o fragmentos de las mismas. Por ejemplo, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de dominio único de tiburón (por ejemplo, IgNAR o fragmentos de los mismos)), y fragmentos de anticuerpos siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Los anticuerpos adecuados también incluyen,

pero no se limitan a, anticuerpos de ratón, anticuerpos de cabra, anticuerpos de conejo, anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos conjugados (es decir, anticuerpos conjugados o fusionados con otras proteínas, radiomarcas, citotoxinas), y fragmentos de anticuerpos.

5  
 [0082] Como se usa en este documento, un "fragmento de anticuerpo" incluye una porción de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región variable o de unión a antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; triacuerpos; tetracuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena única. El término "fragmento de anticuerpo" también incluye cualquier proteína sintética o genéticamente modificada que actúa como un anticuerpo al unirse a un antígeno específico para formar un complejo. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados, fragmentos "Fv", que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas recombinantes de cadena simple en las que las regiones variables de la cadena ligera y pesada están conectadas por un conector peptídico ("proteínas ScFv"), y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable.

10  
 [0083] Los anticuerpos anti-m<sup>7</sup>G pueden generarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los protocolos para la producción de anticuerpos están descritos por Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988). Típicamente, los anticuerpos se pueden generar en ratones, ratas, cobayas, hámsters, camellos, llamas, tiburones u otros huéspedes apropiados. Alternativamente, los anticuerpos pueden producirse en pollos, produciendo moléculas de IgY (Schade et al., *ALTEX* 13 (5): 80-85 (1996)). En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados para la presente invención son anticuerpos de primate subhumano. Por ejemplo, las técnicas generales para producir anticuerpos terapéuticamente útiles en babuinos se pueden encontrar, por ejemplo, en Goldenberg et al., *Publicación de patente internacional* n° WO 91/11465 (1991), y en Losman et al., *INT. J. CANCER*, 46: 310 (1990). En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma (Milstein y Cuello, *NATURE*, 305: 537-40 (1983)). En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante métodos recombinantes (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.166.452).

20  
 [0084] Muchas de las dificultades asociadas con la generación de anticuerpos monoclonales por inmortalización de células B se pueden superar mediante ingeniería y expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*, utilizando la visualización de fagos. Para garantizar la recuperación de los anticuerpos monoclonales de alta afinidad, una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria debe contener un tamaño de repertorio grande. Una estrategia típica utiliza ARNm obtenido a partir de linfocitos o células de bazo de ratones inmunizados para sintetizar ADNc utilizando transcriptasa inversa. Los genes de las cadenas pesada y ligera se amplifican por separado mediante PCR y se ligan en vectores de clonación de fagos. Se producen dos bibliotecas diferentes, una que contiene los genes de la cadena pesada y otra que contiene los genes de la cadena ligera. El ADN del fago se aísla de cada biblioteca, y las secuencias de las cadenas pesada y ligera se ligan y se empaquetan para formar una biblioteca combinatoria. Cada fago contiene un par aleatorio de ADNc de cadenas pesadas y ligeras y, tras la infección de *E. coli*, dirige la expresión de las cadenas de anticuerpos en las células infectadas. Para identificar un anticuerpo que reconoce el antígeno de interés, la biblioteca de fagos se coloca en placas y las moléculas de anticuerpos presentes en las placas se transfieren a los filtros. Los filtros se incuban con un antígeno marcado radiactivamente y luego se lavan para eliminar el exceso de ligando no unido. Un punto radioactivo en el autorradiograma identifica una placa que contiene un anticuerpo que se une al antígeno. Los vectores de clonación y expresión que son útiles para producir una biblioteca de fagos de inmunoglobulina humana se pueden obtener, por ejemplo, de STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, CA).

25  
 [0085] Se puede emplear una estrategia similar para obtener scFv de alta afinidad. Ver, por ejemplo, Vaughn et al., *NATURE BIOTECH.*, 14: 309 314 (1996). Se puede construir una biblioteca scFv con un gran repertorio mediante el aislamiento de genes V de donantes humanos no inmunizados utilizando cebadores de PCR correspondientes a todas las familias de genes V<sub>H</sub>, V<sub>K</sub> y V<sub>L</sub> conocidas. Después de la amplificación, las agrupaciones V<sub>K</sub> y V<sub>L</sub> se combinan para formar una agrupación. Estos fragmentos se ligan en un vector fagémido. El enlazador scFv, (Gly<sub>4</sub>, Ser)<sub>3</sub>, luego se liga en el fagémido aguas arriba del fragmento V<sub>L</sub>. Los fragmentos V<sub>H</sub> y enlazador-V<sub>L</sub> se amplifican y ensamblan en la región JH. Los fragmentos V<sub>H</sub>-enlazadores-V<sub>L</sub> resultantes se ligan en un vector fagémido. La biblioteca de fagémidos se puede panoramizar utilizando filtros, como se describió anteriormente, o usando inmunotubos (Nunc; Maxisorp). Se pueden lograr resultados similares construyendo una biblioteca de inmunoglobulina combinatoria a partir de linfocitos o células de bazo de conejos inmunizados y expresando las construcciones de scFv en *P. pastoris*. Ver, por ejemplo, Ridder et al., *BIOTECHNOLOGY*, 13: 255 260 (1995). Además, tras el aislamiento de un scFv apropiado, se pueden obtener fragmentos de anticuerpos con mayores afinidades de unión y tasas de disociación más lentas mediante procesos de maduración de afinidad, como la mutagénesis CDR3 y la combinación de cadenas. Ver, por ejemplo, Jackson et al., *BR. J. CANCER*, 78: 181 188 (1998); Osbourn et al., *IMMUNOTECHNOLOGY*, 2: 181 196 (1996).

30  
 [0086] Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única CDR. Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") se pueden obtener construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para

5 sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos. Ver, por ejemplo, Larrick et al., METHODS: A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY 2: 106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), páginas 166 179 (Cambridge University Press 1995); y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al., (eds.), páginas 137 185 (Wiley-Liss, Inc. 1995).

10 **[0087]** En algunas realizaciones, los anticuerpos adecuados para la invención pueden incluir anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos son Igs quiméricas, cadenas o fragmentos de Ig (como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de Abs que se unen al antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de Ig no humana. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se realiza sustituyendo las regiones determinantes de la complementariedad de roedores (CDR) o las secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Riechmann et al., NATURE, 332: 323-7 (1988); Verhoeven et al., SCIENCE, 239: 1534-6, (1988)). Dichos anticuerpos "humanizados" son Abs quiméricos (Patente de EE.UU. N° 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en Abs de roedor. Los anticuerpos humanizados incluyen Igs humanas (anticuerpo receptor) en los cuales los residuos de una CDR del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, rata o conejo, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad. En algunos casos, los residuos no humanos correspondientes sustituyen a los residuos de la estructura Fv de la Ig humana. Los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la mayoría, si no todas, las regiones CDR corresponden a las de una Ig no humana y la mayor parte si no todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de Ig humana.

30 **[0088]** El uso de anticuerpos anti-m<sup>7</sup>G de alta afinidad es importante para la especificidad cuantitativa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-m<sup>7</sup>G o un fragmento del mismo adecuado para la presente invención tiene una afinidad de unión de o mayor que aproximadamente 500 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 500 pM, 10pM, 50pM, 10pM, 1pM, 500fM, 400fM, 300fM, 200fM, 100fM, 50fM, 10fM, 1fM. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-m<sup>7</sup>G o un fragmento del mismo adecuado para la presente invención tiene una afinidad de unión que varía entre aproximadamente 500 nM y 1 fM, entre 500 nM y 10 fM, entre 500 nM y 100 fM, entre 500 nM y 1pM, entre 10 nM y 1 fM, entre 10 nM y 100fM, entre 10nM y 1pM, entre 1nM y 1fM, entre 1nM y 100fM, entre 1nM y 500fM, entre 1nM y 1pM, entre 1nM y 10pM, entre 1nM y 50pM, entre 1nM y 100pM, entre 1nM y 100pM.

