

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 960**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07** (2010.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2011 PCT/US2011/054617**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12045075**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2011 E 11830061 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2622064**

54 Título: **Nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados y sus usos**

30 Prioridad:

**01.10.2010 US 404413 P**

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

**17.01.2020**

73 Titular/es:

**MODERNATX, INC. (100.0%)  
200 Technology Square  
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 737 960 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados y sus usos

Reivindicación de prioridad

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/404.413, presentada el 1 de octubre de 2010.

Antecedentes

10 Los ARN de origen natural se sintetizan a partir de cuatro ribonucleótidos básicos: ATP, CTP, UTP y GTP, pero pueden contener nucleótidos modificados de forma postranscripcional. Además, se han identificado aproximadamente cien modificaciones de nucleósidos diferentes en el ARN (Rozenski, J, Crain, P y McCloskey, J. (1999). The RNA Modification Database: actualización de 1999. Nucl Acids Res 27: 196-197). El papel de las modificaciones de los nucleósidos en el potencial inmunoestimulador, la estabilidad y la eficiencia de traducción del ARN, y los beneficios consiguientes de esto para mejorar la expresión de proteínas y producir agentes terapéuticos, no está claro.

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

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

25 Kairo Katalin et al - Molecular Therapy, Nature Publishing Group, GB, vol. 16, no. 11, 1 de noviembre de 2008 (2008-11-01), páginas 1833-1840, XP002598556, ISSN: 1525-0024, DOI: 10.1038/MT.2008.200 describe cómo la incorporación de pseudouridina en el ARNm produce un vector no inmunogénico superior con mayor capacidad traduccional y biológica estabilidad.

30 El documento WO 2007/024708A2 describe moléculas de ARN, oligorribonucleótidos y polirribonucleótidos que comprenden pseudouridina o un nucleósido modificado, vectores de terapia génica que comprenden los mismos, métodos para sintetizarlos y métodos para el reemplazo de genes, terapia génica, silenciamiento de transcripción génica y la administración de proteínas terapéuticas al tejido *in vivo*, que comprenden las moléculas, así como los métodos para reducir la inmunogenicidad de moléculas de ARN, oligorribonucleótidos y polirribonucleótidos.

35 Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona un ARN mensajero modificado que comprende un nucleótido modificado, comprendiendo dicho nucleótido modificado una o más modificaciones químicas de un nucleótido natural, en el que el nucleótido modificado reduce la inducción de la respuesta inmune innata celular de una célula al ácido nucleico modificado cuando el ácido nucleico modificado se introduce en la célula, en comparación con la inducción de la respuesta inmune innata celular en una célula inducida por un ácido nucleico no modificado correspondiente, en donde el ARN mensajero tiene una longitud superior a 30 nucleótidos y en donde el 100% de los nucleótidos naturales correspondientes se han reemplazado con:

i. 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina y N1-metil-pseudo-uridina,

ii. 5-metil-citidina y N1-metil-pseudo-uridina, o

45 iii. 25% de N1-metil-pseudo-uridina y 75% de pseudo-uridina.

Otras características ventajosas se definen en las reivindicaciones dependientes.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluidas las definiciones.

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

## Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

20 Las figuras 4E y 4F representan gráficos de barras de una serie de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para G-CSF humano secretado de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* a las 24 horas con cada uno de los ARNmod que codifican hu-G-CSF humano indicados con dosis crecientes.

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

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

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

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

## Descripción detallada

35 La presente descripción proporciona, entre otros, nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados que exhiben una respuesta inmune innata reducida cuando se introducen en una población de células. Los nucleósidos modificados, los nucleótidos modificados y los ácidos nucleicos modificados pueden modificarse químicamente en la cara del surco mayor, interrumpiendo así las principales interacciones del asociado de unión al surco mayor, que causan respuestas inmunes innatas.

40 En general, los ácidos nucleicos no modificados exógenos, particularmente los ácidos nucleicos virales, introducidos en las células inducen una respuesta inmune innata, lo que resulta en la producción de citoquinas e interferón (IFN) y la muerte celular. Sin embargo, es de gran interés para los agentes terapéuticos, diagnósticos, reactivos y para los ensayos biológicos administrar un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN) dentro de una célula, ya sea *in vivo* o *ex vivo*, como para causar la traducción intracelular del ácido nucleico y la producción de la proteína codificada. De particular importancia es el suministro y la función de un ácido nucleico no integrador, ya que los ácidos nucleicos caracterizados por la integración en una célula objetivo son generalmente imprecisos en sus niveles de expresión, son transferibles de manera perjudicial a la progenie y las células vecinas, y tienen el riesgo sustancial de causar mutación. En este documento se proporcionan en parte ácidos nucleicos que codifican polipéptidos útiles capaces de modular la función y/o actividad de una célula, y métodos para fabricar y usar estos ácidos nucleicos y polipéptidos. Como se describe en el presente documento, estos ácidos nucleicos son capaces de reducir la actividad inmune innata de una población de células en las que se introducen, aumentando así la eficiencia de la producción de proteínas en esa población celular. Además, se describen una o más actividades y/o propiedades ventajosas adicionales de los ácidos nucleicos y proteínas de la presente descripción.

Además, los nucleósidos modificados, los nucleótidos modificados y los ácidos nucleicos modificados descritos en el

presente documento pueden modificarse en la cara del surco mayor. Estas modificaciones del surco mayor pueden permitir alteraciones, por ejemplo, una disminución, en la interacción de los nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados con la unión de un asociado del surco de unión.

5 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente divulgación proporciona compuestos que comprenden un nucleótido que puede interrumpir la unión de un asociado que interactúa, por ejemplo, que se une al surco mayor con un ácido nucleico, en donde el nucleótido tiene una menor afinidad de unión a los asociados que interactúan, por ejemplo, se que unen al surco mayor.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona compuestos que comprenden un nucleótido que contiene modificaciones químicas, en el que el nucleótido puede tener una unión alterada a los asociados que interactúan, por ejemplo, que se unen al surco mayor.

Las modificaciones químicas pueden ubicarse en la cara del surco mayor de la nucleobase, y en el que las modificaciones químicas pueden incluir reemplazar o sustituir un átomo de una nucleobase de pirimidina con una amina, un SH, un alquilo (por ejemplo, metilo o etilo), o un halo (por ejemplo, cloro o flúor).

15 Las modificaciones químicas pueden ubicarse en la cara del surco mayor de la nucleobase, y en la que la modificación química puede incluir reemplazar o sustituir un átomo de una nucleobase de pirimidina con una amina, un SH, un metilo o etilo, o un cloro o flúor.

Las modificaciones químicas se pueden ubicar en la fracción de azúcar del nucleótido.

Las modificaciones químicas se pueden ubicar en la cadena de fosfato del nucleótido.

Las modificaciones químicas pueden alterar la electroquímica en la cara del surco mayor del nucleótido.

20 En otro aspecto, la presente descripción proporciona nucleótidos que contienen modificaciones químicas, en las que el nucleótido reduce la respuesta inmune innata celular, en comparación con la respuesta inmune innata celular inducida por un ácido nucleico no modificado correspondiente.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona secuencias de ácido nucleico que comprenden al menos dos nucleótidos, comprendiendo la secuencia de ácido nucleico un nucleótido que interrumpe la unión de un asociado que interactúa con el surco mayor con la secuencia de ácido nucleico, en la que el nucleótido tiene una menor afinidad de unión por al asociado que se une al surco mayor.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un compuesto como se describe en el presente documento.

La composición puede ser una mezcla de reacción.

30 La composición puede ser una composición farmacéutica.

La composición puede ser un cultivo celular.

Las composiciones pueden comprender además una ARN polimerasa y una plantilla de ADNc.

Las composiciones pueden comprender además un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en adenosina, citosina, guanosina y uracilo.

35 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona métodos para sintetizar un ácido nucleico farmacéutico, que comprende proporcionar un ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) que codifica una proteína farmacéutica de interés; seleccionar un nucleótido que se sabe que interrumpe la unión de un asociado que se une al surco mayor con un ácido nucleico, en el que el nucleótido tiene una menor afinidad de unión al asociado de unión al surco mayor; y poner en contacto el ADNc proporcionado y el nucleótido seleccionado con una ARN polimerasa, en  
40 condiciones tales que se sintetice el ácido nucleico farmacéutico.

El ácido nucleico farmacéutico puede ser un ácido ribonucleico (ARN).

45 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona métodos para fabricar una formulación farmacéutica que comprende una proteína secretada fisiológicamente activa, que comprende transfectar una primera población de células humanas con un ácido nucleico farmacéutico producido por los métodos descritos en el presente documento, en los que la proteína secretada es activa sobre una segunda población de células humanas.

La proteína secretada puede ser capaz de interactuar, por ejemplo, unirse, con un receptor en la superficie de al menos una célula presente en la segunda población.

La proteína secretada puede ser un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

La segunda población puede contener células de mieloblásticas que expresan al receptor del G-CSF.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona métodos para fabricar una formulación farmacéutica que comprende células humanas que comprenden una proteína secretada fisiológicamente activa, que comprende transfectar una primera población de células humanas con un ácido nucleico farmacéutico producido por los métodos descritos en el presente documento, en los que la proteína secretada es activa en una segunda población de células humanas.

#### Definiciones

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

Se pretende además que los compuestos de la presente divulgación sean estables. Como se usa en el presente documento, "estable" se refiere a un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza de una mezcla de reacción, y preferiblemente capaz de formularse en un agente terapéutico eficaz.

Se aprecia además que ciertas características de la presente divulgación, que se describen, para mayor claridad, en un contexto separado, también pueden proporcionarse en combinación. Por el contrario, varias características de la presente divulgación que, por brevedad, se describen en combinación, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado que es de cadena lineal o ramificado. Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo (Me), etilo (Et), propilo (por ejemplo, n-propilo e isopropilo), butilo (por ejemplo, n-butilo, isobutilo, t-butilo), pentilo (por ejemplo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo), y similares. Un grupo alquilo puede contener de 1 a aproximadamente 20, de 2 a aproximadamente 20, de 1 a aproximadamente 12, de 1 a aproximadamente 8, de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono.

Como se usa en el presente documento, "alqueno" se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen etenilo, propenilo y similares.

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

Como se usa en el presente documento, "alquino" se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquino incluyen etinilo, propinilo y similares.

Como se usa en el presente documento, "arilo" se refiere a hidrocarburos aromáticos monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, que tienen 2, 3 o 4 anillos condensados) tales como, por ejemplo, fenilo, naftilo, antraceno, fenantreno, indanilo, indenilo y similares. Los grupos arilo pueden tener de 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono.

Como se usa en el presente documento, "halo" o "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

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

Como se usa en el presente documento, "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. "Animal" puede referirse a los humanos en cualquier etapa de desarrollo. Alternativamente, "animal" puede referirse a animales no humanos en cualquier etapa de desarrollo. El animal no humano puede ser un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate o un cerdo). Los animales incluyen, pero no están limitados a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y gusanos. El animal puede ser un animal transgénico, un animal manipulado genéticamente o un clon.

Como se usa en este documento, "aproximadamente" o "o alrededor de", cuando se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. El término "aproximadamente" o "o alrededor de" puede referirse a un intervalo 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 establezca o sea evidente, a partir del contexto (excepto cuando dicho número supere el 100% de un valor posible).

Como se usa en el presente documento, "asociado con", "conjugado", "enlazado", "unido" y "atado", cuando se usa con respecto a dos o más fracciones, significa que las fracciones están asociadas físicamente o conectadas entre sí, ya sea directamente o a través de una o más fracciones adicionales que sirven como un agente de enlace, para formar una estructura que sea suficientemente estable para que las fracciones permanezcan asociadas físicamente en las

condiciones en las que se usa la estructura, por ejemplo, condiciones fisiológicas.

5 Como se usa en el presente documento, "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier sustancia que tiene actividad en un sistema biológico y/u organismo. Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera biológicamente activa. Cuando un ácido nucleico es biológicamente activo, una porción de ese ácido nucleico que comparte al menos una actividad biológica del ácido nucleico completo se denomina típicamente como una porción "biológicamente activa".

10 Como se usa en el presente documento, "conservado" se refiere a residuos de nucleótidos o de aminoácidos de una secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente, que son aquellos que aparecen inalterados en la misma posición de dos o más secuencias relacionadas que se comparan. Los nucleótidos o aminoácidos que están relativamente conservados son aquellos que se conservan entre más secuencias relacionadas que los nucleótidos o aminoácidos que aparecen en otras partes de las secuencias. Se puede decir que dos o más secuencias están "completamente conservadas" si son 100% idénticas entre sí. Se puede decir que dos o más secuencias están "altamente conservadas" si son al menos un 70% idénticas, al menos un 80% idénticas, al menos un 90% idénticas, o al menos un 95% idénticas entre sí. Se puede decir que dos o más secuencias están "altamente conservadas" si son aproximadamente el 70% idénticas, aproximadamente el 80% idénticas, aproximadamente el 90% idénticas, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 98%, o aproximadamente el 99% idénticas entre sí. Se puede decir que dos o más secuencias están "conservadas" si son al menos un 30% idénticas, al menos un 40% idénticas, al menos un 50% idénticas, al menos un 60% idénticas, al menos un 70% idénticas, al menos un 80% idénticas, al menos el 90% idéntico, o al menos el 95% idéntico entre sí. Se puede decir que dos o más secuencias están "conservadas" si son aproximadamente 30% idénticas, aproximadamente 40% idénticas, aproximadamente 50% idénticas, aproximadamente 60% idénticas, aproximadamente 70% idénticas, aproximadamente 80% idénticas, aproximadamente 90% idénticas aproximadamente el 95% idénticas, aproximadamente el 98% idénticas, o aproximadamente el 99% idénticas entre sí.

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

30 Como se usa en el presente documento, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en la que exhibe una propiedad y/o actividad por la cual se caracteriza.

Como se usa en este documento, "*in vitro*" se refiere a eventos que ocurren en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en un cultivo celular, en una placa de Petri, etc., en lugar de dentro de un organismo (por ejemplo, animal, planta, o microbio).

35 Como se usa en este documento, "*in vivo*" se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo (por ejemplo, animal, planta o microbio).

40 Como se usa en este documento, "aislado" se refiere a una sustancia o entidad que ha sido (1) separada de al menos algunos de los componentes con los que estaba asociada cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza o en un entorno experimental), y/o (2) producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de al menos aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% o más de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. Los agentes aislados pueden ser más de aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o más de aproximadamente el 99% de pureza. Como se usa en este documento, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes.

50 Como se usa en este documento, "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo al que se puede administrar una composición de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, con fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y seres humanos) y/o plantas.

55 Como se usa en el presente documento, "sustancialmente" se refiere a la afeción cualitativa de exhibir una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Una persona con experiencia ordinaria en las artes biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, se completan y/o se completan totalmente, logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en este documento para capturar la posible falta de integridad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

Un individuo que "padece de" una enfermedad, trastorno y/o afeción ha sido diagnosticado con o muestra uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afeción.

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

Como se usa en este documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente a administrar (por ejemplo, ácido nucleico, fármaco, agente terapéutico, agente de diagnóstico, agente profiláctico, etc.) que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que sufre o es susceptibles a una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, mejorar los síntomas, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de la enfermedad, el trastorno o la afección.

Como se usa en el presente documento, "factor de transcripción" se refiere a una proteína de unión a ADN que regula la transcripción de ADN en ARN, por ejemplo, por activación o represión de la transcripción. Algunos factores de transcripción afectan la regulación de la transcripción solo, mientras que otros actúan en concierto con otras proteínas. Algunos factores de transcripción pueden activar y reprimir la transcripción bajo ciertas condiciones. En general, los factores de transcripción se unen a una secuencia objetivo específica o secuencias muy similares a una secuencia de consenso específica en una región reguladora de un gen objetivo. Los factores de transcripción pueden regular la transcripción de un gen objetivo solo o en un complejo con otras moléculas.

Como se usa en el presente documento, "tratar" se refiere a aliviar, mejorar, retrasar el inicio, inhibir la progresión de, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. Por ejemplo, "tratar" el cáncer puede referirse a inhibir la supervivencia, el crecimiento y/o la diseminación de un tumor. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no muestre signos de una enfermedad, trastorno o afección y/o a un sujeto que muestre solo signos tempranos de una enfermedad, trastorno o afección con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad, trastorno y/o afección. El tratamiento puede comprender el suministro de una proteína asociada con un ácido nucleico terapéuticamente activo a un sujeto que lo necesite.