#### 40 **Cuantificación de ARNm basada en ELISA**

45 **[0089]** En algunas realizaciones, el método de la invención comprende un ensayo basado en ELISA que usa un primer agente de captura (por ejemplo, un oligo poli-dT marcado con biotina) unido a un sustrato sólido (por ejemplo, una placa de 96 pocillos recubierta con estreptavidina o bien 384 pocillos u otro). El primer agente de captura se utiliza para unir el ARNm sintetizado *in vitro*. Una vez unida, una sustancia de unión de tapa específica se dirige al resto de la tapa m<sup>7</sup>G como su antígeno. En algunas realizaciones basadas en ELISA, la sustancia de unión de tapa específica primaria es un anticuerpo anti-m<sup>7</sup>G (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-m<sup>7</sup>G). Se utiliza un anticuerpo marcado secundario para la visualización/cuantificación (véase la Figura 1). En algunas realizaciones, la sustancia de unión de tapa específica es otra proteína de tapa específica (por ejemplo, eIF-4E), y el anticuerpo secundario es específico de la proteína de tapa específica. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es o proporciona un agente de detección; por ejemplo, posee actividad enzimática para generar un sustrato detectable. Se puede sustituir y aplicar una variedad de agentes cromofóricos/fluorescentes. Se puede usar una cápsula biotinilada sintetizada personalizada (m<sup>7</sup>GpppG-Biotina) como control positivo. Esto representa un nuevo método para la cuantificación directa de la porción límite en un constructo de ARNm recién sintetizado que es crucial para la caracterización adecuada. Los protocolos para ensayos de ELISA y la optimización de las condiciones son conocidos en la técnica; vea, por ejemplo, Thermo Scientific, "Elisa technical guide and protocols", TECH TIP # 65 (2010) (disponible en [www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdf](http://www.piercenet.com/files/TR0065-ELISA-guide.pdf)).

60 **[0090]** El agente secundario es un anticuerpo específico para la sustancia de unión a tapa selectiva. En algunas realizaciones, el agente secundario está marcado radiactivamente o con fluorescencia. En realizaciones preferidas, el agente secundario comprende una enzima que convierte un sustrato en un producto detectable. En algunas realizaciones, la enzima es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. El producto puede ser cromogénico, quimi fluorescente o quimioluminiscente. En particular, las realizaciones, el sustrato se selecciona de los grupos que consisten en sal disódica de p-pitrofenilo fosfato (PNPP), 2,2'-Azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio (ABTS), o dihidrocloruro de fenilendiamina (OPD) o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). En realizaciones particulares, el producto es cromogénico y absorbe luz a 370-652 nanómetros. Como se describió anteriormente, la intensidad de la señal es proporcional a la cantidad aproximada de dianas de ARN limitadas capturadas en el

sustrato.

**[0091]** Los controles se utilizan para cuantificar la cantidad de ARNm tapado. En algunas realizaciones, el control comprende una muestra de ARNm con una cantidad predeterminada de ARNm con límite. En algunas realizaciones, el control comprende una cantidad predeterminada de tapa sintetizada. En algunas formas de realización, se utiliza una tapa biotinilada sintetizada personalizada (m<sup>7</sup>GpppG-Biotina) como control positivo.

**[0092]** En algunas realizaciones, los ensayos se hacen cuantitativos estableciendo una curva de calibración mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En otras palabras, el alcance de la reacción inmunológica se puede determinar cualitativamente o semicuantitativamente mediante la comparación visual de la densidad óptica de muestras desconocidas con estándares conocidos o cuantitativamente mediante comparación espectrofotométrica con curvas estándar preparadas utilizando varias muestras de concentración de tapa conocida. Por ejemplo, la cuantificación se puede realizar haciendo un conjunto de patrones de tapa m<sup>7</sup>G o calibradores que retienen el epitopo del anticuerpo primario y pueden unirse a un sustrato sólido. Estos estándares o calibradores pueden diluirse en serie, y se utiliza el valor de la señal resultante de cada concentración ensayada de estándar o calibrador para generar una curva estándar; trazar la concentración de estándares o calibradores con tope frente a los valores de señal resultantes. Una vez que se establece una curva cuantitativa estándar, se usa un ensayo para determinar los niveles de ARNm tapado en una muestra al trazar la señal resultante en la curva estándar.

## **Kits**

**[0093]** La presente descripción proporciona además kits que comprenden diversos reactivos y materiales útiles para llevar a cabo métodos de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos cuantitativos descritos en este documento pueden ser realizados por laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o laboratorios comerciales. La descripción proporciona kits que se pueden utilizar en estas diferentes configuraciones.

**[0094]** Por ejemplo, los materiales y reactivos para cuantificar la eficacia de la limitación del ARNm en una muestra de ARNm al proporcionar una sustancia de unión de tapa específica según los métodos de la invención se pueden ensamblar juntos en un kit. En ciertas realizaciones, un kit comprende al menos uno o más reactivos que forman específicamente un complejo con una cubierta de ARNm, opcionalmente agentes para detectar la formación del complejo, e instrucciones para usar el kit de acuerdo con un método de la invención.

**[0095]** Cada kit puede comprender preferiblemente el reactivo que hace que el procedimiento sea específico. Por lo tanto, para detectar/cuantificar la eficacia de la limitación del ARNm, el reactivo que forma específicamente un complejo con la tapa puede ser un anticuerpo. Los kits también pueden comprender agentes de detección o secundarios (por ejemplo, anticuerpos conjugados con HRP) que detectan la formación del complejo. Los kits también pueden comprender sustratos sólidos, conjugados opcionalmente con un segundo agente de captura para el aislamiento de ARNm (por ejemplo, placas de 96 pocillos biotiniladas). Los kits también pueden comprender primeros agentes de captura, por ejemplo, proteínas u oligonucleótidos que interactúan específicamente con el ARNm.

**[0096]** Los kits u otros artículos de fabricación de acuerdo con la descripción pueden incluir uno o más recipientes para contener diversos reactivos. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas (por ejemplo, jeringas precargadas), ampollas. El contenedor puede estar formado por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico.

**[0097]** En algunas realizaciones, los kits de la presente descripción pueden incluir niveles de control adecuados o muestras de control para determinar los niveles de control como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los kits de la descripción pueden incluir instrucciones para usar el kit de acuerdo con uno o más métodos de la invención y pueden comprender instrucciones para la transcripción *in vitro* y la tapa.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1: Síntesis de ARNm**

**[0098]** Se sintetizaron ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) y eritropoyetina humana (ePO) mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídica que codifica cada gen respectivo. La transcripción *in vitro* incluyó la adición de una estructura de tapa 5', Tapa1, que tiene un residuo 2'-O-metilo en el grupo 2' OH del anillo ribosa de la base 1, por conjugación enzimática de GTP a través de transferasa de guanililo. Se incorporó una cola poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud (según lo determinado por electroforesis en gel) a través de la adición de ATP junto con la polimerasa de poliA (consulte las condiciones de reacción detalladas a continuación). El producto de la transcripción *in vitro* incluyó las regiones no traducidas 5' y 3', que se representan como X e Y, respectivamente, en las siguientes secuencias:

ARNm de la eritropoyetina humana (ePO) (SEQ ID NO: 1)

**X<sub>1</sub>**AUGGGGGUGGCACGAAUGUCCUGCCUGGGCUGUGGGCUUCUCCUGUCCCU  
 GCUGUCGCUCCCUUGGGCCUCCAGUCCUGGGCGCCCCACCACGCCUCA  
 5 UCUGUGACAGCCGAGUCCUGGAGAGGUACCUCUUGGAGGCCAAGGAGGC  
 CGAGAAUAUCACGACGGGCUGUGCUGAACACUGCAGCUUGAAUGAGAAU  
 AUCACUGUCCAGACACCAAAGUUAUUUCUAUGCCUGGAAGAGGAUGG  
 10 AGGUCGGGCAGCAGGCCGUAGAAGUCUGGCAGGGCCUGGCCUUGCUGUC  
 GGAAGCUGUCCUGCGGGGCCAGGCCUGUUGGUCAACUCUUCUCCAGCCG  
 UGGGAGCCCCUGCAGCUGCAUGUGGAUAAAGCCGUCAGUGGCCUUCGCA  
 GCCUCACCACUCUGCUUCGGGCUCUGGGAGCCCAGAAGGAAGCCAUCUC  
 15 CCCUCCAGAUGCGGCCUCAGCUGCUCCACUCCGAACAAUCACUGCUGAC  
 ACUUUCCGCAAACUCUUCGAGUCUACUCCAAUUUCCUCCGGGGAAAGC  
 UGAAGCUGUACACAGGGGAGGCCUGCAGGACAGGGGACAGAUGAY<sub>1</sub>