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

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

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

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

Los compuestos de la presente divulgación se pueden aislar sustancialmente. Por "sustancialmente aislado" se entiende que el compuesto está al menos parcial o sustancialmente separado del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en el compuesto de la presente divulgación. La separación sustancial puede incluir composiciones que contengan al menos aproximadamente el 50%,

al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 97% o al menos aproximadamente el 99% en peso del compuesto de la presente divulgación, o sal del mismo. Los métodos para aislar compuestos y sus sales son rutinarios en la técnica.

- 5 Los compuestos de la presente divulgación, y las sales de los mismos, también se pueden preparar en combinación con un disolvente o moléculas de agua para formar solvatos e hidratos por métodos de rutina.

La presente descripción también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica convirtiendo una fracción ácido o base existente en su forma de sal. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación incluyen las sales convencionales no tóxicas del compuesto original formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente divulgación se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene una fracción básica o ácida por métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de base o ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> edición, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1985, página 1418 y Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

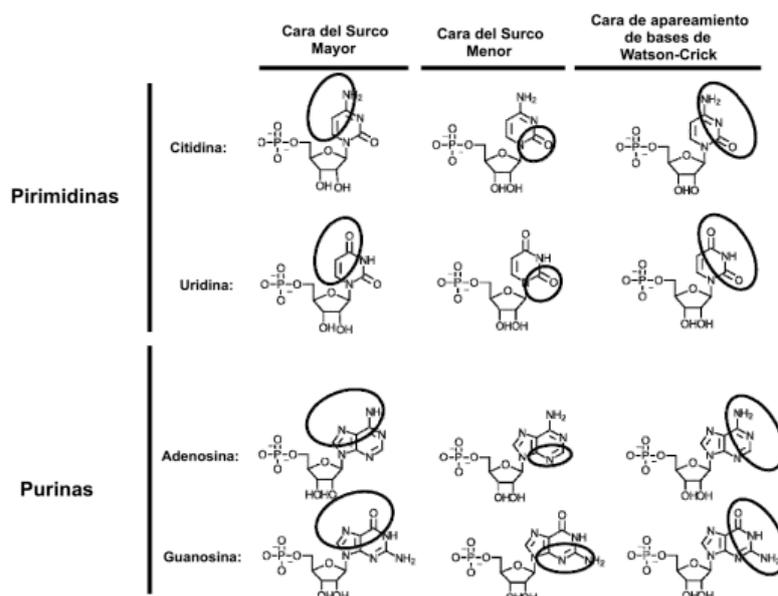
La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, en proporción con una relación razonable de riesgo/beneficio.

La presente descripción también incluye profármacos de los compuestos descritos en el presente documento. Como se usa en este documento, "profármacos" se refiere a cualquier portador, típicamente unido covalentemente, que libera el fármaco principal activo cuando se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos se pueden preparar modificando los grupos funcionales presentes en los compuestos de tal manera que las modificaciones se escindan, ya sea en la manipulación rutinaria o *in vivo*, a los compuestos originales. Los profármacos incluyen compuestos en los que los grupos hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo están unidos a cualquier grupo que, cuando se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, acetato, formiato y derivados de benzoato de grupos funcionales alcohol y amina en los compuestos de la presente divulgación. La preparación y el uso de profármacos se discuten en T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 de la A.C.S. Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

#### Nucleósidos y nucleótidos modificados

La presente divulgación proporciona nucleósidos y nucleótidos modificados. Como se describe en el presente documento, "nucleósido" se define como un compuesto que contiene una molécula de azúcar de cinco carbonos (una pentosa o ribosa) o un derivado de la misma, y una base orgánica, purina o pirimidina, o un derivado de la misma. Como se describe en el presente documento, "nucleótido" se define como un nucleósido que consiste en un grupo fosfato. Los nucleósidos y nucleótidos descritos en el presente documento generalmente se modifican químicamente en la cara del surco mayor. Las modificaciones químicas del surco mayor pueden incluir un grupo amino, un grupo tiol, un grupo alquilo o un grupo halo.

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



5 Los nucleósidos modificados pueden incluir al ribonucleósido piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-desaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-pseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina y 4-metoxi-2-tio-pseudouridina.

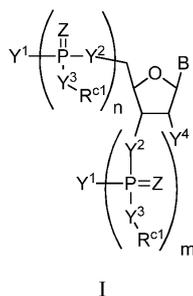
10 Los nucleósidos modificados pueden incluir 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrol-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina.

15 Los nucleósidos modificados pueden incluir 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-desaza-adenina, 7-desaza-8-aza-adenina, 7-desaza-2-aminopurina, 7-desaza-8-aza-2-aminopurina, 7-desaza-2,6-diaminopurina, 7-desaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metil-tio-N6-(cis-hidroxi-isopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, N-6-metil-tio-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metil-tio-adenina, y 2-metoxi-adenina.

25 Los nucleósidos modificados pueden incluir inosina, 1-metil-inosina, wiosina, wibutosina, 7-desaza-guanosina, 7-desaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-desaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metil-guanosina, N2-metil-guanosina, N2,N2-dimetil-guanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

El nucleótido puede modificarse en la cara del surco mayor y puede incluir el reemplazo del hidrógeno en C-5 de uracilo con un grupo metilo o un grupo halo.

El nucleósido y el nucleótido pueden ser un compuesto de fórmula I:



donde:

Z es O o S;

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

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

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

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

n es 0, 1, 2 o 3;

m es 0, 1, 2 o 3;

10 B es una nucleobase;

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

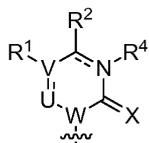
R<sup>a1</sup> y R<sup>b1</sup> son cada uno independientemente H o un contraión; y

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

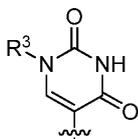
o -Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> es alcoxi C<sub>1-20</sub>, -O-alquenilo C<sub>2-20</sub>, o -O-alquinilo C<sub>1-20</sub>;

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

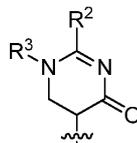
B puede ser un nucleobase de Fórmula II-a, 11-b, o II-c:



II-a



II-b



II-c

donde:

20  $\text{---}$  denota un enlace sencillo o doble;

X es O o S;

U y W son cada uno independientemente C o N;

V es O, S, C o N;

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

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

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

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

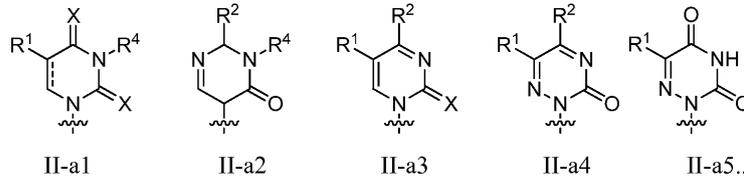
R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1-20</sub>;

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

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

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

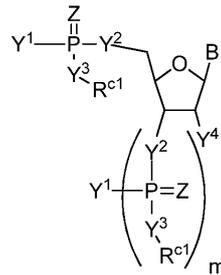
B puede ser una nucleobase de Fórmula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:



B puede ser una nucleobase seleccionada del grupo que consiste en citosina, guanina, adenina y uracilo.

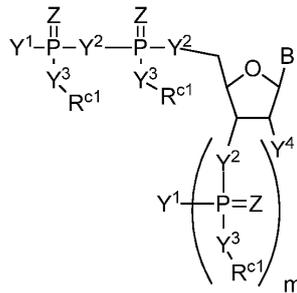
B puede ser una pirimidina o un derivado de la misma.

5 El nucleótido puede ser un compuesto de Fórmula I-a:



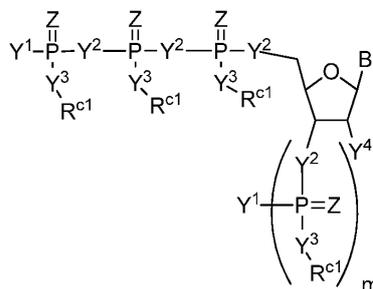
I-a.

El nucleótido puede ser un compuesto de Fórmula I-b:



I-b.

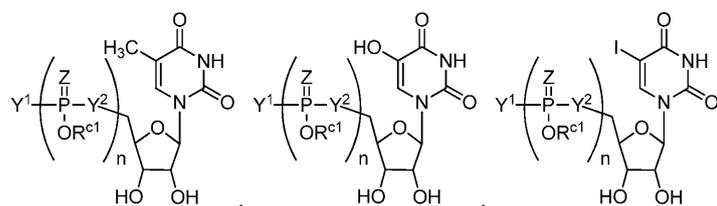
El nucleótido puede ser un compuesto de Fórmula I-c:

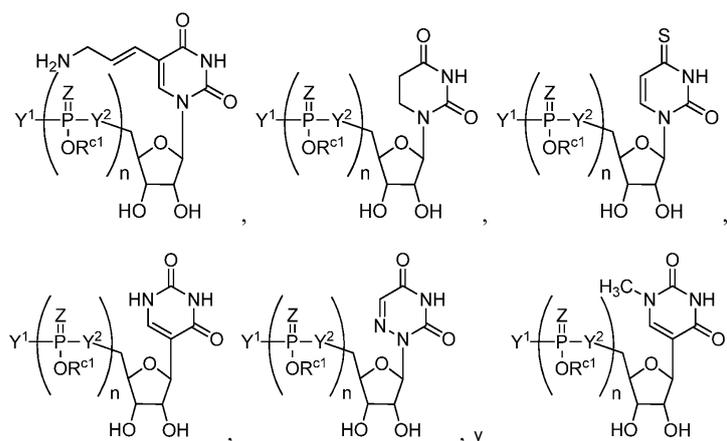


I-c.

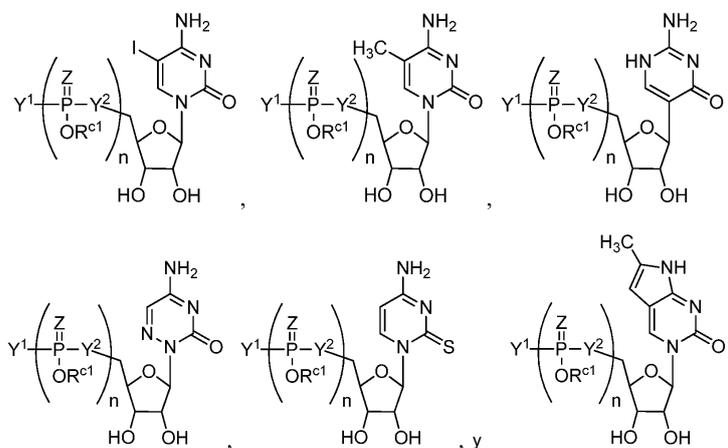
10

El nucleótido se puede seleccionar del grupo que consiste en:



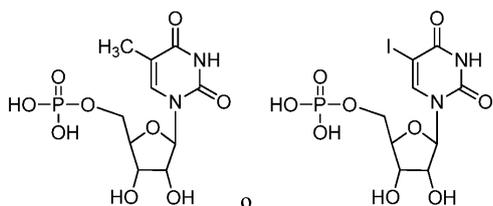


El nucleótido se puede seleccionar del grupo que consiste en:



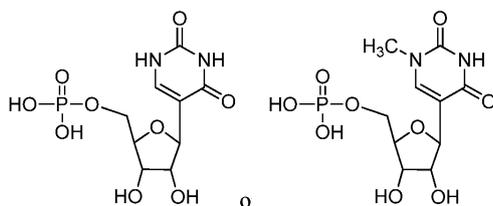
5

El nucleótido modificado puede ser:



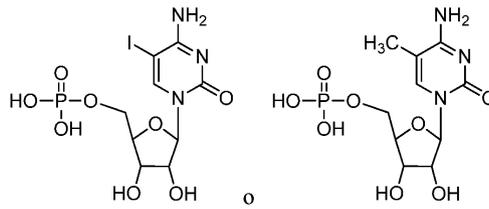
La modificación química del surco mayor puede incluir el reemplazo del grupo C-H en C-5 con un grupo -NH- o un grupo -NH(CH<sub>3</sub>)-.

10 Por ejemplo, el nucleótido modificado puede ser:



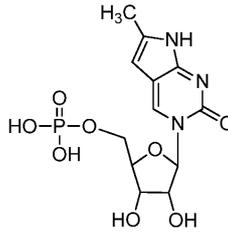
La modificación química del surco mayor puede incluir el reemplazo del hidrógeno en C-5 de la citosina con un grupo halo o un grupo metilo.

Por ejemplo, el nucleótido modificado puede ser:



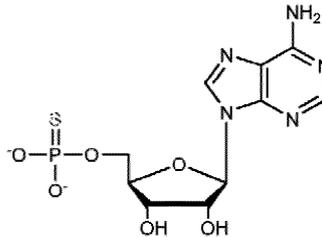
La modificación química del surco mayor puede incluir un anillo fusionado que está formado por el NH<sub>2</sub> en la posición C-4 y el átomo de carbono en la posición C-5.

Por ejemplo, el nucleótido modificado puede ser:

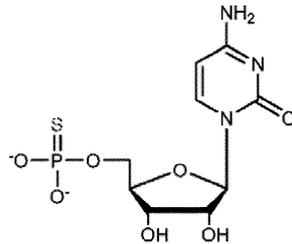


5

El nucleótido modificado es 5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina, 5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-uridina o 5'-O-(1-tiofosfato)-seudouridina.

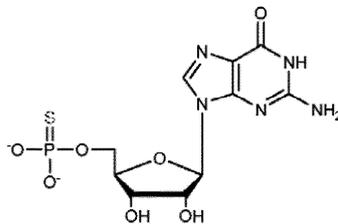


5'-O-(1-tiofosfato)-adenosina

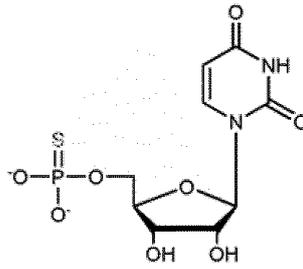


10

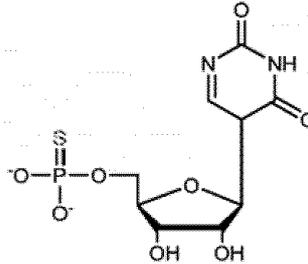
5'-O-(1-tiofosfato)-citidina



5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina



5'-O-(1-tiofosfato)-uridina



5'-O-(1-tiofosfato)-seudouridina

- 5 La fracción fosfato sustituida con  $\alpha$ -tio se proporciona para conferir estabilidad a los polímeros de ARN y ADN a través de los enlaces del esqueleto de fosforotioato no natural. El ADN y ARN de fosforotioato tienen una mayor resistencia a las nucleasas y, posteriormente, una vida media más larga en un entorno celular. Se espera que los ácidos nucleicos unidos a fosforotioato también reduzcan la respuesta inmune innata a través de una unión/activación más débil de las moléculas inmunes innatas celulares.
- 10 Otros ejemplos de nucleótidos modificados y combinaciones de nucleótidos modificados se proporcionan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Nucleótido modificado	Combinación de nucleótidos modificados
6-aza-citidina	$\alpha$ -tio-citidina/5-yodo-uridina
2-tio-citidina	$\alpha$ -tio-citidina/N1-metil-pseudo-uridina
$\alpha$ -tio-citidina	$\alpha$ -tio-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
Pseudo-iso-citidina	$\alpha$ -tio-citidina/5-metil-uridina
5-aminoalil-uridina	$\alpha$ -tio-citidina/pseudo-uridina
5-yodo-uridina	Pseudo-iso-citidina/5-yodo-uridina
N1-metil-pseudouridina	Pseudo-iso-citidina/N1-metil-pseudo-uridina
5,6-dihidrouridina	Pseudo-iso-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
$\alpha$ -tio-uridina	Pseudo-iso-citidina/5-metil-uridina
4-tio-uridina	Pseudo-iso-citidina/Pseudo-uridina
6-aza-uridina	Pirroló-citidina
5-hidroxi-uridina	Pirroló-citidina/5-yodo-uridina
Desoxi-timidina	Pirroló-citidina/N1-metil-pseudo-uridina
Pseudo-uridina	Pirroló-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina

Inosina	Pirroló-citidina/5-metil-uridina
$\alpha$ -tio-guanosina	Pirroló-citidina/Pseudo-uridina
8-oxo-guanosina	5-metil-citidina/5-yodo-uridina
O6-metil-guanosina	5-metil-citidina/N1-metil-pseudo-uridina
7-desaza-guanosina	5-metil-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
Sin modificación	5-metil-citidina/5-metil-uridina
N1-metil-adenosina	5-metil-citidina/Pseudo-uridina
2-amino-6-cloro-purina	5-metil-citidina
N6-metil-2-aminopurina	25% de Pseudo-iso-citidina
6-Cloro-purina	25% de N1-metil-pseudo-uridina
N6-metil-adenosina	25% de N1-Metil-pseudo-uridina/75% de pseudo-uridina
$\alpha$ -tio-adenosina	5-metil-uridina
8-azido-adenosina	5-yodo-citidina
7-desaza-adenosina	

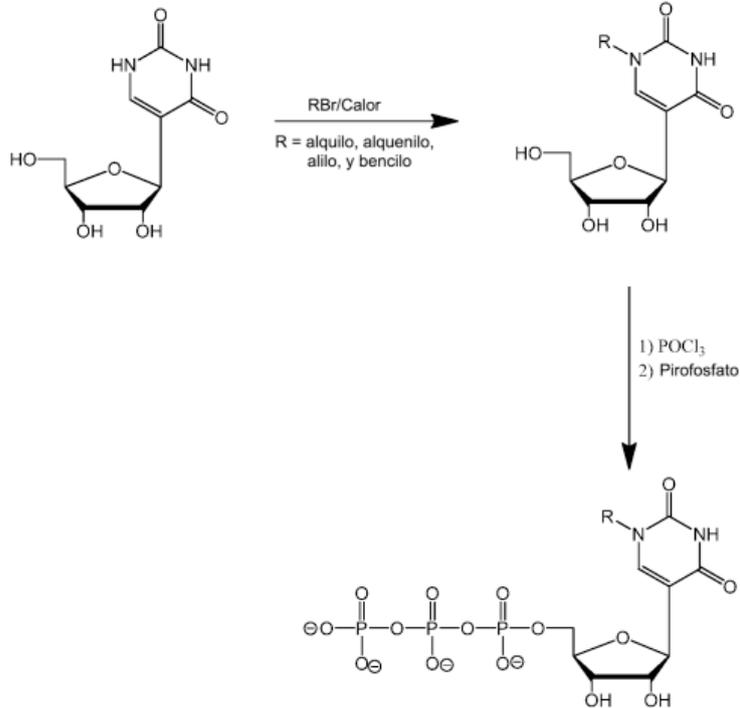
#### Síntesis de nucleótidos modificados

- Los nucleósidos y los nucleótidos modificados descritos en el presente documento pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes métodos y procedimientos generales. Se entiende que cuando se dan condiciones de proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactantes, disolventes, presiones, etc.) también se pueden usar otras condiciones de proceso a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos particulares o el disolvente utilizado, pero un experto en la técnica puede determinar dichas condiciones mediante procedimientos de optimización de rutina.
- Los procesos descritos en el presente documento pueden monitorizarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto se puede monitorizar por medios espectroscópicos, como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (por ejemplo,  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopia infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible), espectrometría de masas o por cromatografía tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina.
- La preparación de nucleósidos y nucleótidos modificados puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. El experto en la técnica puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados. La química de los grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en Greene, et al., *Protective Groups in Organic Syntesis*, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.
- Las reacciones de los procesos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en disolventes adecuados, que pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Los disolventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los productos intermedios o productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, las temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del disolvente hasta la temperatura de ebullición del disolvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, se pueden seleccionar disolventes adecuados para una etapa de reacción particular. La resolución de mezclas racémicas de nucleósidos y nucleótidos modificados puede llevarse a cabo por cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica. Un método de ejemplo incluye la recristalización fraccionada utilizando un "ácido de resolución quiral" que es un ácido orgánico formador de sal ópticamente activo. Los agentes de resolución adecuados para los métodos de recristalización fraccionaria son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L del ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos canforsulfónicos ópticamente activos. La resolución de mezclas racémicas también se puede llevar a cabo mediante elución en una columna empaquetada con un agente de resolución ópticamente activo (por ejemplo, dinitrobenzoilfenilglicina). El experto en la técnica puede determinar la composición de disolvente

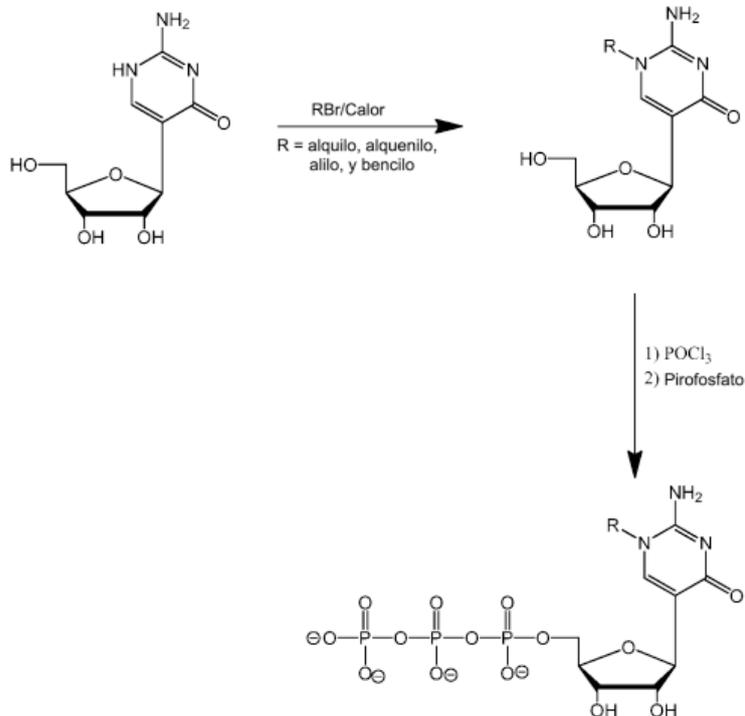
de elución adecuada.

Los ejemplos de síntesis de nucleótidos modificados se proporcionan a continuación en los Esquemas 1 y 2.

**Esquema 1**



**Esquema 2**



- 5 Los nucleósidos y nucleótidos modificados también se pueden preparar de acuerdo con los métodos de síntesis descritos en Ogata et al. *Journal of Organic Chemistry* 74: 2585-2588, 2009; Purmal et al. *Nucleic Acids Research* 22 (1): 72-78, 1994; Fukuhara et al. *Biochemistry* 1 (4): 563-568, 1962; y Xu et al. *Tetrahedron* 48 (9): 1729-1740, 1992, cada uno de los cuales se incorporan por referencia en su totalidad.

## Ácidos nucleicos modificados

La presente divulgación proporciona ácidos nucleicos, que incluyen ARN como los ARNm que contienen uno o más nucleósidos modificados (denominados "ácidos nucleicos modificados") o nucleótidos como se describe en el presente documento, que tienen propiedades útiles que incluyen la disminución significativa o la falta de una inducción sustancial de la respuesta inmune innata de una célula en la que se introduce el ARNm, o la supresión de la misma. Debido a que estos ácidos nucleicos modificados mejoran la eficiencia de la producción de proteínas, la retención intracelular de los ácidos nucleicos y la viabilidad de las células contactadas, además de poseer una inmunogenicidad reducida, de estos ácidos nucleicos en comparación con los ácidos nucleicos no modificados, los que tienen estas propiedades se denominan "ácidos nucleicos mejorados".

Además, la presente divulgación proporciona ácidos nucleicos, que tienen una menor afinidad de unión a un asociado que interactúa, por ejemplo, se une al surco mayor. Por ejemplo, los ácidos nucleicos están formados por al menos un nucleótido que se ha modificado químicamente en la cara del surco mayor como se describe aquí.

El término "ácido nucleico", en su sentido más amplio, incluye cualquier compuesto y/o sustancia que sea o pueda incorporarse en una cadena de oligonucleótido. Los ejemplos de ácidos nucleicos para uso de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, uno o más de ADN, ARN incluyendo ARNm mensajero (ARNm), híbridos de los mismos, agentes que inducen ARNi, agentes de ARNi, ARNpi, ARNph, ARNmi, ARN antisentido, ribozimas, ADN catalítico, ARN que inducen la formación de hélices triples, aptámeros, vectores, etc., se describen en detalle en este documento.

Se proporcionan ácidos nucleicos modificados que contienen una región traducible y una, dos o más de dos modificaciones de nucleósidos diferentes. El ácido nucleico modificado puede exhibir una degradación reducida en una célula en la que se introduce el ácido nucleico, en relación con un ácido nucleico no modificado correspondiente. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen los ácidos ribonucleicos (ARN), los ácidos desoxirribonucleicos (ADN), los ácidos nucleicos de treosa (TNA), los ácidos nucleicos de glicol (GNA), los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o un híbrido de los mismos. El ácido nucleico modificado puede ser ARN mensajero (ARNm). Como se describe en el presente documento, los ácidos nucleicos de la presente divulgación no inducen sustancialmente una respuesta inmune innata de una célula en la que se introduce el ARNm.

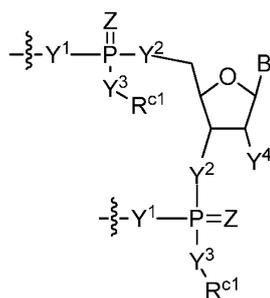
Puede ser deseable degradar intracelularmente un ácido nucleico modificado introducido en la célula, por ejemplo, si se desea una sincronización precisa de la producción de proteínas. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico modificado que contiene un dominio de degradación, que es capaz de actuar de forma dirigida dentro de una célula.

Otros componentes del ácido nucleico son opcionales, y pueden ser beneficiosos. Por ejemplo, se proporciona una región no traducida 5' (UTR) y/o una 3' UTR, en la que cualquiera o ambas pueden contener independientemente una o más modificaciones de nucleósidos diferentes. Las modificaciones de nucleósidos también pueden estar presentes en la región traducible. También se proporcionan ácidos nucleicos que contienen una secuencia de Kozak.

Adicionalmente, se proporcionan ácidos nucleicos que contienen una o más secuencias de nucleótidos intrónicas capaces de ser escindidas del ácido nucleico.

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

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden comprender un compuesto de Fórmula I-d:



I-d

donde:

Z es O o S;

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

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

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

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

B es una nucleobase;

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

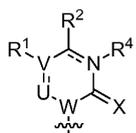
R<sup>a1</sup> y R<sup>b1</sup> son cada uno independientemente H o un contraión; y

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

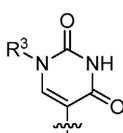
o -Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> es alcoxi C<sub>1-20</sub>, -O-alqueno C<sub>2-20</sub>, u -O-alquino C<sub>1-20</sub>;

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

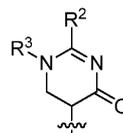
B puede ser un nucleobase de Fórmula II-a, II-b, o II-c:



II-a



II-b



II-c

donde:

denota un enlace sencillo o doble;

- 20 X es O o S;

U y W son cada uno independientemente C o N;

V es O, S, C o N;

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

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

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

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

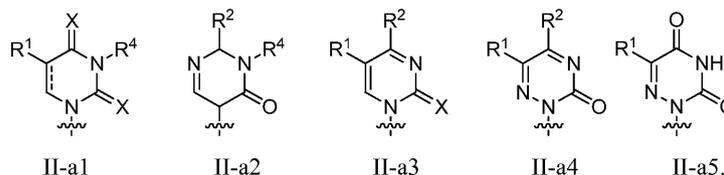
R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1-20</sub>;

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

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

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

B puede ser una nucleobase de Fórmula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:



10 Al menos el 25% de las citoquinas se pueden reemplazar por un compuesto de Fórmula I-a (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 100%).

15 Al menos el 25% de los uracilos puede reemplazarse por un compuesto de Fórmula I-a (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 100%).

20 Al menos el 25% de las citoquinas y el 25% de los uracilos pueden reemplazarse por un compuesto de Fórmula I-a (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 100%).

El ácido nucleico puede ser traducible.

Asociados que interactúan con el surco mayor

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

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

40 contienen el dominio HIN-200 o las proteínas que contienen el dominio de helicasa.

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

45 El término "respuesta inmune innata" incluye una respuesta celular a ácidos nucleicos exógenos, incluyendo ácidos nucleicos monocatenarios, generalmente de origen viral o bacteriano, que involucra la inducción de la expresión y liberación de citoquinas, particularmente los interferones o la muerte celular. La síntesis de proteínas también se reduce durante la respuesta inmune celular innata. Si bien es ventajoso eliminar la respuesta inmune innata en una célula, la presente divulgación proporciona mRNA modificados que reducen sustancialmente la respuesta inmune, incluida la señalización de interferón, sin eliminar por completo esa respuesta. La respuesta inmune puede reducirse en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,9%, o más del 99,9% en comparación a la respuesta inmune inducida por un ácido nucleico no modificado correspondiente. Dicha reducción se puede medir

mediante la expresión o el nivel de actividad de los interferones de tipo 1 o la expresión de genes regulados por el interferón, tal como los receptores tipo Toll (por ejemplo, TLR7 y TLR8). La reducción de la respuesta inmune innata también puede medirse por la disminución de la muerte celular después de una o más administraciones de ARN modificados a una población celular; por ejemplo, la muerte celular es 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95%, o más del 95% menor que la frecuencia de muerte celular observada con un ácido nucleico no modificado correspondiente. Además, la muerte celular puede afectar a menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01% o menos del 0,01% de las células en contacto con los ácidos nucleicos modificados.

La presente descripción proporciona la introducción repetida (por ejemplo, la transfección) de ácidos nucleicos modificados en una población de células objetivo, por ejemplo, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La etapa de ponerse en contacto con la población celular se puede repetir una o más veces (tal como dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco veces). La etapa de poner en contacto la población celular con los ácidos nucleicos modificados puede repetirse varias veces, de manera que se logre una eficiencia predeterminada de traducción de proteínas en la población celular. Dada la reducida citotoxicidad de la población de células objetivo proporcionada por las modificaciones del ácido nucleico, tales transfecciones repetidas se pueden lograr en una amplia gama de tipos de células.

#### Variantes del polipéptido

Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes, que tienen una cierta identidad con una secuencia polipeptídica de referencia. El término "identidad" tal como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más péptidos, según se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre péptidos, según lo determinado por el número de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la menor de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si las hay) abordadas por un modelo matemático o programa informático en particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de los péptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing:

Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence

Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

La variante de polipéptido puede tener la misma actividad o una actividad similar a la del polipéptido de referencia. Alternativamente, la variante tiene una actividad alterada (por ejemplo, aumentada o disminuida) con respecto a un polipéptido de referencia. En general, las variantes de un polinucleótido o polipéptido particular de la presente divulgación tendrán al menos aproximadamente el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con ese polinucleótido o polipéptido de referencia particular según lo determinado por los programas y parámetros de alineación de secuencias descritos en este documento y conocidos para los expertos en la técnica.

Como reconocen los expertos en la materia, los fragmentos de proteínas, los dominios de proteínas funcionales y las proteínas homólogas también se consideran dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, en este documento se proporciona cualquier fragmento de proteína de una proteína de referencia (es decir, una secuencia de polipéptidos al menos un residuo de aminoácido más corto que una secuencia de polipéptidos de referencia pero, por lo demás, idéntico) 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 aminoácidos de longitud. En otro ejemplo, cualquier proteína que incluya un tramo de aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, o aproximadamente 100 aminoácidos que sea aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 100% idéntico a cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento pueden utilizarse de acuerdo con la presente divulgación. Una secuencia de proteína para ser utilizada de acuerdo con la presente divulgación puede incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mutaciones como se muestra en cualquiera de las secuencias proporcionadas o referenciadas en este documento.

#### Bibliotecas de polipéptidos

También se proporcionan bibliotecas de polinucleótidos que contienen modificaciones de nucleósidos, en las que los polinucleótidos contienen individualmente una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, tal como un anticuerpo, un asociado de unión a proteínas, una proteína de armazón y otros polipéptidos conocidos en la técnica. Preferiblemente, los polinucleótidos son ARNm en una forma adecuada para la introducción directa en un huésped de célula objetivo, que a su vez sintetiza el polipéptido codificado.

Se pueden producir y probar múltiples variantes de una proteína, cada una con diferentes modificaciones de aminoácidos, para determinar la mejor variante en términos de farmacocinética, estabilidad, biocompatibilidad y/o actividad biológica, o una propiedad biofísica tal como el nivel de expresión. Dicha biblioteca puede contener  $10^1$ ,  $10^2$ ,

$10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  o más de  $10^9$  variantes posibles (incluidas sustituciones, eliminaciones de uno o más residuos e inserción de uno o más residuos).

#### Complejos de polipéptido-ácido nucleico

5 La traducción de proteínas adecuada implica la agregación física de varios polipéptidos y ácidos nucleicos asociados con el ARNm. La presente descripción proporciona complejos de proteína-ácido nucleico, que contienen un ARNm traducible que tiene una o más modificaciones de nucleósidos (por ejemplo, al menos dos modificaciones de nucleósidos diferentes) y uno o más polipéptidos unidos al ARNm. Generalmente, las proteínas se proporcionan en una cantidad eficaz para prevenir o reducir una respuesta inmune innata de una célula en la que se introduce el complejo.

#### 10 Ácidos nucleicos modificados no traducibles

Como se describe en el presente documento, se proporcionan los ARNm que tienen secuencias que son sustancialmente no traducibles. Dicho ARNm es eficaz como vacuna cuando se administra a un sujeto mamífero.

15 También se proporcionan ácidos nucleicos modificados que contienen una o más regiones no codificantes. Dichos ácidos nucleicos modificados generalmente no se traducen, pero son capaces de unirse y secuestrar uno o más componentes de la maquinaria de traducción, tal como una proteína ribosomal o un ARN de transferencia (ARNt), reduciendo así la expresión de proteínas en la célula. El ácido nucleico modificado puede contener un ARN pequeño nucleolar (ARNpnu), un micro ARN (miARN), un ARN pequeño interferente (ARNpi) o un ARN que interacciona con Piwi (ARNip).

#### Síntesis de ácidos nucleicos modificados

20 Los ácidos nucleicos para uso de acuerdo con la presente divulgación pueden prepararse de acuerdo con cualquier técnica disponible que incluye, pero no se limita a síntesis química, síntesis enzimática, que generalmente se denomina transcripción *in vitro*, escisión enzimática o química de un precursor más largo, etc. Los métodos para sintetizar ARN son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gait, MJ (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; y Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in Molecular Biology*, v. 288 (Clifton, NJ) Totowa, NJ: Humana Press, 2005; ambos de los cuales se incorporan aquí como referencia).

30 Los nucleósidos y nucleótidos modificados descritos en el presente documento pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes métodos y procedimientos generales. Se entiende que cuando se dan condiciones de proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactantes, disolventes, presiones, etc.) también se pueden usar otras condiciones de proceso a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos particulares o el disolvente utilizados, pero un experto en la técnica puede determinar dichas condiciones mediante procedimientos de optimización de rutina.

35 Los procesos descritos en el presente documento pueden monitorizarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto se puede monitorizar por medios espectroscópicos, como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (por ejemplo,  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopia infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, UV-visible), o espectrometría de masas, o por cromatografía tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina.

40 La preparación de nucleósidos y nucleótidos modificados puede implicar la protección y desprotección de diversos grupos químicos. El experto en la técnica puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores apropiados. La química de los grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en Greene, et al., *Protective Groups in Organic Syntesis*, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

45 Las reacciones de los procesos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en disolventes adecuados, que pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Los disolventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los compuestos intermedios o productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, las temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del disolvente hasta la temperatura de ebullición del disolvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un disolvente o una mezcla de más de un disolvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, se pueden seleccionar disolventes adecuados para una etapa de reacción particular.

55 La resolución de mezclas racémicas de nucleósidos y nucleótidos modificados puede llevarse a cabo por cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de método incluye la recristalización fraccionada utilizando un "ácido de resolución quiral" que es un ácido orgánico formador de sal ópticamente activo. Los agentes de resolución adecuados para los métodos de recristalización fraccionaria son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L del ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos canforsulfónicos ópticamente activos. La resolución de mezclas

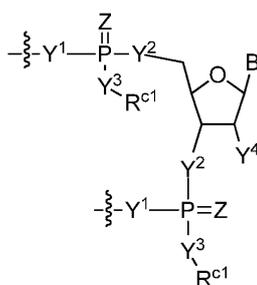
racémicas también se puede llevar a cabo mediante elución en una columna empaquetada con un agente de resolución ópticamente activo (por ejemplo, dinitrobenzoilfenilglicina). El experto en la técnica puede determinar la composición adecuada del disolvente de elución. Los ácidos nucleicos modificados no necesitan modificarse uniformemente a lo largo de toda la longitud de la molécula. Pueden existir diferentes modificaciones de nucleótidos y/o estructuras del esqueleto en varias posiciones en el ácido nucleico. Un experto en la técnica apreciará que los análogos de nucleótidos u otras modificaciones pueden ubicarse en cualquier posición o posiciones de un ácido nucleico, de manera que la función del ácido nucleico no disminuya sustancialmente. Una modificación también puede ser una modificación terminal de 5' o 3'. Los ácidos nucleicos pueden contener como mínimo uno y como máximo 100% de nucleótidos modificados, o cualquier porcentaje intermedio, tal como al menos 5% de nucleótidos modificados, al menos 10% de nucleótidos modificados, al menos 25% de nucleótidos modificados, al menos 50% de nucleótidos modificados, al menos 80% de nucleótidos modificados, o al menos 90% de nucleótidos modificados. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden contener una pirimidina modificada, tal como uracilo o citosina. Al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 25%, al menos el 50%, al menos el 80%, al menos el 90% o el 100% del uracilo en el ácido nucleico puede reemplazarse con un uracilo modificado. El uracilo modificado puede reemplazarse por un compuesto que tiene una única estructura única, o puede reemplazarse por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas). Al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 25%, al menos el 50%, al menos el 80%, al menos el 90% o el 100% de la citosina en el ácido nucleico puede reemplazarse con una citosina modificada. La citosina modificada puede reemplazarse por un compuesto que tiene una sola estructura única, o puede reemplazarse por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas).

En general, la longitud más corta de un ARNm modificado de la presente divulgación puede ser la longitud de una secuencia de ARNm que sea suficiente para codificar un dipéptido. Alternativamente, la longitud de la secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un tripéptido. Alternativamente, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un tetrapéptido. Alternativamente, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un pentapéptido. Alternativamente, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un hexapéptido. Alternativamente, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un heptapéptido. Alternativamente, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un octapéptido. Alternativamente, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un nonapéptido. Alternativamente, la longitud de una secuencia de ARNm puede ser suficiente para codificar un decapeptido.

Los ejemplos de dipéptidos que las secuencias de ácidos nucleicos modificados pueden codificar incluyen, entre otros, carnosina y anserina.

El ARNm puede tener una longitud superior a 30 nucleótidos. La molécula de ARNm puede tener más de 35 nucleótidos de longitud. La longitud puede ser de al menos 40 nucleótidos, al menos 45 nucleótidos, al menos 55 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 80 nucleótidos, al menos 90 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos, al menos 120 nucleótidos, al menos 140 nucleótidos, al menos 160 nucleótidos, al menos 180 nucleótidos, al menos 200 nucleótidos, al menos 250 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 350 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 450 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, al menos 900 nucleótidos, al menos 1.000 nucleótidos, al menos 1.100 nucleótidos, al menos 1.200 nucleótidos, al menos 1.300 nucleótidos, al menos 1.400 nucleótidos, al menos 1.500 nucleótidos, al menos 1.600 nucleótidos, al menos 1.800 nucleótidos, al menos 2.000 nucleótidos, al menos 2.500 nucleótidos, al menos 3.000 nucleótidos, al menos 4.000 nucleótidos, al menos 5.000 nucleótidos o más de 5.000 nucleótidos.

La presente divulgación proporciona métodos para preparar una secuencia de ácido nucleico que comprende un nucleótido que interrumpe la unión de un asociado que interactúa con el surco mayor con la secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende un compuesto de Fórmula I-d:



I-d

donde:

Z es O o S;

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

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

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

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

B es una nucleobase;

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

R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> son cada uno independientemente H o un contraión; y

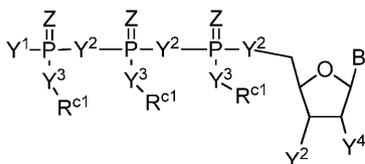
-Y<sup>3</sup>-R<sup>c</sup> es OH o SH a un pH de aproximadamente 1 o -Y<sup>3</sup>-R<sup>c</sup> es O<sup>-</sup> o S<sup>-</sup> a pH fisiológico;

10 o -Y<sup>3</sup>-R<sup>c</sup> es alcoxi C<sub>1-20</sub>, -O-alqueno C<sub>2-20</sub>, o -O-alquino C<sub>1-20</sub>,

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

el método que comprende:

hacer reaccionar un compuesto de Fórmula I-c:

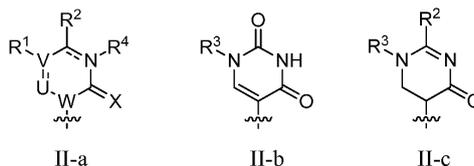


15 I-c

con una ARN polimerasa, y una plantilla de ADNc.

La reacción puede repetirse de 1 a aproximadamente 7.000 veces.

B puede ser una nucleobase de Fórmula II-a, II-b, o II-c:



20 donde:

≡ denota un enlace sencillo o doble;

X es O o S;

U y W son cada uno independientemente C o N;

V es O, S, C o N;

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

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

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

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

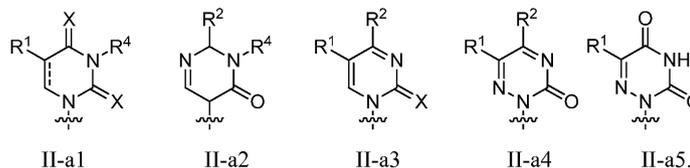
R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1-20</sub>;

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

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

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

5 B puede ser una nucleobase de Fórmula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:

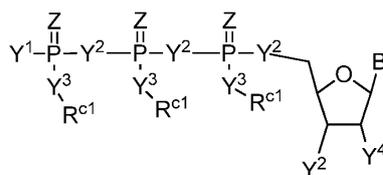


Los métodos pueden comprender además un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en adenosina, citosina, guanosina y uracilo.

La nucleobase puede ser una pirimidina o un derivado de la misma.

10 La presente divulgación también proporciona métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico que comprende un nucleótido que interrumpe la unión de un asociado de unión al surco mayor con la secuencia de ácido nucleico, comprendiendo el método:

hacer reaccionar un compuesto de Fórmula I-c:



I-c

15 Z es O o S;

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

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

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

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

B es una nucleobase;

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

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

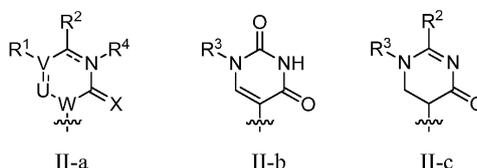
-Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> es OH o SH a un pH de aproximadamente 1 o -Y<sup>3</sup>-R<sup>c1</sup> es O- o S- a pH fisiológico;

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

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

con un cebador, una plantilla de ADNc y una ARN polimerasa.

B puede ser un nucleobase de Fórmula II-a, II-b, o II-c:



30

donde:

$\text{---}$  denota un enlace sencillo o doble;

X es O o S;

U y W son cada uno independientemente C o N;

5 V es O, S, C o N;

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

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

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

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

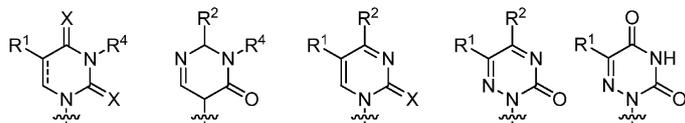
R<sup>3</sup> es H o alquilo C<sub>1-20</sub>;

15 R<sup>4</sup> es H o alquilo C<sub>1-20</sub>; en donde cuando  $\text{---}$  denota un doble enlace, entonces R<sup>4</sup> está ausente, o N-R<sup>4</sup>, en conjunto, forman un N cargado positivamente con alquilo C<sub>1-20</sub>;

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

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

B puede ser una nucleobase de Fórmula II-a1, II-a2, II-a3, II-a4 o II-a5:



20 II-a1 II-a2 II-a3 II-a4 II-a5.

Los métodos pueden comprender además un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en adenosina, citosina, guanosina y uracilo.

La nucleobase puede ser una pirimidina o un derivado de la misma.

Usos de los ácidos nucleicos modificados

25 Agentes terapéuticos

Los ácidos nucleicos modificados y las proteínas traducidas a partir de los ácidos nucleicos modificados descritos en el presente documento pueden usarse como agentes terapéuticos. Por ejemplo, un ácido nucleico modificado descrito en el presente documento puede administrarse a un sujeto, en el que el ácido nucleico modificado se traduce *in vivo* para producir un péptido terapéutico en el sujeto. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan composiciones, métodos, kits y reactivos para el tratamiento o la prevención de enfermedades o afecciones en seres humanos y otros mamíferos. Los agentes terapéuticos activos de la presente divulgación incluyen ácidos nucleicos modificados, células que contienen ácidos nucleicos modificados o polipéptidos traducidos de los ácidos nucleicos modificados, polipéptidos traducidos de ácidos nucleicos modificados y células en contacto con células que contienen ácidos nucleicos modificados o polipéptidos traducidos de los ácidos nucleicos modificados.

35 Los compuestos terapéuticos combinados que contienen uno o más ácidos nucleicos modificados que contienen regiones traducibles que codifican una proteína o proteínas que estimulan la inmunidad de un mamífero junto con una proteína que induce la toxicidad celular dependiente de anticuerpos también se proporcionan aquí. Por ejemplo, se proporcionan terapias que contienen uno o más ácidos nucleicos que codifican trastuzumab y un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En particular, tales compuestos terapéuticos en combinación son útiles en

40 pacientes con cáncer de mama Her2+ que desarrollan resistencia inducida al trastuzumab. (Véase, por ejemplo, Albrecht, Immunotherapy. 2 (6): 795-8 (2010)).

Se proporcionan métodos para inducir la traducción de un polipéptido recombinante en una población celular utilizando los ácidos nucleicos modificados descritos en el presente documento. Dicha traducción puede ser *in vivo*, *ex vivo*, *in culture* o *in vitro*. La población de células se pone en contacto con una cantidad eficaz de una composición que contiene

un ácido nucleico que tiene al menos una modificación de nucleósido y una región traducible que codifica el polipéptido recombinante. La población se pone en contacto en condiciones tales que el ácido nucleico se localiza en una o más células de la población celular y el polipéptido recombinante se traduce en la célula del ácido nucleico.

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

15 Los aspectos de la presente divulgación se dirigen a métodos para inducir la traducción *in vivo* de un polipéptido recombinante en un sujeto mamífero que lo necesite. En este documento, una cantidad efectiva de una composición que contiene un ácido nucleico que tiene al menos una modificación de nucleósido y una región traducible que codifica el polipéptido recombinante se administra al sujeto utilizando los métodos de administración descritos en el presente documento. El ácido nucleico se proporciona en una cantidad y bajo otras condiciones, de modo que el ácido nucleico se localiza en una célula del sujeto y el polipéptido recombinante se traduce en la célula a partir del ácido nucleico. La célula en la que se localiza el ácido nucleico, o el tejido en el que está presente la célula, puede seleccionarse con una o más rondas de administración de ácido nucleico.

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

25 El sujeto al que se administra el agente terapéutico padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección nociva. Se proporcionan métodos para identificar, diagnosticar y clasificar a los sujetos sobre estas bases, que pueden incluir diagnóstico clínico, niveles de biomarcadores, estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y otros métodos conocidos en la técnica.

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

35 El ácido nucleico modificado administrado puede dirigir la producción de uno o más polipéptidos recombinantes que reemplazan un polipéptido (o múltiples polipéptidos) que está sustancialmente ausente en la célula en la que se traduce el polipéptido recombinante. Dicha ausencia puede deberse a la mutación genética del gen codificador o la vía reguladora del mismo. Alternativamente, el polipéptido recombinante funciona para antagonizar la actividad de una proteína endógena presente en, sobre la superficie o secretada de la célula. Generalmente, la actividad de la proteína endógena es perjudicial para el sujeto, por ejemplo, debido a la mutación de la proteína endógena que resulta en una actividad o localización alterada. Además, el polipéptido recombinante antagoniza, directa o indirectamente, la actividad de una fracción biológica presente en la superficie o secretada de la célula. Los ejemplos de fracciones biológicas antagonizadas incluyen lípidos (por ejemplo, colesterol), una lipoproteína (por ejemplo, lipoproteína de baja densidad), un ácido nucleico, un carbohidrato o una toxina de molécula pequeña.