20 ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado por codón (FFL) (SEQ ID NO: 2)

**X<sub>2</sub>**AUGGAAGAUGCCAAAACAUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCC  
 ACUCGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGC  
 25 UACGCCUUGGUGCCCGGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUUUCGAGG  
 UGGACAUAACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGA  
 AGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGC  
 30 AGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCU  
 UCGGUGUGGCUGUGGCCCCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCU  
 GCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCCACCGUCGUUUUCGUGAGCAAG  
 AAAGGGCUGCAAAAGAUAUCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGAUCUAC  
 35 AAAAGAUCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGGCUUCCAAAG  
 CAUGUACACCUUCGUGACUUCUCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUAC  
 GACUUCGUGCCCGAGAGCUUCGACCGGGACAAAACCAUCGCCUUGAUC  
 UGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGGGGCGUAGCCCUACCGCA  
 40 CCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUCGGC  
 AACCGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCUUCAGCGUGGUGCCAUUUCACC  
 ACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCG  
 GGUCGUGCUCUAGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUCGCGCAGCUUG  
 45 CAAGACUAUAAGAUUCAAUUCUGCCCUGCUGGUGCCCACACUAUUUAGCU  
 UCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA  
 CGAGAUCGCCAGCGGCGGGGCGCCGCUAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCC  
 GUGGCCAAACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGA  
 50 CAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUCACCCCCGAAGGGGACGACAAGCC  
 UGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGAC  
 UUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCG  
 UCCGUGGCCCAUGAUCUAGAGCGGCUACGUUAACAACCCCGAGGCUAC  
 55 AAACGCUCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCC  
 UACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCU  
 UGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGCAU  
 CCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGGUCGCCGGCCUGCCCG  
 60 ACGACGAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGCGAGUCGUCGUGCUGGAACACGG  
 UAAAACCAUGACCGAGAAGGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUU  
 ACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGC  
 65 CUAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCGCAAGAUCGCGAGAUUCU  
 CAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUAY<sub>2</sub>

[0099] Las secuencias de UTR 5' y 3' para X1/Y1 y X2/Y2 fueron las siguientes:

X<sub>1</sub> =

5 GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC

GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCCG  
 10 UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ ID NO: 3)

X<sub>2</sub> = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 4)

15 Y<sub>1</sub> =

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCUCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCC  
 20 ACUCCAGUGCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 5)

= UUUGAAUU (SEQ ID NO: 6)

Y<sub>2</sub>

25 [0100] La síntesis de ARNm se llevó a cabo en condiciones completas sin ARNasa. Todos los tubos, viales, puntas de pipeta, pipetas, tampones, etc. se requirieron sin nucleasas. El ARN mensajero se sintetizó a partir de una plantilla de ADN linealizado. Para producir el constructo de pre-cursor de ARNm deseado (IVT), una mezcla de ~100 ug de línea ADN linealizado, rNTP (3,33 mM), DTT (10 mM), polimerasa de T7 ARN, inhibidor de ARNasa, pirofosfatasa y tampón de reacción (10x, se preparó Hepes 800 mM (pH 8,0), espermidina 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 250 mM, pH 7,7) con agua libre de ARNasa hasta un volumen final de 2,24 ml. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante entre 20 y 120 minutos. Una vez completado, la mezcla se trató con DNasa I durante 15 minutos adicionales y se detuvo en consecuencia.

35 [0101] El producto de ARNm purificado de la etapa IVT mencionada anteriormente se desnaturalizó a 65°C durante 10 minutos. Por separado, se mezclan porciones de GTP (20 mM), S-adenosilo metionina, inhibidor de la ARNasa, 2'-O-metiltransferasa y transferasa de guanililo (10x, Tris-HCl 500 mM (pH 8,0), KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 12,5 mM) hasta una concentración final de 8,3 ml. Tras la desnaturalización, el ARNm se enfrió en hielo y luego se añadió a la mezcla de reacción. La solución combinada se incubó a 37°C durante 20-90 minutos. Al finalizar, se agregaron partes alícuotas de ATP (20 mM), poliA polimerasa y tampón de reacción de colas (10x, Tris-HCl 500 mM (pH 8,0), NaCl 2,5 M, MgCl<sub>2</sub> 100 mM) y la mezcla de reacción total se incubó adicionalmente a 37°C durante unos 20-45 minutos. Una vez completado, la mezcla de reacción final se apaga y se purifica en consecuencia.

**Ejemplo 2: Cuantificación de la eficiencia de la limitación utilizando el ELISA de captura de oligo-dT basado en biotina-estreptavidina**

45 [0102] Este ejemplo ilustra un método ELISA ejemplar para cuantificar la eficiencia de la limitación. Una realización ejemplar se representa en la FIG. 1. Una microplaca de estreptavidina disponible comercialmente se lavó 3 veces con tampón de lavado (Tween 20 al 0,05%, PBS 0,01 M a pH 7,2) y se secó. Se añadió oligo dT<sub>20</sub> 5' de biotina comercialmente disponible a 1-5 pmol/pocillo en un volumen final de 100 µl y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante una hora. La placa se lavó tres veces con tampón de lavado y se bloqueó durante 1 h con 320 ml de tampón de bloqueo (PBS 0,01 M, BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,15%).

55 [0103] Las muestras de ARN mensajero se desnaturalizaron durante 10 minutos a 94°C y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de tampón de hibridación (4xSSC, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, Tween 20 al 0,15%) que contenía 20 pmol-1 µmol de ARNm y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con tampón de lavado que contenía EDTA 2 mM.

60 [0104] Se aplicó un anticuerpo primario, la tapa anti-m<sup>7</sup>G monoclonal de ratón (dilución 1:2000-1:25000 en alícuotas de 100 µl) a cada pocillo de la placa y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. La placa se lavó tres veces con tampón de lavado que contenía EDTA 2 mM. Después del lavado, se agregaron a cada pocillo 100 µl de un anticuerpo secundario, anticuerpo conjugado con HRP anti-ratón de cabra (dilución 1:40.000), y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con tampón de lavado que contenía EDTA 2 mM.

65 [0105] Para detectar la interacción de los anticuerpos primarios y secundarios, se preparó solución de sustrato cromogénico TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se agregó a cada

pocillo en alícuotas de 100 µl y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N.

5 [0106] El TMB produjo un color azul reconocible al detectar HRP. Luego de la adición del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el color cambió a amarillo con la absorbancia máxima a 450 nm, que se leyó utilizando un lector de placa Molecular Devices.

10 [0107] Se encontró que un pocillo con absorbancia a 450 nm indicaba la presencia de un ARNm tapado. La medición cuantitativa del ARNm tapado por muestra se determina a partir de los valores medios de absorbancia de la muestra, seguidos de la interpolación de una curva estándar (representación gráfica de la concentración frente a la absorbancia) generada a partir de controles positivos diluidos en serie de la pequeña molécula de tapa m<sup>7</sup>G conjugada unida a placas recubiertas con estreptavidina y detectadas por el anticuerpo monoclonal de tapa m<sup>7</sup>G de ratón (sistemas sinápticos).

15 **Ejemplo 3: Cuantificación de la eficacia de la limitación utilizando el ELISA de captura basado en proteínas de unión a PoliA**

20 [0108] Este ejemplo ilustra otro método ELISA ejemplar utilizando placas ELISA recubiertas con proteína de unión a poliA. Específicamente, una placa de ELISA se reviste con una proteína de unión a poliA ("PABP") a 1 µg/ml usando un tampón de recubrimiento (50 mM de NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). La placa se lava posteriormente y se bloquea con tampón de bloqueo (1xPBS, Tween 20 al 0,05%, BSA al 2%) y se incuba durante una hora a temperatura ambiente. La placa se lava tres veces con tampón de lavado (1xPBS, Tween 20 al 0,05%).

25 [0109] Las muestras de ARNm se desnaturalizan durante 10 minutos a 94°C y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las muestras luego se diluyen a una concentración de aproximadamente (20 pmol-1 µmol) en tampón de hibridación (4xSSC, HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, Tween 20 al 0,15%) que contiene ARN. Se añaden aproximadamente 100 µl a cada pocillo y se incuban durante una hora a temperatura ambiente.