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

40 Como se describe en el presente documento, una característica útil de los ácidos nucleicos modificados de la presente divulgación es la capacidad para reducir la respuesta inmune innata de una célula a un ácido nucleico exógeno. Se proporcionan métodos para realizar la valoración, reducción o eliminación de la respuesta inmune en una célula o una población de células. La célula puede ponerse en contacto con una primera composición que contiene una primera dosis de un primer ácido nucleico exógeno que incluye una región traducible y al menos una modificación de nucleósido, y se determina el nivel de la respuesta inmune innata de la célula al primer ácido nucleico exógeno. Posteriormente, la célula se pone en contacto con una segunda composición, que incluye una segunda dosis del primer ácido nucleico exógeno, conteniendo la segunda dosis una cantidad menor del primer ácido nucleico exógeno en comparación con la primera dosis. Alternativamente, la célula se pone en contacto con una primera dosis de un segundo ácido nucleico exógeno. El segundo ácido nucleico exógeno puede contener uno o más nucleósidos modificados, que pueden ser iguales o diferentes del primer ácido nucleico exógeno o, alternativamente, el segundo

ácido nucleico exógeno puede no contener nucleósidos modificados. Las etapas de poner en contacto la célula con la primera composición y/o la segunda composición pueden repetirse una o más veces. Además, la eficiencia de la producción de proteínas (por ejemplo, la traducción de proteínas) en la célula se determina opcionalmente, y la célula puede transfectarse nuevamente con la primera y/o la segunda composición repetidamente hasta que se logre una eficiencia de producción de proteína objetivo.

#### Compuestos terapéuticos para enfermedades y afecciones

Se proporcionan métodos para tratar o prevenir un síntoma de enfermedades caracterizadas por actividad de proteína faltante o aberrante, sustituyendo la actividad de proteína faltante o superando la actividad de la proteína aberrante. Debido al rápido inicio de la producción de proteínas después de la introducción de ARNm modificados, en comparación con los vectores de ADN viral, los compuestos de la presente divulgación son particularmente ventajosos en el tratamiento de enfermedades agudas tales como sepsis, apoplejía e infarto de miocardio. Además, la falta de regulación transcripcional de los ARNm modificados de la presente descripción es ventajosa porque se puede lograr una valoración precisa de la producción de proteínas.

Las enfermedades caracterizadas por actividad proteica disfuncional o aberrante incluyen, pero no se limitan a, cáncer y enfermedades proliferativas, enfermedades genéticas (por ejemplo, fibrosis quística), enfermedades autoinmunes, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas. La presente divulgación proporciona un método para tratar tales afecciones o enfermedades en un sujeto mediante la introducción de terapias basadas en ácido nucleico o células que contienen los ácidos nucleicos modificados proporcionados en el presente documento, en donde los ácidos nucleicos modificados codifican una proteína que antagoniza o supera la actividad de la proteína aberrante presente en la célula del sujeto. Ejemplos específicos de una proteína disfuncional son las variantes de mutación con cambio de sentido del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que producen una variante proteica disfuncional de la proteína CFTR, que causa la fibrosis quística.

Las enfermedades múltiples se caracterizan por la actividad de la proteína faltante (o disminuida sustancialmente de modo que no se produce la función adecuada de la proteína). Tales proteínas pueden no estar presentes, o son esencialmente no funcionales. La presente divulgación proporciona un método para tratar tales afecciones o enfermedades en un sujeto mediante la introducción de terapias basadas en ácido nucleico o células que contienen los ácidos nucleicos modificados proporcionados en el presente documento, en donde los ácidos nucleicos modificados codifican una proteína que reemplaza la actividad de la proteína que falta de las células objetivo del sujeto. Ejemplos específicos de una proteína disfuncional son las variantes de mutación sin sentido del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que producen una variante proteica no funcional de la proteína CFTR, que causa la fibrosis quística.

De este modo, se proporcionan métodos para tratar la fibrosis quística en un mamífero poniendo en contacto una célula del sujeto con un ácido nucleico modificado que tiene una región traducible que codifica un polipéptido CFTR funcional, en condiciones tales que una cantidad efectiva del polipéptido CFTR está presente en la célula. Las células objetivo preferidas son células epiteliales, tales como las del pulmón, y los métodos de administración se determinan dependiendo del tejido objetivo; es decir, para la administración pulmonar, las moléculas de ARN se formulan para administración por inhalación.

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

#### Métodos de administración de ácido nucleico celular

Los métodos de la presente divulgación potencian el suministro de ácido nucleico a una población celular, *in vivo*, *ex vivo* o *in culture*. Por ejemplo, un cultivo celular que contiene una pluralidad de células huésped (por ejemplo, células eucariotas, tales como células de mamíferos o levaduras) se pone en contacto con una composición que contiene un ácido nucleico mejorado que tiene al menos una modificación de nucleósidos y, opcionalmente, una región traducible. La composición también contiene generalmente un reactivo de transfección u otro compuesto que aumenta la eficiencia de la captación mejorada de ácido nucleico en las células huésped. El ácido nucleico mejorado muestra una retención mejorada en la población celular, en relación con un ácido nucleico no modificado correspondiente. La

retención del ácido nucleico mejorado es mayor que la retención del ácido nucleico no modificado. Puede ser al menos aproximadamente 50%, 75%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200% o más del 200% mayor que la retención del ácido nucleico no modificado. Dicha ventaja de retención puede lograrse mediante una ronda de transfección con el ácido nucleico mejorado, o puede obtenerse después de repetidas rondas de transfección.

- 5 El ácido nucleico mejorado puede administrarse a una población de células objetivo con uno o más ácidos nucleicos adicionales. Dicha administración puede ser al mismo tiempo, o el ácido nucleico mejorado se suministra antes de la administración de uno o más ácidos nucleicos adicionales. Los uno o más ácidos nucleicos adicionales pueden ser ácidos nucleicos modificados o ácidos nucleicos no modificados. Se entiende que la presencia inicial de los ácidos nucleicos mejorados no induce sustancialmente una respuesta inmune innata de la población celular y, además, que
- 10 la respuesta inmune innata no se activará por la presencia posterior de los ácidos nucleicos no modificados. A este respecto, el ácido nucleico mejorado puede no contener una región traducible, si la proteína que se desea que esté presente en la población de células objetivo se traduce de los ácidos nucleicos no modificados.

#### Fracciones de direccionamiento

- 15 Se pueden proporcionar ácidos nucleicos modificados para expresar un asociado de unión a proteínas o un receptor en la superficie de la célula, que funciona para dirigir la célula a un espacio tisular específico o para interactuar con una fracción específica, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Los asociados de unión a proteínas adecuados incluyen anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos, proteínas de armazón o péptidos. Además, se pueden emplear ácidos nucleicos modificados para dirigir la síntesis y la localización extracelular de lípidos, carbohidratos u otras fracciones biológicas.

- 20 Silenciamiento permanente de la expresión génica

- Un método para silenciar epigenéticamente la expresión génica en un sujeto mamífero, que comprende un ácido nucleico en el que la región traducible codifica un polipéptido o polipéptidos capaces de dirigir la metilación de la histona H3 específica de secuencia para iniciar la formación de heterocromatina y reducir la transcripción de genes
- 25 alrededor de genes específicos para propósito de silenciar el gen. Por ejemplo, una mutación de ganancia de función en el gen Janus quinasa 2 es responsable de la familia de enfermedades mieloproliferativas.

#### Composiciones farmacéuticas

- La presente descripción proporciona proteínas generadas a partir de ARNm modificados. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente una o más sustancias terapéuticamente activas adicionales. La descripción proporciona un método para administrar composiciones farmacéuticas que comprenden una o más
- 30 proteínas para ser administradas a un sujeto que lo necesite. Las composiciones pueden administrarse a humanos. Para los propósitos de la presente divulgación, la frase "ingrediente activo" generalmente se refiere a una proteína o complejo que contiene proteína como se describe en el presente documento.

- Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se dirigen principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración a seres humanos, los
- 35 expertos en la técnica entenderán que tales composiciones son generalmente adecuadas para la administración a animales de todo tipo. La modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de volver las composiciones adecuadas para la administración a diversos animales es bien entendida, y el farmacólogo veterinario normalmente capacitado puede diseñar y/o realizar dicha modificación con experimentación meramente ordinaria, si la hubiera. Los sujetos para los que se contempla la administración de las
- 40 composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y/u otros primates; mamíferos, incluyendo mamíferos comercialmente relevantes tales como ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, gatos, perros, ratones y/o ratas; y/o aves, incluidas aves comercialmente relevantes como pollos, patos, gansos y/o pavos.

- Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado a continuación en la técnica de la farmacología. En general, tales métodos de preparación incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con un excipiente y/o uno o más ingredientes
- 45 adicionales, y luego, si es necesario y/o deseable, conformar y/o empaquetar el producto en una unidad de una sola dosis o de dosis múltiples.

- Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación puede prepararse, envasarse y/o venderse a granel, como una dosis unitaria, y/o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad
- 50 predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosis del ingrediente activo que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de dicha dosis tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis.

- Las cantidades relativas del ingrediente activo, el excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier ingrediente
- 55 adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación variarán, dependiendo de la identidad, el tamaño y/o la afección del sujeto tratado y además, dependiendo de la ruta por la cual se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1% y el 100% (p/p) de ingrediente

activo.

Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, agentes de dispersión o suspensión, agentes activos de superficie, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. The Science and Practice of Pharmacy de Remington, 21ª edición, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; incorporada aquí por referencia) describe diversos excipientes usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación. Excepto en la medida en que cualquier medio excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, como al producir cualquier efecto biológico indeseable o bien interactuar de manera perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, se contempla su uso dentro del alcance de la presente divulgación.

El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o el 100% puro. El excipiente puede ser aprobado para uso en humanos y para uso veterinario. El excipiente puede ser aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos. El excipiente puede ser de grado farmacéutico. El excipiente puede cumplir con los estándares de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes dispersantes y/o granuladores, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes reguladores, agentes lubricantes, y/o aceites. Dichos excipientes pueden incluirse opcionalmente en formulaciones farmacéuticas. De acuerdo con el criterio del formulador, pueden estar presentes excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorio, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes y/o perfumantes.

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

Los ejemplos de agentes de granulación y/o dispersión incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato de almidón sódico, arcillas, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar, bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio, poli(vinil-pirrolidona) (crospovidona) entrecruzada, almidón de carboximetil sódico (almidón glicolato de sodio), carboximetil celulosa, carboximetilcelulosa de sodio entrecruzada (croscarmelosa), metilcelulosa, almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa cálcica, silicato de magnesio y aluminio (Veegum), laurilsulfato de sodio, compuestos de amonio cuaternario, etc., y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes tensioactivos y/o emulsionantes incluyen, pero no se limitan a, emulsionantes naturales (por ejemplo, acacia, agar, ácido algínico, alginato de sodio, tragacanto, chondrux, colesterol, xantano, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, grasa de lana, colesterol, cera y lecitina), arcillas coloidales (por ejemplo, bentonita [silicato de aluminio] y Veegum® [silicato de aluminio y magnesio]), derivados de aminoácidos de cadena larga, alcoholes de alto peso molecular (por ejemplo, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol oleílico, monoestearato de triacetina, diestearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo y monoestearato de propilenglicol, alcohol polivinílico), carbómeros (por ejemplo, carboxi polimetileno, ácido poliacrílico, polímero de ácido acrílico y polímero de carboxivinilo), carragenano, derivados celulósicos (por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monolaurato de polioxietilén sorbitán [Tween® 20], polioxietilén sorbitán [Tween® 60], monooleato de polioxietilén sorbitán [Tween® 80], monopalmitato de sorbitán [Span® 40], monoestearato de sorbitán [Span® 60], triestearato de sorbitán [Span® 65], monooleato de glicerilo, sorbitán monooleato [Span® 80]), ésteres de polioxietileno (por ejemplo, monoestearato de polioxietileno [Myrj® 45], aceite de ricino hidrogenado polioxietileno, aceite de ricino polietoxilado, estearato de polioximetileno y Solutol®), ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (por ejemplo, Cremophor®), éteres de polioxietileno (por ejemplo, polioxietilén-lauril éter [Brij®30]), poli (vinil-pirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, laurilo sulfato de sodio, Pluronic® F68, Poloxamer® 188, bromuro de cetrimonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato de sodio, etc. y/o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes de unión incluyen, pero no se limitan a, almidón (por ejemplo, almidón de maíz y pasta de almidón); gelatina; azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa, dextrina, melaza, lactosa, lactitol, manitol); gomas naturales y sintéticas (por ejemplo, goma arábiga, alginato de sodio, extracto de musgo irlandés, goma panwar, goma Ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, poli(vinil-pirrolidona), silicato de magnesio y aluminio (Veegum®) y arabogalactano de alerce); alginatos; óxido de polietileno; polietilenglicol;

sales de calcio inorgánicas; ácido silícico; polimetacrilatos; ceras; agua; alcohol; etc.; y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de conservantes pueden incluir, pero no se limitan a, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes de alcohol, conservantes ácidos y/u otros conservantes. Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monoioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y/o sulfato de sodio. Los ejemplos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidrato, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato sódico, ácido tartárico y/o edetato trisódico. Los ejemplos de conservantes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imiduria, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y/o timerosal. Los ejemplos de conservantes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a, butilparabeno, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y/o ácido sórbico. Los ejemplos de conservantes de alcohol incluyen, pero no se limitan a, etanol, polietilenglicol, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o alcohol feniletílico. Los ejemplos de conservantes ácidos incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroacético, ácido ascórbico, ácido sórbico y/o ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero no se limitan a, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrimida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), etilendiamina, laurilsulfato de sodio (SLS), éter lauril sulfato de sodio (SLES), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfato de potasio, metabisulfito de potasio, Glydant Plus®, Phenonip®, metilparabeno, Germall®115, Germaben®II, Neolone<sup>MR</sup>, Katon<sup>MR</sup> y/o Euxyl®.

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

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

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

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

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden

5 formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes, humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles pueden ser soluciones, suspensiones y/o emulsiones inyectables estériles en diluyentes y/o disolventes no tóxicos parenteralmente aceptables, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer, USP, y la solución de cloruro de sodio isotónica. Los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos como el ácido oleico se pueden usar en la preparación de inyectables.

10 Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana, y/o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de usar.

15 Con el fin de prolongar el efecto de un ingrediente activo, a menudo es deseable disminuir la absorción del ingrediente activo de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se hacen formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables, tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco con respecto al polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito se preparan atrapando el medicamento en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

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

25 Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, un ingrediente activo se mezcla con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable inerte tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o rellenos o diluyentes (por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico), aglutinantes (por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidina, sacarosa y acacia), humectantes (por ejemplo, glicerol), agentes desintegrantes (por ejemplo, agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio), agentes retardantes de disolución (por ejemplo, parafina), aceleradores de absorción (por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario), agentes humectantes (por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol), absorbentes (por ejemplo, caolín y arcilla de bentonita) y lubricantes (por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio), y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender agentes reguladores.

30 Las composiciones sólidas de un tipo similar pueden emplearse como rellenos en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras que utilizan excipientes como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden comprender agentes opacificantes y pueden ser de una composición que liberan el ingrediente o ingredientes activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar pueden emplearse como rellenos en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

35 Las formas de dosificación para administración tópica y/o transdérmica de una composición pueden incluir ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, atomizadores, inhaladores y/o parches. En general, un ingrediente activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente y/o cualquier conservante y/o regulador necesario farmacéuticamente aceptable que se requiera. Además, la presente divulgación contempla el uso de parches transdérmicos, que a menudo tienen la ventaja adicional de proporcionar un suministro controlado de un compuesto al cuerpo. Dichas formas de dosificación se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo y/o dispensando el compuesto en el medio apropiado. Alternativa o adicionalmente, la velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de velocidad y/o dispersando el compuesto en una matriz polimérica y/o gel.