30 [0110] Se aplica un anticuerpo primario, la tapa anti-m<sup>7</sup>G monoclonal de ratón (dilución 1:2000-1:25000 en partes alícuotas de 100 µl) a cada pocillo de la placa y se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. La placa se lava tres veces con tampón de lavado que contiene EDTA 2 mM, seguido de la adición de un anticuerpo secundario conjugado con HRP Fc IgG anti-ratón de cabra (Pierce 31439) a una dilución de 1:40.000 e incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar 3x con tampón de lavado, se prepara TMB y se agrega como anteriormente. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y la placa se leyó a 450 nm como anteriormente.

35 [0111] En realizaciones alternativas, se utilizan microplacas disponibles comercialmente sobre las que se ha recubierto previamente el anticuerpo específico para PAIP2. Se agregan 100 µl de PAIP2 recombinante humano disponible comercialmente (Cusabio®) a 0,1 µg/ml - 10 µg/ml por pocillo usando un tampón de recubrimiento (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6), seguido de una incubación de una hora a temperatura ambiente. El PAIP2 recombinante humano presente está unido por el anticuerpo inmovilizado. Después de eliminar cualquier sustancia no unida, se agregan muestras de ARNm a los pozos como se indicó anteriormente para limitar la cuantificación de la eficiencia. Se aplica un anticuerpo primario, la tapa anti-m<sup>7</sup>G monoclonal de ratón (dilución 1:2000-1:25000 en alícuotas de 100 µl) a cada pocillo de la placa y se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. La placa se lava tres veces con tampón de lavado que contiene EDTA 2 mM. Después del lavado, se añaden a cada pocillo 100 µl de un anticuerpo secundario, anticuerpo conjugado con HRP anti-ratón de cabra (dilución 1:40.000), y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lava tres veces, seguido de la adición de la solución de sustrato cromogénico TMB. Se detiene el desarrollo de color, se mide la intensidad del color y se cuantifica la cantidad de ARNm tapado utilizando una curva estándar como la anterior.

50 **Ejemplo 4: Evaluación de la limitación del ARNm 5' en la producción de proteínas *in vivo***

55 [0112] En este ejemplo, evaluamos el impacto de la limitación del ARNm 5' en la producción de proteínas *in vivo* y su impacto potencial en la eficacia de la terapia basada en ARNm. Específicamente, evaluamos el impacto de la limitación de 5' en la producción *in vivo* de alfa-galactosidasa A (alfa-Gal A), que es deficiente en la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Fabry es una enfermedad de almacenamiento lisosomal hereditaria ligada al X caracterizada por insuficiencia renal grave, angioqueratomas y anomalías cardiovasculares, que incluyen agrandamiento ventricular e insuficiencia de la válvula mitral. La enfermedad de Fabry también afecta el sistema nervioso periférico, causando episodios de dolor agonizante y ardiente en las extremidades. La enfermedad de Fabry es causada por una deficiencia en la enzima alfa-galactosidasa A (alfa-Gal A). La alfa-Gal A es la glicohidrolasa lisosomal que escinde los restos terminales alfa-galactosilo de diversos glicoconjugados. La enfermedad de Fabry produce un bloqueo del catabolismo del glicosfingolípido neutro, la ceramida trihexosida (CTH) y la acumulación de este sustrato enzimático dentro de las células y en el torrente sanguíneo.

65 [0113] El ADNc y el gen que codifica la alfa-Gal A humana, GLA, se han aislado y secuenciado. La alfa-Gal A humana se expresa como un polipéptido de 429 aminoácidos, de los cuales los 31 aminoácidos N-terminales son el péptido señal. La enzima humana se ha expresado en células de ovario de hámster chino (CHO) (Desnick et al.,

Patente de EE.UU. Nº 5.356.804; Ioannou et al., J. CELL BIOL. 119: 1137 (1992)); y células de insecto (Calhoun et al., WO 90/11353).

**[0114]** Los individuos que padecen la enfermedad de Fabry pueden tratarse mediante terapia de sustitución enzimática con alfa-Gal A humana (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.458.574). Los enfoques adicionales que modulan o complementan la expresión de la deficiencia de alfa-Gal A, y por lo tanto mejoran la deficiencia subyacente, serían útiles en el desarrollo de terapias apropiadas para los trastornos asociados. Tales enfoques incluyen métodos de administración intracelular de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm de GLA) que son capaces de corregir defectos genéticos existentes y/o proporcionar funciones beneficiosas a una o más células diana. Después de la administración exitosa a las células y tejidos diana, las composiciones y los ácidos nucleicos transfectan la célula diana y los ácidos nucleicos (p. ej., ARNm de GLA) se pueden traducir al producto génico de interés (p. ej., Alfa-GAL A) o pueden modular/regular de otra manera la presencia o expresión del producto genético de interés. Tales métodos han sido descritos previamente; véase, por ejemplo, la publicación de la subvención de Estados Unidos 2011/0244026.

**[0115]** En este ejemplo, evaluamos el impacto de la limitación de 5' en la producción de proteínas *in vivo*. El ARNm de GLA humano se sintetizó por transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN plasmídica que codifica el gen, que fue seguida por la adición de una estructura de tapa 5', ya sea Tapa0 o Tapa1 (Fechter, P. et al., J. GEN. VIROLOGY, 86: 1239-1249 (2005)). También se agregó una cola poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, determinada por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en el ARNm de GLA se representan como X e Y en la SEQ ID NO: 7. como se indica a continuación:

ARNm de alfa-galactosidasa (GLA) (SEQ ID NO: 7):

X<sub>2</sub>AUGCAGCUGAGGAACCCAGAACUACAUCUGGGCUGCGCGCUUGCGCUUCGCUU  
 CCUGGCCUCGUUCCUGGGACAUCCUGGGGCUAGAGCACUGGACAAUGGAUUG  
 GCAAGGACGCCUACCAUGGGCUGGCUGCACUGGGAGCGCUUCAUGUGCAACCUUG  
 ACUGCCAGGAAGAGCCAGAUUCCUGCAUCAGUGAGAAGCUCUUCAUGGAGAUGG  
 CAGAGCUCAUGGUCUCAGAAGGCUGGAAGGAUGCAGGUUAUGAGUACCUCUGCA  
 UUGAUGACUGUUGGAUGGCUCUCCCAAAGAGAUUCAGAAGGCAGACUUCAGGCAG  
 ACCCUCAGCGCUUCCUCAUGGGAUUCGCCAGCUAGCUAAUUUAUGUUCACAGCAA  
 AGGACUGAAGCUAGGGAUUUUAUGCAGAUGUUGGAAAUAUAAACCUGCGCAGGCCU  
 CCCUGGGAGUUUUGGAUACUACGACAUUGAUGCCCAGACCUUUGCUGACUGGGG  
 AGUAGAUCUGCUAAAAUUUGAUGGUUGUACUGUGACAGUUUGGAAAUUUGGC  
 AGAUGGUUAUAAGCACAUUGUCCUUGGCCUGAAUAGGACUGGCAGAAGCAUUGU  
 GUACUCCUGUGAGUGGCCUCUUUAUUAUGUGGCCUUUCAAAAAGCCCAAUUUAACA  
 GAAAUCCGACAGUACUGCAAUCACUGGGCGAAUUUUGCUGACAUUGAUGAUUCC  
 UGGAAAAGUAUAAAGAGUAUCUUGGACUGGACAUCUUUUAACCAGGAGAGAAUU  
 GUUGAUGUUGCUGGACCAGGGGGUUGGAAUGACCCAGAUUAUGUUAGUGAUUGGC  
 AACUUUGGCCUCAGCUGGAAUCAGCAAGUAACUCAGAUGGCCUCUGGGCUAUC  
 UGGCUGCUCCUUUAUUAUGUCUAAUGACCUCGACACAUCAGCCCUCAAGCCAA  
 AGCUCUCCUUCAGGAUAAGGACGUAAUUGCCAUCAAUCAGGACCCCUUGGGCAAG  
 CAAGGGUACCAGCUUAGACAGGGAGACAACUUUGAAGUGUGGGAACGACCUCUC  
 UCAGGCUUAGCCUGGGCUGUAGCUAUGAUAAACCGGCAGGAGAUUGGUGGACCU  
 CGCUCUUUAUACCAUCGCAGUUGCUUCCUGGGUAAAAGGAGUGGCCUGUAAUCCUG  
 CCUGCUUCAUCACACAGCUCCUCCUGUGAAAAGGAAGCUAGGGUUCUAUGAAUG  
 GACUUCAAGGUUAAGAAGUCACAUAUAAUCCACAGGCACUGUUUUGCUCUACGCU  
 AGAAAAUACAAUGCAGAUGUCAUUAUAAAGACUUAUUAAAY<sub>2</sub>

X = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 4)

Y = UUGAAUU (SEQ ID NO: 6)

**[0116]** En algunas realizaciones (SEQ ID NO: 8) también se utiliza una alfa-galactosidasa optimizada con codón con inserción de PoliA (CO-GLA-PolyA):

5 X<sub>1</sub>AUGCAGCUGAGGAAACCCAGAGCUCCAUCUCGGAUGUGCACUGGCACUUAGAAU  
 UCUCGCGCUUGUGUCGUGGGACAUCGCCGAGCCAGGGCGCUGGAUAAUGGGCUC  
 GCCCGGACUCCCACAAUGGGUUGGCUCGACUGGGAGCGCUUUAUGUGCAAUCUGG  
 ACUGCCAGGAAGAGCCCGAUAGCUGUAUUUCGGAGAAGCUCUUCUAUGGAAUUGG  
 CGGAGUUGAUGGUGUCCGAAGGGUGGAAGGAUUGCGGGAUUAGAGUAUCUGUGUA  
 UCGAUGACUCGUGGAUGGCACCCGACGCGAGAUUCGGAGGGGGCGAUUGCAGGCCG  
 ACCCUCAGCGCUUCCCUCAUGGAAUUCGGCAGCUGGCCAACUACGUACACUCAAA  
 10 AGGACUUAAGUUGGGGAUCUACGCGGACGUCGGUAAUAAGACAUGCGCUGGGUU  
 CCCGGGGAGCUUCGGAUACUAUGAUUAUGAUGCCCAGACCUUCGCGGACUGGGGA

15 GUGGACUUGCUUAAGUUUGAUGGUUGUACUGUGACUCAUUGGAAAACUUGGCG  
 GAUGGGUAUAAACAUAUGUCCUUGGCCUUGAAUCGGACAGGGCGGUCGAUCGUC  
 UACAGCUGCGAAUGGCCUUUGUAUAUGUGGCCGUUCCAGAAACCCAACUACACCG  
 AAAUUCGCCAGUAUUGCAAUCACUGGAGAAAACUUCGCCGAUAUCGACGAUUCGU  
 GGAAAUCAUAAGUCCAUCUCGACUGGACGUCCUUAACCAAGAGAGAAUUCGU  
 AGAUGUGGCCGGACCGGGAGGAUGGAACGACCCUGAUUAGCUUGUAAUUGGCAA  
 20 CUUUGGACUCUCGUGGAACCAGCAAGUAACGCAAUUGGCACUCUGGGCUAUCUAG  
 GCUGCGCCCCUGUUCUAUGUCAAAACGACCUCAGGCACAUCUCGCCGCAGGCGAAAG  
 CCUUGCUUCAAGAUAAAGGACGUCAUCGCGAUUAAUCAGGACCCGCGUGGGGAAGCA  
 GGGCUAUCAGCUUAGACAGGGCGACAUUUUGAGGUCUGGGAGCGACCCUGAG  
 CGGACUCGCAUGGGCGGUGGCAAUGAUCAAUAGGCAGGAAAUUGGUGGGCCGAG  
 25 GUCGUACACUAUCGCCGUCGCGUCGUUGGGAAAGGGUGUGGGGUGUAAUCCAGC  
 GUGCUUUAUCACCCAACUCGUCGCCGUCAGCGCAAACUGGGUUUUUACGAAUUGG  
 ACGAGCAGACUUCGCUCACACAUAAACCCAACGGGUACGGUGUUGCUCCAGCUCG  
 AGAAUACAAUGCAAUUGCUCUUAAGAUUUGCUCUGACGGGUGGCAUCCUCUGU  
 GACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCCAGUCCACCA  
 30 GCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAA  
 AAA

35 **[0117]** El ARNm de GLA se almacenó en agua a una concentración final de 1 mg/ml a -80°C hasta el momento de su uso. Todas las concentraciones de ARNm se determinaron mediante absorción (y<sub>max</sub> 260 nm).

40 **[0118]** Las formulaciones adecuadas para la administración *in vivo* de ARNm de GLA Tapa0, ARNm de GLA Tapa1, ARNm de GLA y otros controles incluyen una mezcla de lípidos de múltiples componentes de proporciones variables que emplean uno o más lípidos catiónicos, lípidos auxiliares y lípidos PEGilados. Los lípidos catiónicos pueden incluir (pero no exclusivamente) DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenilo-3-trimetilamonio propano), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I., "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. CONTR. REL., 107: 276-287 (2005)), DLin-KC2-DMA (Semple, SC et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery", NATURE BIOTECH., 28: 172-176 (2010)), C12-200 (Love, KT et al. "Lipid-like materials for low-dose *in vivo* gene silencing", PROC NATL ACAD SCI. EE.UU., 107: 1864-1869 (2010), HGT4003, ICE, a base de dialquilamino, a base de imidazol, guanidina basados en, etc. Los lípidos auxiliares pueden incluir (pero no exclusivamente) DSPC (1,2-distearoil-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)), 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(s) de alquilo de longitud C6-C20. La encapsulación lipídica del ARNm se calculó realizando el ensayo de Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1%. Los tamaños de partículas (dispersión dinámica de la luz (DLS)) y los potenciales zeta se determinaron utilizando un instrumento Malvern Zetasizer en 1x PBS y soluciones KCl 1 mM, respectivamente.

55 **[0119]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de C12-200, DOPE, Chol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de CO-GLA (Tapa 0 o Tapa 1) a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa y se agitó 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 = 0,72 mg/ml de ARNm de GLA (encapsulado). Zave = 85,5 nm (Dv(50) = 61,9 nm; Dv(90) = 113 nm).

65 **[0120]** Para determinar si el tipo de tapa incorporado en el ARNm de GLA influyó en la producción de proteínas cuando el ARNm se encapsuló en un lípido basado en C12-200, se realizó un experimento en el que los ratones de

tipo salvaje (CD-1) se inyectaron con especies ARNm de GLA tapadas y posteriormente monitoreadas para la producción de proteína GLA humana. Las especies de ARNm limitadas incluían Tapa0 (no metiladas en la posición 2'-O) y Tapa1 (metiladas 2'-O).

5 **[0121]** Los estudios anteriores se realizaron utilizando ratones macho CD-1 de aproximadamente 6-8 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Las muestras se introdujeron mediante una inyección única en la vena de la cola de un bolo de una dosis total equivalente de 30 microgramos de ARNm de GLA, EPO, FIX o AIAT encapsulado. Las concentraciones séricas de proteína GLA se determinaron a las seis horas. Todos los animales se sometieron a eutanasia por asfixia con CO<sub>2</sub> 6 horas después de la administración de la dosis ( $\pm$  5%), seguido de una toracotomía y una extracción terminal de sangre cardíaca. La sangre completa (volumen máximo obtenible) se recogió mediante punción cardíaca en animales sacrificados en tubos separadores de suero, se dejó coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, se centrifugó a 22°C  $\pm$  5°C a 9.300 g durante 10 minutos, y se extrajo el suero. Para la recogida provisional de sangre a las seis horas, se recogieron aproximadamente 40-50  $\mu$ l de sangre completa mediante punción de la vena facial o recorte de la cola. Las muestras recogidas de animales sin tratamiento se utilizaron como niveles de referencia de GLA para comparar con animales de estudio. El hígado y el bazo de cada ratón se recogieron, se repartieron en tres partes y se almacenaron en formalina tamponada neutra al 10% o se congelaron rápidamente y se almacenaron a 80°C.