40 Los dispositivos adecuados para uso en la administración de composiciones farmacéuticas intradérmicas descritas en el presente documento incluyen dispositivos de aguja corta tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos Nos 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; y 5.417.662. Las composiciones intradérmicas pueden administrarse mediante dispositivos que limitan la longitud efectiva de penetración de una aguja en la piel, tales como las descritas en la publicación PCT WO 99/34850 y sus equivalentes funcionales. Son adecuados

los dispositivos de inyección de chorro que suministran composiciones líquidas a la dermis a través de un inyector de chorro de líquido y/o una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que llega a la dermis. Los dispositivos de inyección a chorro se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.480.381; 5.599.302; 5.334.144; 5.993.412; 5.649.912; 5.569.189; 5.704.911; 5.383.851; 5.893.397; 5.466.220; 5.339.163; 5.312.335; 5.503.627; 5.064.413; 5.520.639; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 4.940.460; y las publicaciones PCT WO 97/37705 y WO 97/13537. Son adecuados los dispositivos balísticos de suministro de polvo/partículas que utilizan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel hasta la dermis. De forma alternativa o adicional, se pueden usar jeringas convencionales en el método clásico de Mantoux de administración intradérmica.

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

Una composición farmacéutica puede prepararse, envasarse y/o venderse en una formulación adecuada para administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Dicha formulación puede comprender partículas secas que comprenden el ingrediente activo y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 7 nm o de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 6 nm. Dichas composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para administración usando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que puede dirigirse una corriente de propelente para dispersar el polvo y/o usando un recipiente dispensador de disolvente/polvo autopropulsante tal como un dispositivo que comprende el ingrediente activo disuelto y/o suspendido en un propelente de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Tales polvos comprenden partículas en las que al menos el 98% de las partículas en peso tienen un diámetro mayor que 0,5 nm y al menos el 95% de las partículas en número tienen un diámetro menor a 7 nm. Alternativamente, al menos el 95% de las partículas en peso tienen un diámetro superior a 1 nm y al menos el 90% de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 6 nm. Las composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente de polvo fino sólido, tal como azúcar, y se proporcionan convenientemente en una forma de dosis unitaria.

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

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

Las formulaciones descritas en el presente documento como útiles para la administración pulmonar son útiles para la administración intranasal de una composición farmacéutica. Otra formulación adecuada para la administración intranasal es un polvo grueso que comprende el ingrediente activo y que tiene una partícula promedio de aproximadamente 0,2 µm a 500 µm. Dicha formulación se administra de la manera en que se toma el rapé, es decir, por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de la nariz.

Las formulaciones adecuadas para administración nasal pueden comprender, por ejemplo, desde aproximadamente el 0,1% (p/p) y hasta el 100% (p/p) del ingrediente activo, y pueden comprender uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Una composición farmacéutica puede prepararse, envasarse y/o venderse en una formulación adecuada para administración bucal. Dichas formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de comprimidos y/o pastillas elaborados usando métodos convencionales, y pueden, por ejemplo, con 0,1% a 20% (p/p) de ingrediente activo, el resto que comprende un disolvente oral y/o composición degradable y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en este documento. Alternativamente, las formulaciones adecuadas para administración bucal pueden comprender un polvo y/o una solución y/o suspensión en aerosol y/o atomizada que comprende un ingrediente activo. Dichas formulaciones en polvo, en aerosol y/o atomizada, cuando se dispersan, pueden tener un tamaño promedio de partícula y/o gotita en el intervalo de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 200 nm, y pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en este documento.

Una composición farmacéutica puede prepararse, envasarse y/o venderse en una formulación adecuada para administración oftálmica. Dichas formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de gotas oculares que incluyen, por ejemplo, una solución y/o suspensión al 0,1/1,0% (p/p) del ingrediente activo en un excipiente líquido acuoso o aceitoso. Tales gotas pueden comprender además agentes de tamponamiento, sales y/o uno o más de cualquiera de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Otras formulaciones administrables oftálmicamente que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina y/o en una preparación liposomal. Se considera que las gotas para los oídos y/o las gotas para los ojos están dentro del alcance de la presente divulgación.

Las consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy vigésima primera edición, Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (incorporada en el presente documento por referencia).

#### Administración

La presente divulgación proporciona métodos que comprenden administrar proteínas o complejos de acuerdo con la presente divulgación a un sujeto que la necesite. Las proteínas o los complejos, o las composiciones farmacéuticas, de imagen, diagnóstico o profilácticas de las mismas, pueden administrarse a un sujeto utilizando cualquier cantidad y cualquier vía de administración efectiva para prevenir, tratar, diagnosticar u obtener imágenes de una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, una enfermedad, trastorno y/o afección relacionada con los déficits de la memoria de trabajo). La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad y similares. Las composiciones de acuerdo con la presente descripción se formulan típicamente en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente divulgación será decidido por el médico tratante dentro del alcance de un buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente efectivo, profilácticamente efectivo, de imágenes específicas efectivas, o apropiadas para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Las proteínas que se van a administrar y/o las composiciones farmacéuticas, profilácticas, diagnósticas o de generación de imágenes de las mismas pueden administrarse a animales, tales como mamíferos (por ejemplo, seres humanos, animales domesticados, gatos, perros, ratones, ratas, etc.). Las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de generación de imágenes de los mismos pueden administrarse a seres humanos.

Las proteínas que se van a administrar y/o las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de generación de imágenes de las mismas de acuerdo con la presente divulgación pueden administrarse por cualquier vía. Las proteínas y/o las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de generación de imágenes de las mismas, pueden administrarse por una o más de una variedad de vías, incluidas la oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea, intraventricular, transdérmica, intradérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (por ejemplo, en polvo, ungüentos, cremas, geles, lociones y/o gotas), mucosal, nasal, bucal, enteral, vítea, intratumoral, sublingual; por instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; como un atomizador oral, atomizador nasal y/o aerosol, y/o a través de un catéter de la vena porta. Las proteínas o complejos, y/o las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de generación de imágenes de los mismos, pueden administrarse mediante inyección intravenosa sistémica. Las proteínas o complejos y/o las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de generación de imágenes de los mismos pueden administrarse por vía intravenosa y/u oral. Las proteínas o complejos, y/o las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de generación de imágenes de los mismos, se pueden administrar de una manera que permita que la proteína o el complejo atraviese la barrera hematoencefálica, la barrera vascular u otra barrera epitelial.

Sin embargo, la presente divulgación abarca el suministro de proteínas o complejos, y/o las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de generación de imágenes de los mismos, por cualquier vía apropiada teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias del suministro de fármacos.

En general, la vía de administración más apropiada dependerá de una variedad de factores que incluyen la naturaleza de la proteína o complejo que comprende proteínas asociadas con al menos un agente a administrar (por ejemplo, su estabilidad en el medio ambiente del tracto gastrointestinal, flujo sanguíneo, etc.), el estado del paciente (por ejemplo, si el paciente es capaz de tolerar vías de administración particulares, etc.). La presente divulgación abarca el suministro de las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imágenes por cualquier vía apropiada teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias de la administración de medicamentos.

Las composiciones de acuerdo con la presente divulgación pueden administrarse a niveles de dosificación suficientes para administrar de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente

0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, del peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de generación de imágenes deseado. La dosis deseada puede administrarse tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, día por medio, cada tercer día, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. La dosis deseada se puede administrar utilizando administraciones múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).

Las proteínas o complejos se pueden usar en combinación con uno o más agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de generación de imágenes. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deben administrarse al mismo tiempo y/o formularse para su entrega en conjunto, aunque estos métodos de administración están dentro del alcance de la presente divulgación. Las composiciones pueden administrarse simultáneamente, antes o después de una o más terapias o procedimientos médicos deseados. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o en un horario determinado para ese agente. La presente divulgación abarca el suministro de composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de generación de imágenes en combinación con agentes que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción y/o modifican su distribución dentro del cuerpo.

Se apreciará además que los agentes activos terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de generación de imágenes utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una única composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. En general, se espera que los agentes utilizados en combinación se utilicen a niveles que no excedan los niveles en los que se utilizan individualmente. Los niveles utilizados en combinación pueden ser más bajos que los utilizados individualmente.

La combinación particular de terapias (terapéuticas o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de las terapias y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico que se desea lograr. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, una composición útil para tratar el cáncer de acuerdo con la presente divulgación puede administrarse simultáneamente con un agente quimioterapéutico), o pueden lograr diferentes efectos (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso).

#### Kits

La presente descripción proporciona una variedad de kits para llevar a cabo de manera conveniente y/o efectiva los métodos de la presente descripción. Normalmente, los kits comprenderán cantidades suficientes y/o números de componentes para permitir que un usuario realice múltiples tratamientos de un sujeto o sujetos y/o realice múltiples experimentos.

En un aspecto, la divulgación proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación del ácido nucleico, en donde el ácido nucleico es capaz de evadir una respuesta inmune innata de una célula en la que se introduce el primer ácido nucleico aislado, y el envasado y las instrucciones.

En un aspecto, la divulgación proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden: un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible, provisto en una cantidad efectiva para producir una cantidad deseada de una proteína codificada por la región traducible cuando se introduce en una célula objetivo; un segundo ácido nucleico que comprende un ácido nucleico inhibidor, proporcionado en una cantidad eficaz para inhibir sustancialmente la respuesta inmune innata de la célula; y el envasado y las instrucciones.

En un aspecto, la divulgación proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación de nucleósido, en la que el ácido nucleico presenta una degradación reducida por una nucleasa celular, y el envasado y las instrucciones.

En un aspecto, la divulgación proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y al menos dos modificaciones de nucleósidos diferentes, en donde el ácido nucleico exhibe una degradación reducida por una nucleasa celular, y el envasado y las instrucciones.

En un aspecto, la divulgación proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y al menos una modificación de nucleósido, en la que el ácido nucleico presenta una degradación reducida por una nucleasa celular; un segundo ácido nucleico que comprende un ácido nucleico inhibidor; y el envasado y las instrucciones.

El primer ácido nucleico aislado puede comprender ARN mensajero (ARNm). El ARNm puede comprender al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en ribonucleósido piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-desaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-

pseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina, y 4-metoxi-2-tio-pseudouridina.

5 El ARNm puede comprender al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina y 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina.

10 El ARNm puede comprender al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-desaza-adenina, 7-desaza-8-aza-adenina, 7-desaza-2-aminopurina, 7-desaza-8-aza-2-aminopurina, 7-desaza-2,6-diaminopurina, 7-desaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, 2-metil-tio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-glicinil carbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenocina, 2-metil-tio-N6-treonil carbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenocina, 7-metiladenina, 2-metil-tio-adenina, y 2-metoxi-adenina.

15 El ARNm puede comprender al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en inosina, 1-metil-inosina, wiosina, wibutosina, 7-desaza-guanosina, 7-desaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-desaza-guanosina, 6-tio-7-desaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosa, N2-metilguanosa, N2,N2-dimetilguanosa, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación de nucleósidos, en donde el ácido nucleico presenta una degradación reducida por una nucleasa celular y una célula de mamífero adecuada para la traducción de la región traducible del primer ácido nucleico.

Ejemplos

25 La divulgación se describe con más detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Transcripción *in vitro* de ARNm modificado

Materiales y métodos

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

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

40 Tabla 3

Nucleótidos modificados	Química #	Combinación de nucleótidos modificados	Química #
6-aza-citidina	Química 1	α-tio-citidina/5-yodo-uridina	Química 29
2-tio-citidina	Química 2	α-tio-citidina/N1-metil-pseudo-uridina	Química 30
α-tio-citidina	Química 3	α-tio-citidina/α-tio-uridina	Química 31
Pseudo-iso-citidina	Química 4	α-tio-citidina/5-metil-uridina	Química 32

ES 2 737 960 T3

5-aminoalil-uridina	Química 5		$\alpha$ -tio-citidina/pseudo-uridina	Química 33
5-yodo-uridina	Química 6		Pseudo-iso-citidina/5-yodo-uridina	Química 34
N1-metil-pseudouridina	Química 7		Pseudo-iso-citidina/N1-metil-pseudouridina	Química 35
5,6-dihidrouridina	Química 8		Pseudo-iso-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina	Química 36
$\alpha$ -tio-uridina	Química 9		Pseudo-iso-citidina/5-metil-uridina	Química 37
4-tio-uridina	Química 10		Pseudo-iso-citidina/Pseudo-uridina	Química 38
6-aza-uridina	Química 11		Pirroló-citidina	Química 39
5-hidroxi-uridina	Química 12		Pirroló-citidina/5-yodo-uridina	Química 40
Desoxi-timidina	Química 13		Pirroló-citidina/N1-metil-pseudo-uridina	Química 41
Pseudo-uridina	Química 14		Pirroló-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina	Química 42
Inosina	Química 15		Pirroló-citidina/5-metil-uridina	Química 43
$\alpha$ -tio-guanosina	Química 16		Pirroló-citidina/Pseudo-uridina	Química 44
8-oxo-guanosina	Química 17		5-metil-citidina/5-yodo-uridina	Química 45
O6-metil-guanosina	Química 18		5-metil-citidina/N1-metil-pseudo-uridina	Química 46
7-desaza-guanosina	Química 19		5-metil-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina	Química 47
Sin modificación	Química 20		5-metil-citidina/5-metil-uridina	Química 48
N1-metil-adenosina	Química 21		5-metil-citidina/Pseudo-uridina	Química 49
2-amino-6-cloro-purina	Química 22		5-metil-citidina	Química 50
N6-metil-2-aminopurina	Química 23		25% de Pseudo-iso-citidina	Química 51

(continuación)

Nucleótidos modificados	Química #		Combinación de nucleótidos modificados	Química #
6-cloro-purina	Química 24		25% de N1-metil-pseudo-uridina	Química 52

N6-metil-adenosina	Química 25	25% de N1-Metil-pseudouridina/75% de pseudouridina	Química 53
$\alpha$ -tio-adenosina	Química 26	5-metil-uridina	Química 54
8-azido-adenosina	Química 27	5-yodo-citidina	Química 55
7-desaza-adenosina	Química 28		

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

Tabla 4

Carril	NTP modificado
1	$\alpha$ -tio-citidina
2	Pseudo-iso-citidina
3	5-aminoalil-uridina
4	5-yodo-uridina
5	N1-metil-pseudouridina
6	$\alpha$ -tio-uridina
7	4-tio-uridina
8	5-hidroxi-uridina
9	Desoxi-timidina
10	Pseudo-uridina
11	Inosina
12	$\alpha$ -tio-guanosina
13	8-oxo-guanosina
14	N1-metil-guanosina
15	O6-metil-guanosina
16	Sin modificación
17	N1-metil-adenosina
18	2-amino-6-cloro-purina
19	N6-metil-2-amino-purina
20	6-cloro-purina
21	$\alpha$ -tio-adenosina
22	8-azido-adenosina

23	7-desaza-adenosina
24	6-aza-citidina
25	2-tio-citidina
26	5,6-dihidro-uridina
27	6-aza-uridina
28	7-desaza-guanosina
29	N6-metil-adenosina

Tabla 5

Carril	Combinación de NTP modificados
1	$\alpha$ -tio-citidina/5-yodo-uridina
2	$\alpha$ -tio-citidina/N1-metil-pseudouridina
3	$\alpha$ -tio-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
4	$\alpha$ -tio-citidina/5-metil-uridina
5	$\alpha$ -tio-citidina/pseudouridina
6	5-yodo-citidina/5-yodo-uridina
7	5-yodo-citidina/N1-metil-pseudouridina
8	5-yodo-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
9	5-yodo-citidina/5-metil-uridina
10	5-yodo-citidina/pseudouridina
11	Pseudo-iso-citidina/5-yodo-uridina
12	Pirrol-citidina

(continuación)

Carril	Combinación de NTP modificados
13	Pirrol-citidina/5-yodo-uridina
14	Pirrol-citidina/N1-metil-pseudouridina
15	Pirrol-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
16	Pirrol-citidina/5-metil-uridina
17	Pirrol-citidina/pseudouridina
18	5-metil-citidina/5-yodo-uridina
19	5-metil-citidina/N1-metil-uridina
20	5-metil-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
21	5-metil-citidina/5-metil-uridina
22	5-metil-citidina/pseudo-uridina
23	Pseudo-iso-citidina/N1-metil-pseudouridina

24	Pseudo-iso-citidina/ $\alpha$ -tio-uridina
25	Pseudo-iso-citidina/5-metil-uridina
26	Pseudo-iso-citidina/pseudouridina
27	5-metil-citidina
28	25% de pseudo-iso-citidina
29	25% de N1-metil-pseudouridina
30	25% de N1-metil-pseudouridina/75 de pseudouridina

Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR: Se cargaron productos de PCR de la transcripción inversa individual (200-400 ng) en un pozo de gel de agarosa E al 1,2% no desnaturizante (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se corrió durante 12-15 minutos de acuerdo con el protocolo del fabricante (FIG. 1B). La tabla 5 a continuación indica el nucleótido modificado cargado en cada carril.

Quantificación de ARNmod con Nanodrop y datos espectrales de UV: Los ARNmod en regulador de TE (1  $\mu$ L) se utilizaron para las lecturas de absorbancia de UV con Nanodrop para cuantificar el rendimiento de cada ARNmod de una reacción de transcripción *in vitro* (se muestran trazas de absorbancia UV en las Figuras 6A-6L). Estos datos indican que los nucleótidos modificados químicamente se transcribieron en ARNm modificado químicamente. Estos datos también demuestran que los nucleótidos con modificaciones químicas en la cara del surco mayor y la cara del surco menor del nucleótido fueron capaces de transcribirse en un ARNmod. Estos datos demuestran además que los nucleótidos de la presente divulgación son competentes para la transcripción y son compatibles con la incorporación en un ARNmod, que puede haber alterado los espectros UV debido a la presencia de un nucleótido modificado dado. Por ejemplo, los ARNmod que contienen pirrolo-C tienen un aumento de la absorbancia UV en una longitud de onda más baja debido a la presencia del anillo pirrolo del nucleótido C modificado. En otro ejemplo, los ARNmod que contienen el nucleótido 2-amino-adenina tienen un aumento en la absorbancia UV en una longitud de onda más alta debido a la presencia de una amina exocíclica fuera del anillo de purina. Los nucleótidos que no son competentes para la transcripción y no pueden incorporarse en un ARNmod tienen un espectro UV mezclado que indica que no hay producto de reacción de la transcripción.

#### Ejemplo 2. Transfección de ARN modificado

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

Transfección directa: en una placa de cultivo de tejido recubierta con colágeno de 24 pozos, los queratinocitos se sembraron a una densidad celular de  $0,7 \times 10^5$ . Para los experimentos realizados en una placa de cultivo tisular recubierta con colágeno de 96 pozos, los queratinocitos se sembraron a una densidad celular de  $0,3 \times 10^5$ . Los queratinocitos se hicieron crecer hasta una confluencia  $> 70\%$  durante más de 24 horas. Para cada ARNmod a transfectar, el ARNmod: RNAiMAX se preparó como se describió y se transfectó en las células en la placa de múltiples pozos durante las 24 horas posteriores a la siembra de células y la adherencia a la placa de cultivo de tejidos.

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

Las Figuras 2A y 2B muestran un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (hu-G-CSF) de células de queratinocitos humanos transfectados *in vitro*. Los queratinocitos se cultivaron en medio EpiLife con el suplemento S7 de Invitrogen a una confluencia  $> 70\%$ . En la Figura 2A os queratinocitos se transfectaron de manera inversa con 300 ng del ARNm indicado modificado químicamente complejado con RNAiMAX de Invitrogen. Figura 2B. Los queratinocitos 2B se transfectaron con un ARNmod de 300 ng complejado con RNAiMAX de Invitrogen. El complejo ARN: RNAiMAX se formó primero incubando el ARN con medio EpiLife sin Suplemento en una dilución volumétrica 5X durante 10 minutos a temperatura ambiente. En un segundo vial, el reactivo RNAiMAX se incubó con medio EpiLife sin suplemento en una dilución volumétrica 10X durante 10 minutos a temperatura ambiente. El vial de ARN se mezcló luego con el vial de RNAiMAX y se incubó durante 20-30 a temperatura ambiente antes de añadirse a las células gota a gota. La concentración de huG-CSF secretada en el medio de cultivo se midió 18 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm químicamente modificados por triplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano de queratinocitos humanos transfectados se cuantificó utilizando un kit ELISA de Invitrogen o de R&D Systems (Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. Estos datos muestran que

los ARNm de huG-CSF compuestos de análogos de nucleótidos químicamente distintos (SEQ ID NO: 2) se pueden traducir en células de queratinocitos humanos y que el huG-CSF se transporta fuera de las células y se libera en el entorno extracelular. Estos datos indican que nucleótidos modificados se tradujeron en proteínas cuando se incorporaron a un ARNm modificado químicamente. Estos datos muestran que el ARN modificado que contiene nucleótidos con modificaciones químicas en la cara del surco mayor de los análogos de pirimidina tiene los niveles más altos de hu-G-CSF secretado en el medio de cultivo celular.

Dosis y duración del ARNm: ELISA de G-CSF

Las Figuras 3A-N muestran ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humanos de células de queratinocitos humanos transfectados *in vitro*. Los queratinocitos se cultivaron en medio EpiLife con el suplemento S7 de Invitrogen en una confluencia de > 70%. Los queratinocitos se transfectaron de manera inversa con 0 ng, 46,875 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng o 1.500 ng de ARNm complejo con RNAiMAX de Invitrogen. El complejo ARNm: RNAiMAX se formó como se describió. La concentración de huG-CSF secretada en el medio de cultivo se midió a 0,6, 12, 24 y 48 horas después de la transfección para cada concentración de cada ARNm por triplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humanos de queratinocitos humanos transfectados se cuantificó utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. Estos datos muestran que los ARNm de huG-CSF compuestos de análogos de nucleótidos químicamente distintos (SEQ ID NO: X y Tabla 6) secretaron la proteína hu-G-CSF de una manera dependiente de la dosis de ARNm de células de queratinocitos humanos y que el huG-CSF se transporta fuera de las células y se libera en el medio extracelular. Estos datos indican que ARN modificados que contienen análogos de nucleótidos modificados sostienen la expresión de hu-G-CSF durante los niveles más largos y más altos. Estos datos muestran que el ARN modificado que contiene nucleótidos modificados con modificaciones químicas en la cara del surco mayor de los análogos de pirimidina tiene los niveles más altos de hu-G-CSF secretado en el medio de cultivo celular y que 750 ng de ARNm genera el nivel más alto de hu-G-CSF secretado.

Ejemplo 3. Respuesta inmune celular innata a ARNm

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

Las Figuras 4A-F muestran un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el factor de necrosis tumoral humano  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Figuras 4A y 4B); Interferón- $\beta$  humano (IFN- $\beta$ ) (Figuras 4C y 4D); y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humanos (Figuras 4E y 4F) secretado a partir de células de queratinocitos humanos transfectados *in vitro*. Los queratinocitos se cultivaron en medio EpiLife con suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos en ausencia de hidrocortisona de Invitrogen a una confluencia > 70%. En las figuras 4A y 4B, los queratinocitos se transfectaron de manera inversa con 0 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng, 1.500 ng o 3.000 ng del ARNm indicado químicamente modificado complejo con RNAiMAX de Invitrogen como se describió por triplicado. TNF- $\alpha$  secretado en el medio de cultivo se midió 24 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm químicamente modificados utilizando un kit ELISA de Invitrogen de acuerdo con los protocolos del fabricante.

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

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

Las Figuras 5A-D muestran que el ARNm que codifica hu-G-CSF producido por una capa de células alimentadoras de queratinocitos humanos indujo la proliferación tanto de células mieloblásticas humanas KG-1 como Kasumi-1 que expresan al receptor de G-CSF en el que las poblaciones de células están separadas por una membrana semipermeable.

Los queratinocitos humanos se cultivaron en medio EpiLife con el suplemento S7 de Invitrogen a una confluencia de > 70% en una placa de cultivo de tejidos de cocultivo Transwell® (Corning, Lowell, MA) de 24 pozos recubierta con colágeno. Los queratinocitos se transfectaron de manera inversa con 750 ng del ARNm indicado modificado químicamente complejo con RNAiMAX de Invitrogen como se describe por triplicado. El complejo ARNm:

RNAiMAX se formó como se describe. El medio de queratinocitos se intercambió 6-8 horas después de la transfección. 42 horas después de la transfección, el inserto de la placa Transwell® de 24 pozos con una membrana de poliéster semipermeable de poro de 0,4 µm se colocó en la placa de cultivo que contiene queratinocitos transfectados con ARNmod de hu-G-CSF. La Figura 5A es una tabla que muestra los resultados de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para G-CSF humano secretado a partir de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* muestreadas de pozos individuales en una placa de cultivo de tejidos de 24 pozos cocultivada 42 horas después de la transfección con 750 ng de cada uno de los ARNmod indicado que codifica hu-G-CSF.

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

El ARNmod de hu-G-CSF transfectado en células alimentadoras de queratinocitos humanos y células mieloblásticas humanas no transfectadas se detectaron mediante RT-PCR. El ARN total de las células de la muestra se extrajo y se lisó utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total extraído se envió a RT-PCR para la amplificación específica del ARNmod-G-CSF utilizando el kit de RT-PCR ProtoScript® M-MuLV Taq (New England BioLabs, Ipswich, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con cebadores específicos hu-G-CSF (véase más abajo). Los productos de RT-PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Figura 5B). La Tabla 6 a continuación muestra cuales ARNmod se corrieron en el gel de agarosa.

Tabla 6

Carril	Tipo de célula	ARNmod objetivo de hu-G-CSF por RT-PCR
1	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Vehículo
2	Alimentadora de queratinocitos KG-1	ARN mezclado
3	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Sin modificación
4	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Química 7
5	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Química 6
6	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Química 37
7	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	vehículo
8	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	ARN mezclado
9	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Sin modificación
10	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Química 7
11	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Química 6
12	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Química 37
13	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Química 46
14	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Química 48
15	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Química 49
16	Alimentadora de queratinocitos KG-1	Química 53
17	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Química 46
18	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Química 48
19	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Química 49

20	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	Química 53
21	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	vehículo
22	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	vehículo
23	Alimentadora de queratinocitos Kasumi-1	vehículo
24	Kasumi 1	ARN mezclado
25	KG-1	Sin modificación
26	Kasumi 1	Química 7

(continuación)

Carril	Tipo de célula	ARNmod objetivo de hu-G-CSF por RT-PCR
27	Kasumi 1	Química 6
28	Kasumi 1	Química 37
29	Kasumi 1	Química 46
30	Kasumi 1	Química 48
31	Kasumi 1	Química 49
32	Kasumi 1	Química 53
33	KG-1	vehículo
34	KG-1	ARN mezclado
35	KG-1	Sin modificación
36	KG-1	Química 7
37	vacío	vacío
38	vacío	vacío
39	vacío	vacío
40	vacío	vacío
41	vacío	vacío
42	vacío	vacío
43	vacío	vacío
44	vacío	vacío

5 Estos datos muestran que las células de queratinocitos humanos que contienen ARNmod de hu-G-CSF que comprenden análogos de nucleótidos químicamente distintos secretaban la proteína hu-G-CSF y el hu-G-CSF secretado era fisiológicamente activo en la inducción de la proliferación de células mieloblásticas humanas que expresan el receptor de G-CSF. Estos datos también muestran que la proteína hu-G-CSF secretada era permeable a través de una membrana semipermeable y actuó sobre una población celular diferente que no produce G-CSF. Además, estos datos muestran que el ARNmod de hu-G-CSF transfectado en células de queratinocitos humanos en un entorno de cocultivo estaba presente solo en las células de queratinocitos transfectados y no en las células mieloblásticas no transfectadas. Además, estos datos muestran que la composición química de nucleótidos modificada del ARNmod de hu-G-CSF no afectó la actividad de la proteína resultante.

Ejemplo 5. El efecto del ARNmod sobre la viabilidad celular

Citotoxicidad y apoptosis:

Este experimento demuestra la viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis para distintas células de queratinocitos humanos transfectados *in vitro* con ARNmod. Los queratinocitos se cultivan en medio EpiLife con suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos en ausencia de hidrocortisona de Invitrogen a una confluencia de >70%. Los queratinocitos se transfectan de manera inversa con 0 ng, 46,875 ng, 93,75 ng, 187,5 ng, 375 ng, 750 ng, 1.500 ng, 3.000 ng, o 6.000 ng de ARNmod complejado con RNAiMAX de Invitrogen. Se forma el complejo ARNmod: RNAiMAX. La concentración de huG-CSF secretada en el medio de cultivo se mide a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas después de la transfección para cada concentración de cada ARNmod por triplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano de los queratinocitos humanos transfectados se cuantifica utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. La viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis se miden a las 0, 12, 48, 96 y 192 horas después de la transfección utilizando el kit ApoToxGlo de Promega (Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Ejemplo 6. Cocultivo

El ARNm modificado que comprende nucleótidos modificados químicamente de forma diferente que codifican el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano puede estimular la proliferación celular de una célula incompetente para la transfección en un ambiente de cocultivo. El cocultivo incluye un tipo de célula altamente transfectable, tal como un queratinocito humano y un tipo de célula incompetente para la transfección, tal como un glóbulo blanco (WBC). El ARNm modificado que codifica G-CSF puede transfectarse en la célula altamente transfectable, lo que permite la producción y secreción de la proteína G-CSF en el entorno extracelular donde el G-CSF actúa de forma paracrina para estimular los glóbulos blancos que expresan el receptor de G-CSF para proliferar. La población de WBC expandida se puede usar para tratar a pacientes inmunocomprometidos o reconstituir parcialmente la población de WBC de un paciente inmunodeprimido y así reducir el riesgo de infecciones oportunistas.

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

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

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

estructura del ácido nucleico modificado (ARNm) con protección de 5':

La protección de 5'-ARNmod puede completarse concomitantemente durante la reacción de transcripción *in vitro* utilizando los siguientes análogos de cap de ARN químico para generar la estructura de cap de 5'-guanosina de acuerdo con los protocolos del fabricante: 3'-O-Me-m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G; G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')A; m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). La protección de 5'-ARNmod puede completarse después de la transcripción utilizando una enzima de protección del virus vacuna para generar la estructura "Cap 0": m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). La estructura la Cap 1 se puede generar utilizando tanto la enzima de protección del virus vacuna-como una 2'-O-metiltransferasa para generar: m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G-2'-O-metilo. La estructura de Cap 2 puede generarse a partir de la estructura de Cap 1 seguida por la 2'-O-metilación del antepenúltimo nucleótido 5' usando una 2'-O-metil-transferasa. La estructura de Cap 3 se puede generar a partir de la estructura de Cap 2 seguida de la 2'-O-metilación del preantepenúltimo nucleótido 5' utilizando una 2'-O-metiltransferasa. Las enzimas se derivan preferiblemente de una fuente recombinante.