20 **[0122]** La producción de proteína GLA humana se midió mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("ELISA"). Se siguieron los procedimientos estándar de ELISA empleando IgG anti-Replagal G-188 de oveja como el anticuerpo de captura con IgG anti-Replagal de conejo como el anticuerpo secundario (detección). Se utilizó IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para la activación de la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). La reacción se detuvo utilizando 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. Se utilizaron suero de ratón no tratado y proteína Replagal® humana como controles negativos y positivos, respectivamente.

30 **[0123]** Como se ilustra en la FIG. 3, después de la inyección intravenosa de especies limitadas de ARNm de CO-GLA cargadas en las nanopartículas lipídicas basadas en C12-200, se pudo detectar un nivel sustancial de proteína GLA humana en el suero de ratón dentro de las 6 horas. En particular, hubo un aumento estadísticamente significativo en la producción de proteínas cuando se emplea ARNm con una estructura de Tapa1 en comparación con la de una estructura de Tapa0. Estos resultados demostraron la importancia de tener la capacidad de caracterizar y cuantificar la eficacia de la limitación del proceso de síntesis del ARNm.

#### 35 **Ejemplo 5: ELISA de tapa usando placas recubiertas de Oligo dT**

**[0124]** Este ejemplo demuestra el uso de placas ELISA recubiertas con oligo dT en ensayos de cuantificación de tapado. Específicamente, se analizó el oligo-T20 potenciado con LNA (exiqon) para determinar su eficacia de unión en las placas de amino inmovilizador Nunc (Thermo Scientific) en un rango de 0,1 pmol/pocillo a 500 pmol/pocillo en 100  $\mu$ l de tampón de recubrimiento (NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,6). Las placas se incubaron durante 1,5 horas girando a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado (1xPBS, Tween 20 al 0,05%) y se secaron sobre toallas de papel. La capacidad de unión del ARNm se ensayó con ARNm taponado/no tapado en un rango de 7,8 ng/pocillo a 500 ng/pocillo en 100  $\mu$ l de tampón de unión (fosfato sódico 50 mM, pH 7,0) y se incubó durante 90 minutos rotando a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado y se secaron sobre toallas de papel. Se conjugaron 2  $\mu$ l de anticuerpo anti-tapa (Sysy) directamente con HRP usando el kit de marcaje IgGi de ratón peroxidasa de rábano picante Zenon (Invitrogen) en un volumen final de 20  $\mu$ l. El anticuerpo conjugado con HRP se mezcló a 0,8  $\mu$ l/ml en tampón de bloqueo (1x PBS, 2% BSA, 0,05% Tween 20) y se añadió a 100  $\mu$ l/pocillo y se incubó durante 1 hora rotando a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l de tampón de unión y se secaron sobre toallas de papel. La solución de sustrato TMB EIA se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron 100  $\mu$ l de esto a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo después de 10 minutos agregando 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se leyó usando un lector de placa Molecular Devices a 450 nm. **FIG. 4** muestra resultados ejemplares de la cuantificación de la limitación en ARNm con límite y sin límite medido por ELISA. La señal detectada se deriva de la interacción del anticuerpo anti-tapa con la estructura de tapa en las muestras de ARN.

55 **[0125]** Este ejemplo demuestra que la cuantificación de la cobertura se puede optimizar utilizando placas ELISA recubiertas con oligo dT como sustratos de captura.

#### **Ejemplo 6: Cuantificación de la eficiencia de limitación usando ELISA de captura de Oligo dT**

60 **[0126]** En este ejemplo, demostramos además que la eficacia de la limitación en varias muestras de ARNm se puede cuantificar de manera efectiva utilizando el ELISA de captura de oligo dT.

**[0127]** Específicamente, las placas de captura de ARNm recubiertas con oligo dT se prepararon uniendo oligo-T20 potenciado con LNA de 50 pmol (exiqon) en 100  $\mu$ l de tampón de revestimiento por pocillo en placas de amino inmovilizador Nunc (Thermo Scientific). Las placas se incubaron durante 1,5 horas girando a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado (1xPBS, Tween 20 al 0,05%) y se secaron sobre

5 toallas de papel. Oligo recubierto de metilo N7 [N7MeGppp]-AAAAAAAAA AAAAA se sintetizó (biosíntesis) para las mediciones de curva estándar. Se agregaron oligo recubierto con metilo N7 de 64 ng y ARNm recubierto con 64 ng comercialmente con una cola de poliA de 200 pb o en casa con una cola de poliA de 500 pb por pocillo en 100 µl de tampón de unión a ARN (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0) y se incubaron durante 90 minutos girando a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de lavado y se secaron sobre toallas de papel. Se conjugaron 2 µl de anticuerpo anti-tapa (Ssys) directamente con HRP utilizando el kit de marcaje IgG1 de ratón peroxidasa de rábano picante Zenon (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. El anticuerpo conjugado con HRP se mezcló a 0,8 µl/ml en tampón de bloqueo (1x PBS, 2% BSA, 0,05% Tween 20) y se añadió a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora rotando a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de unión y se secaron sobre toallas de papel. La solución de sustrato TMB EIA se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron 100 µl de esto a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo después de 10 minutos agregando 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se leyó usando un lector de placa Molecular Devices a 450 nm. **FIG. 5** muestra resultados ejemplares de la cuantificación del límite en varias muestras de ARNm (por ejemplo, cierto ARNm interno de luciferasa de luciérnaga (FFL), ARNm de FFL comercial y un ARN con límite de metilo N7 estándar) medido por ELISA.

15 **[0128]** Este ejemplo demuestra que se puede usar ELISA (tal como el ELISA de captura de oligo dT) para cuantificar de manera efectiva la eficacia de la cobertura en muestras de ARNm.

## 20 **Equivalentes y alcance**

25 **[0129]** Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando solo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas descritas en este documento. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a la descripción anterior, sino que se establece en las reivindicaciones adjuntas.

30 **[0130]** Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo de Markush, debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se divulga, y cualquier elemento puede ser eliminado del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se hace referencia a la invención, o aspectos de la invención, que comprenden elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc. Para fines de simplicidad, dichas realizaciones no se han expuesto específicamente en el presente documento. Se observa que el término "que comprende" pretende ser abierto y permite la inclusión de elementos o pasos adicionales.

35 **[0131]** Donde se dan los intervalos, se incluyen los puntos finales. Además, debe entenderse que, a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto y se entienda de alguien con experiencia en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor o sub-intervalo específico dentro de los rangos de estado en diferentes realizaciones de la invención, a la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

40 **[0132]** Las publicaciones discutidas anteriormente y en todo el texto se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Ninguna parte de este documento debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anticipar dicha descripción en virtud de una descripción previa.

45 **[0133]** Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que lo anterior representa simplemente ciertas realizaciones preferidas de la invención. Se pueden hacer varios cambios y modificaciones a los procedimientos y composiciones descritas anteriormente.

50

55

60

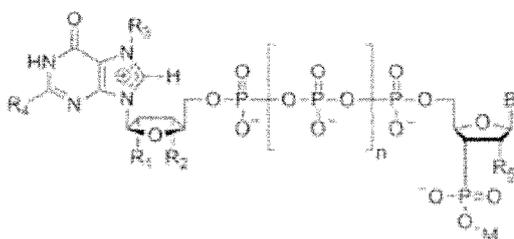
65

REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar la eficacia de la limitación del ARNm, que comprende:

5 transcribiendo ARNm *in vitro*;  
 tomar una muestra alícuota representativa de la reacción de síntesis *in vitro*;  
 proporcionar una sustancia de unión de tapa específica en condiciones que permiten la formación de un  
 complejo entre la sustancia de unión de tapa específica y el ARNm cubierto, en donde la sustancia de unión de  
 10 tapa específica es un anticuerpo específico de la tapa; y  
 determinar cuantitativamente la cantidad del complejo en la muestra alícuota representativa en comparación con  
 un control, cuantificando así la eficacia de la capacidad de límite del ARNm para determinar su calidad como  
 ingrediente farmacéutico activo (API) en un producto terapéutico final, en el que la etapa de determinar  
 cuantitativamente la cantidad del complejo comprende realizar un ensayo ELISA.

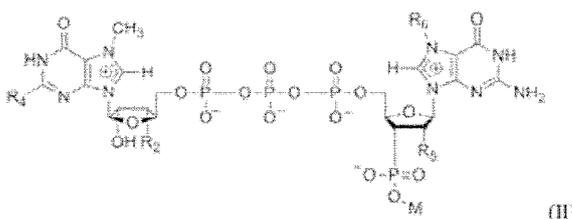
15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la tapa tiene una estructura de fórmula I:



en donde,

30 B es una nucleobase, opcionalmente en donde la nucleobase es guanina; R<sup>1</sup> se selecciona de un halógeno, OH  
 y OCH<sub>3</sub>;  
 R<sub>2</sub> se selecciona de H, OH y OCH<sub>3</sub>;  
 R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o vacío;  
 R<sub>4</sub> es NH<sub>2</sub>;  
 35 R<sub>5</sub> se selecciona de OH, OCH<sub>3</sub> y un halógeno;  
 n es 1, 2 o 3; y  
 M es un nucleótido del ARNm.

40 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la tapa es una tapa m<sup>7</sup>G con una estructura de fórmula II:



en donde,

55 R<sub>2</sub> es H o CH<sub>3</sub>;  
 R<sub>4</sub> es NH<sub>2</sub>;  
 R<sub>5</sub> es OH u OCH<sub>3</sub>;  
 R<sub>6</sub> es H o CH<sub>3</sub>; y  
 M es un nucleótido del ARNm.

60 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la sustancia de unión de tapa  
 específica es un anticuerpo anti-m<sup>7</sup>G.

65 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de determinar  
 cuantitativamente la cantidad de complejo comprende medir una señal detectable asociada con el complejo,  
 opcionalmente en donde

(i) la señal detectable está directamente asociada con la sustancia de unión de tapa específica, o

(ii) la señal detectable está asociada indirectamente con la sustancia de unión de tapa específica a través de un agente secundario que se une a la sustancia de unión de tapa específica, opcionalmente en donde el agente secundario es un anticuerpo secundario,

5 opcionalmente en donde la señal detectable es una señal fluorescente o una señal colorimétrica, opcionalmente en donde la señal fluorescente se genera al convertir un sustrato enzimático en un producto cromogénico, quimi fluorescente o quimioluminiscente por una enzima asociada directa o indirectamente con el enlace específico de la tapa sustancia, opcionalmente en donde el sustrato enzimático se selecciona de los grupos que consisten en sal disódica de p-pitrofenilo fosfato (PNPP), 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio (ABTS), o-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), opcionalmente en donde la enzima es fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante.

10 **6.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el control comprende (i) una muestra de ARNm con una cantidad predeterminada de ARNm con límite, o (ii) una cantidad predeterminada de tapa sintetizada.

15 **7.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cuantificación de la eficacia de limitación del ARNm comprende (i) cuantificar la cantidad absoluta de ARNm con límite en la muestra de ARNm y/o (ii) cuantificar el porcentaje de ARNm con límite en la muestra de ARNm.

20 **8.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método comprende además una etapa de captura del ARNm en un sustrato, opcionalmente en el que el ARNm es capturado por (i) un oligo poli-T que se une a la cola poli-A del ARNm o (ii) una proteína o anticuerpo de unión a poli-A, opcionalmente en donde el sustrato es una microplaca, perla magnética, partícula, perla polimérica, resina cromatográfica, papel de filtro, nitrocelulosa, diazocelulosa, vidrio, látex, poliestireno, policloruro de vinilo, propileno, polietileno, dextrano, sefarosa, agar, almidón, nailon, gel de sílice o hidrogel, opcionalmente en el que el sustrato está recubierto con avidina o estreptavidina, en donde opcionalmente el oligo poli-T o la proteína de unión a poli-A o el anticuerpo está biotinilado.

25 **9.** Un método para fabricar ARNm que comprende una etapa de cuantificación de la eficacia de limitación del ARNm de acuerdo con un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

30 **10.** El método de la reivindicación 9, en el que el método comprende una etapa de ajuste de una condición de fabricación basada en el resultado de la cuantificación de la eficacia del límite del ARNm, opcionalmente en la que la etapa de cuantificación se realiza antes de liberar un lote de ARNm.

35

40

45

50

55

60

65



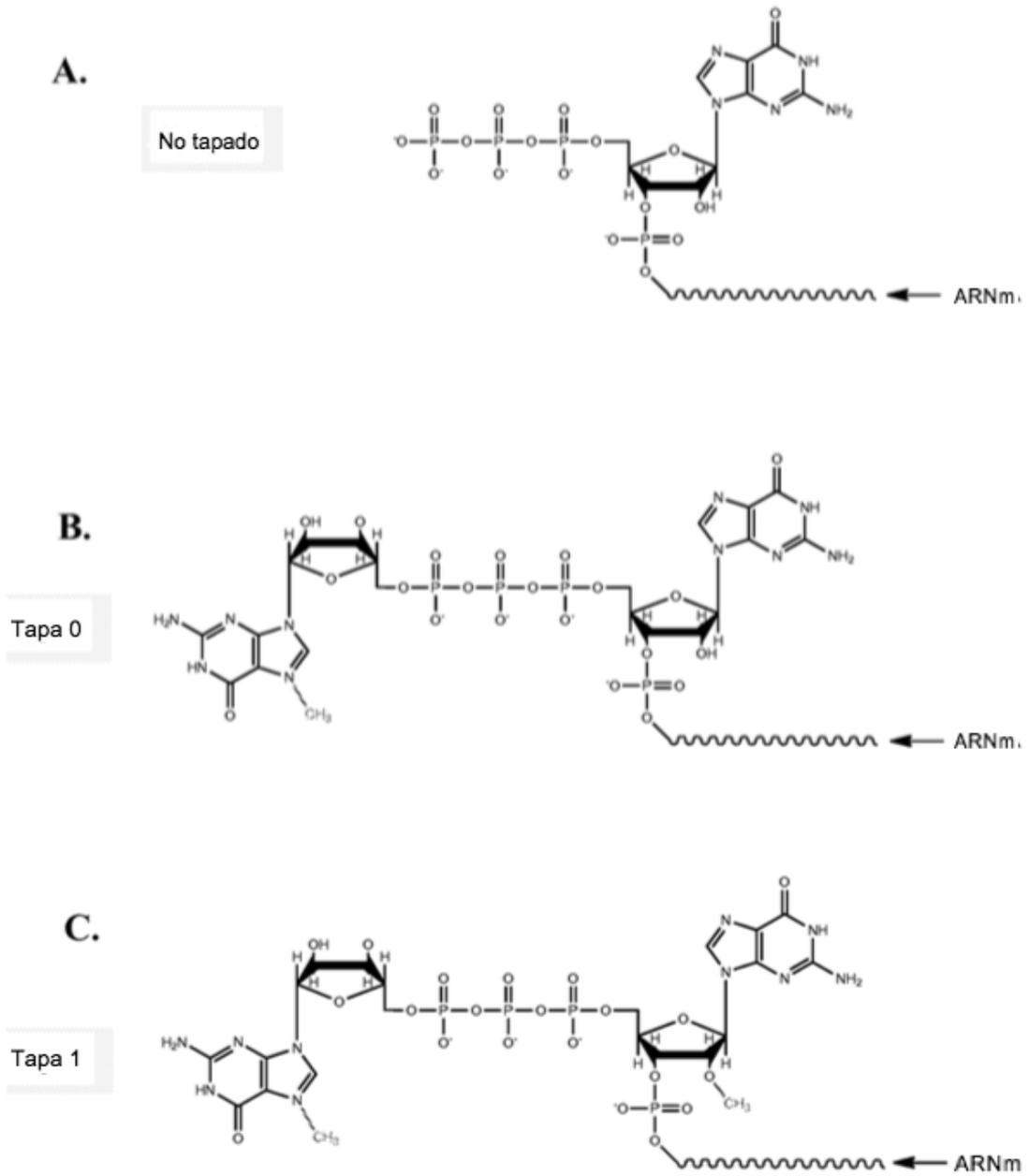


FIG. 2

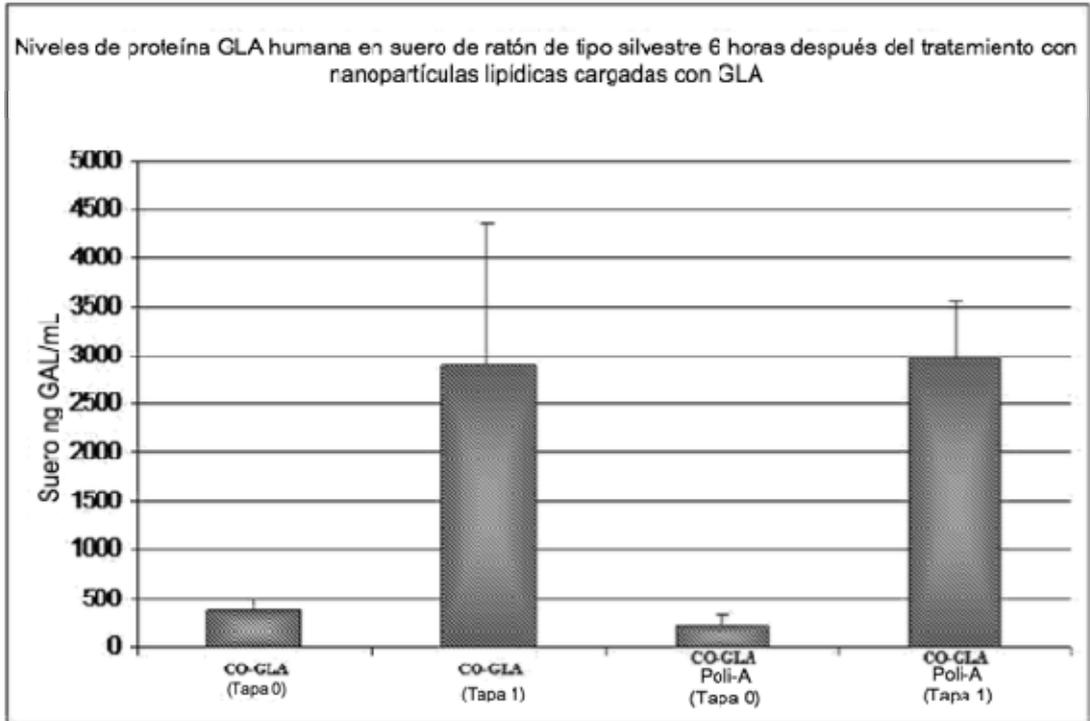


FIG. 3

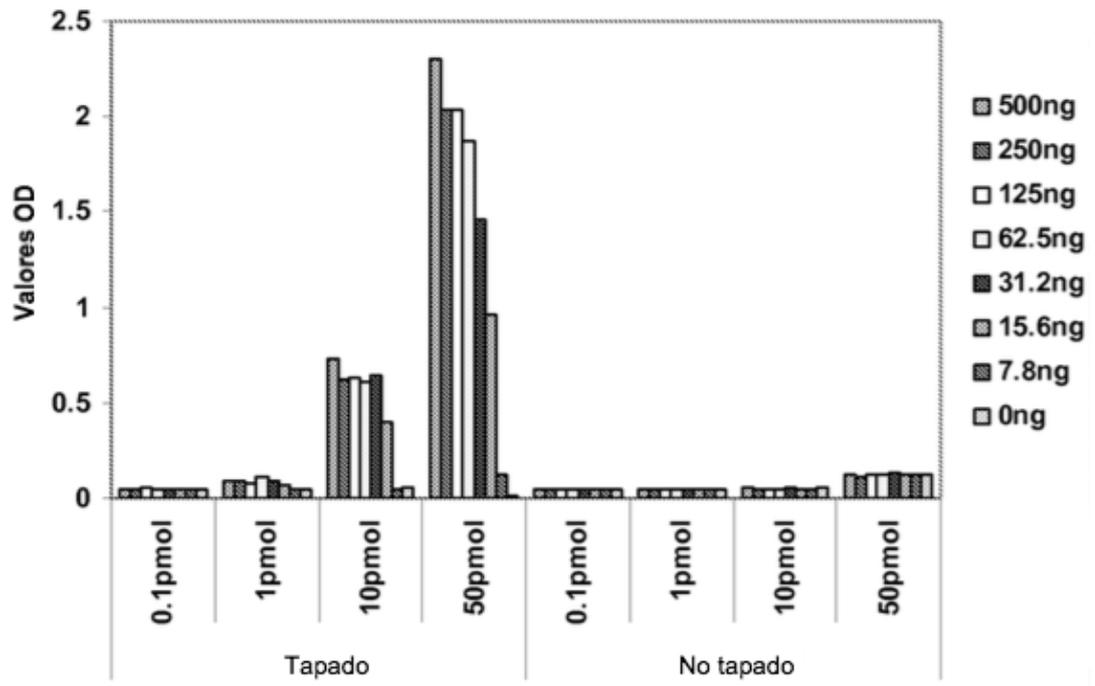


FIG. 4

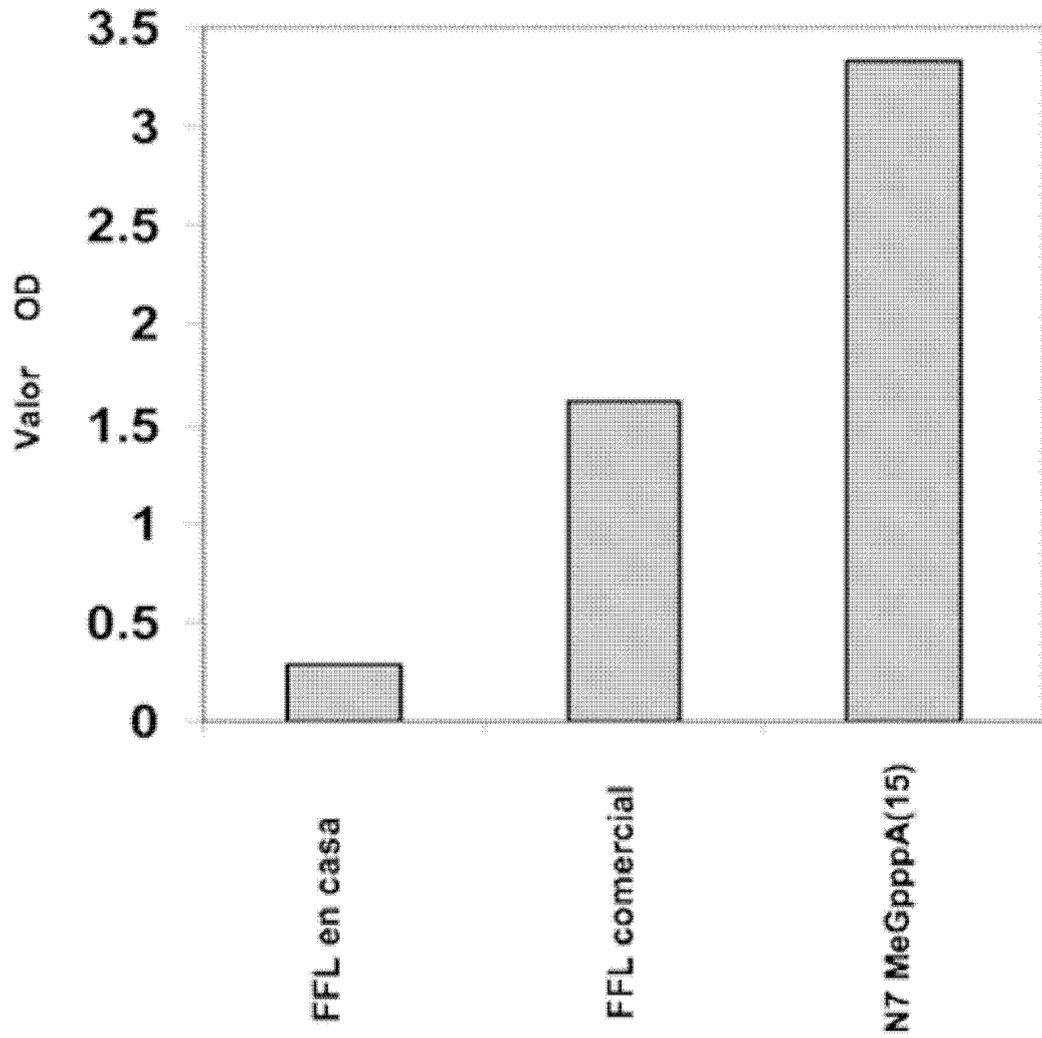


Fig. 5