Secuencias:

ADNc de G-CSF:

agcttttgaccctcgtacagaagctaatacgaactcactatagggaaataagagagaaaagaagagtaagaagaaatataagag  
ccaccatggccggtcccgcgacccaaagcccatgaaacttatggccctgcagttgctgctttggcactcggccctctggacagtccaaga  
agegactcctctcggacctgcctcatcgttgccgcagtcattcctttgaaagtgtctggagcaggtgcgaaagattcagggcgatggagccg  
cactccaagagaagctctgcgcgacatacaaactttgcatcccaggagctcgtactgctcgggcacagcttggggattcctgggctcc  
tctctcgtcctgtccgtcgcaggctttgcagttggcaggggtgcctttccagctccactccggtttgttctgtatcagggactgctgcaagccc  
ttgagggaaatctcgcagaattggggcccgacgtggacacgttgacgtcgcagctggcggatttcgcaacaacctctggcagcagatgg  
aggaactggggatggcaccgcgctgcagcccacgcagggggcaatgccggcctttgctccgctttcagcgcagggcggggtggagt  
cctcgtagcgcagccacttcaatcattttggaagtctcgtaccgggtgctgagacatcttgcgcagccgtgaagcgtgccttctgcggggc  
ttgcttctggccatgcccttctctcccttgacctgtaccttggctttgaataaagcctgagtaggaaggcggccgctcgcagcatgca  
tctagagggccaattcgcctattcgaagtgc (SEQ ID NO: 1)

ARNm de G-CSF:

agcuuuuggaccucguacagaagcuaauacgacucacuauagggaaauagagagaaaagaagaguaagaagaaau  
auaagagccaccauggccggucccgacccaaagcccaugaaacuauagggccugcaguugcugcuuuggcacucggcccu  
cuggacaguccaagaagcgacuccucggaccugccuacguugccgcagucuuuuugaagugucuggagcaggug  
cgaaagauucagggcgauggagccgcacuccaagagaagcucugcgcgacauacaacuugccaucggaggagcucguacu  
gcucgggcacagcuuggggauuccugggcuccucucguccuguccgucgagccuuugcaguuggcagggugccuuuc  
ccagcuccacuccgguuuuguucuaucagggacugcugcaagcccuugaggggaucucgccagaaugggcccgcgucg  
gacacguugcagcucgacguggcggauuucgcaacaaccaucuggcagcagauggaggaacuggggauuggcaccgcgucg  
agcccacgcagggggcaaugccggccuuugcguccgcguuucagcgcagggcggguggaguccucguagcagccaccuuc  
aucauuuuuggaagucucguaccgggugcugagacaucucgagccgugaagcgcugccuucgcccggcuugccuuc  
ggccaugcccuucucuccuugcaccuguaaccucuuuggucuuugaauaaagccugaguaggaaggcggccgucgagca  
ugcaucuagagggcccaauucgcccuaucgaagucg (SEQ ID NO: 2)

5 Proteína G-CSF:

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKI  
QGDGAALQEKLVSECATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS QLHS  
GLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPA  
FASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVS YRVLRLHLAQP (SEQ ID NO: 3)

Cebadores de síntesis de ADNc:

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

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

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

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

## ES 2 737 960 T3

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

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

Otras realizaciones

- 5 Se debe entender que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un ARN mensajero modificado que comprende un nucleótido modificado, dicho nucleótido modificado que comprende una o más modificaciones químicas de un nucleótido natural, en el que el nucleótido modificado reduce la inducción de la respuesta inmune innata celular de una célula al ácido nucleico modificado cuando el ácido nucleico modificado se introduce en la célula, en comparación con la inducción de la respuesta inmune innata celular en una célula inducida por un ácido nucleico no modificado correspondiente, en el que el ARN mensajero tiene más de 30 nucleótidos de longitud y en el que el 100% de los nucleótidos naturales correspondientes han sido reemplazados con:
- i. 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina y N1-metil-pseudo-uridina,
  - ii. 5-metil-citidina y N1-metil-pseudo-uridina, o
  - iii. 25% de N1-metil-pseudo-uridina y 75% de pseudo-uridina.
2. El ARN mensajero modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nucleótido reduce la respuesta inmune innata o la secreción de citoquinas proinflamatorias o ambas al menos aproximadamente el 10%.
3. El ARN mensajero modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nucleótido reduce la respuesta inmune innata o la secreción de citoquinas proinflamatorias o ambas en aproximadamente un 75%.
4. El ARN mensajero modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nucleótido reduce la respuesta inmune innata o la secreción de citoquinas proinflamatorias o ambas al menos en un 90%.
5. El ARN mensajero modificado de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una región traducible que codifica una proteína de interés.
6. Una composición que comprende un ARN mensajero modificado de acuerdo con la reivindicación 5, en una cantidad suficiente para aumentar la producción de la proteína de interés cuando se introduce en una célula objetivo, en comparación con la cantidad de proteína producida en una célula que contiene un ácido nucleico no modificado correspondiente que codifica la proteína de interés.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que el aumento es de al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 50%, o al menos aproximadamente el 100%.
8. El ARN mensajero modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el nucleótido modificado tiene una menor afinidad de unión al asociado de unión al surco mayor, reduciendo así la inducción de la respuesta inmune innata celular de una célula al ácido nucleico modificado.
9. El ARN mensajero modificado de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el asociado de unión al surco mayor se selecciona del grupo que consiste en el receptor tipo toll (TLR)3, TLR7, TLR8, gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I), gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma (MDA5) y el laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2).
10. El ARN mensajero modificado de acuerdo con la reivindicación 8, en el que asociado de unión al surco mayor es TLR3, TLR7 o TLR8.
11. El ARN mensajero modificado de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el asociado de unión al surco mayor es RIG-I, MDA5 o LGP2.
12. El ARN mensajero modificado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 8-11, en el que el ARN mensajero tiene una longitud de al menos 300 nucleótidos.

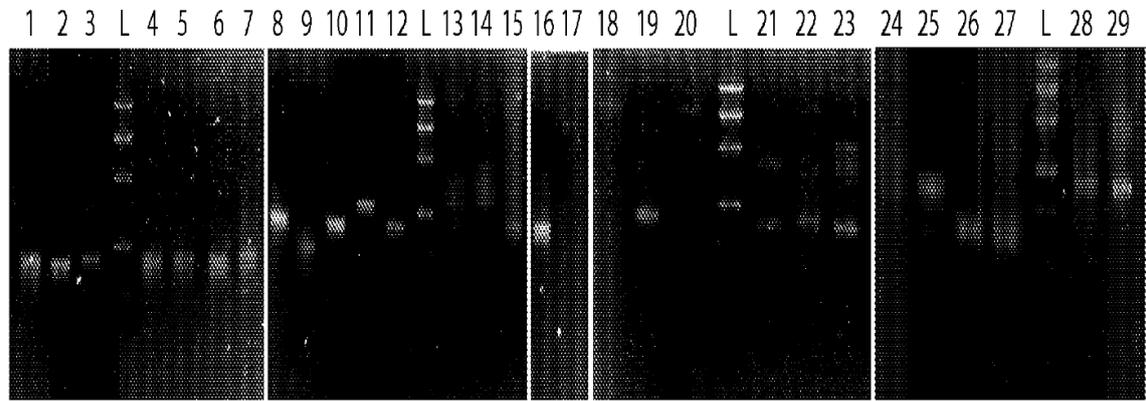


Fig. 1A

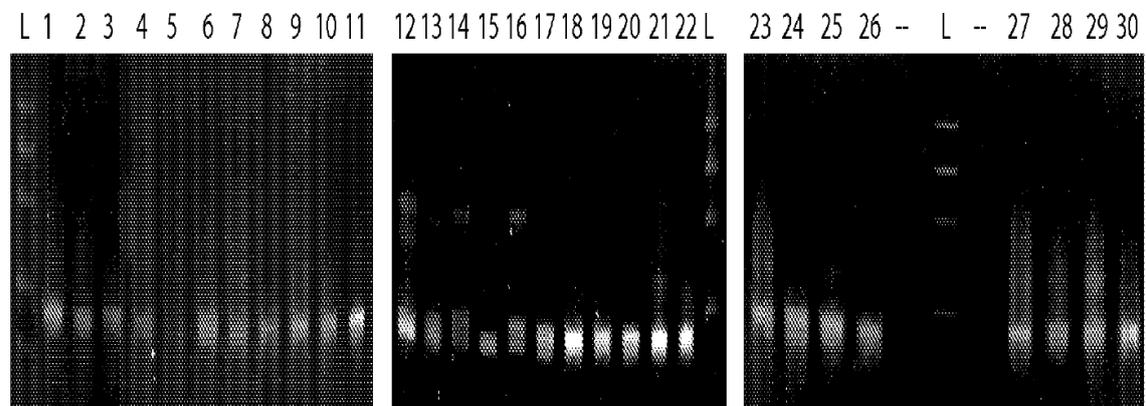
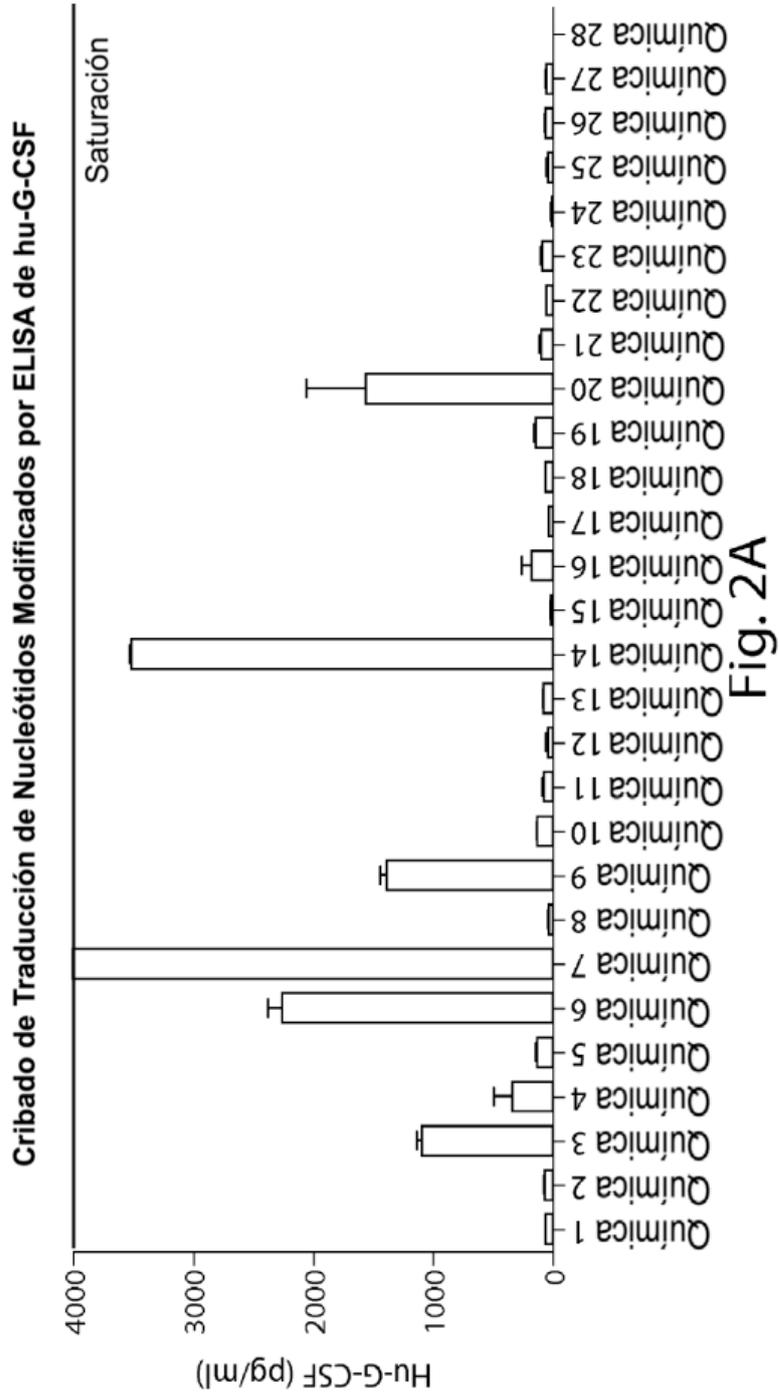


Fig. 1B



Cribado de Traducción de Combinación de Nucleótidos Modificados por ELISA de hu-G-CSF

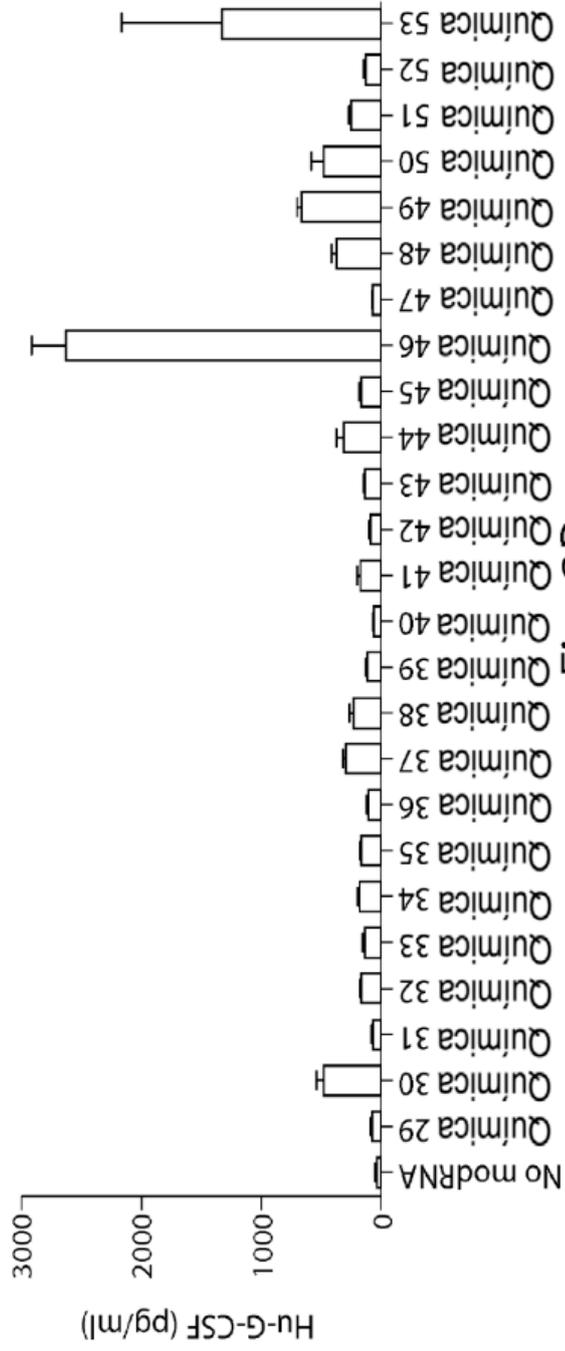
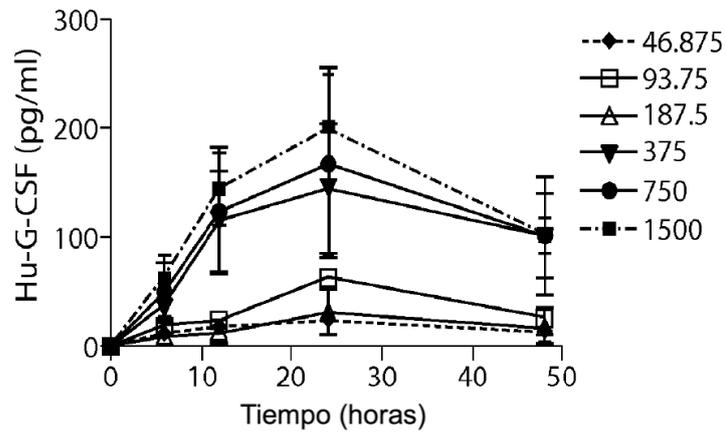


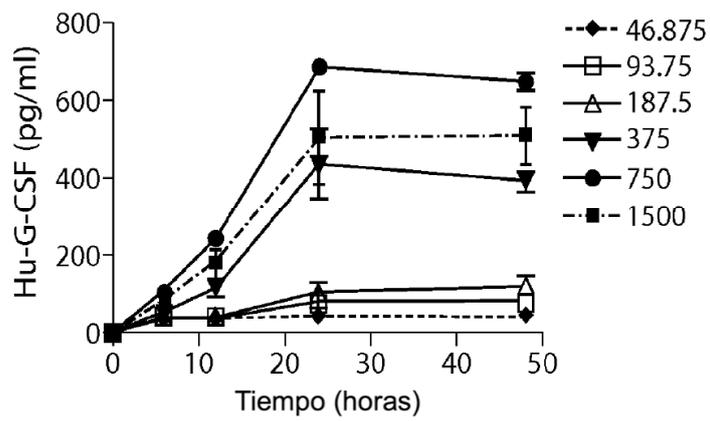
Fig. 2B

**Química 3**



**Fig. 3A**

**Química 4**



**Fig. 3B**

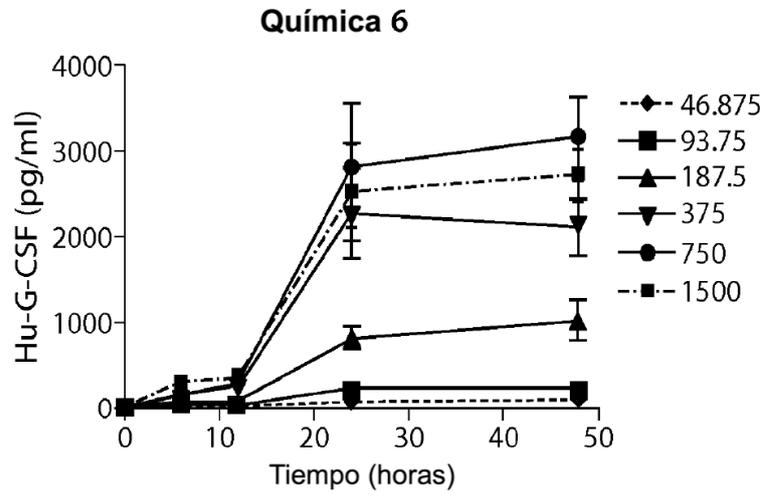


Fig. 3C

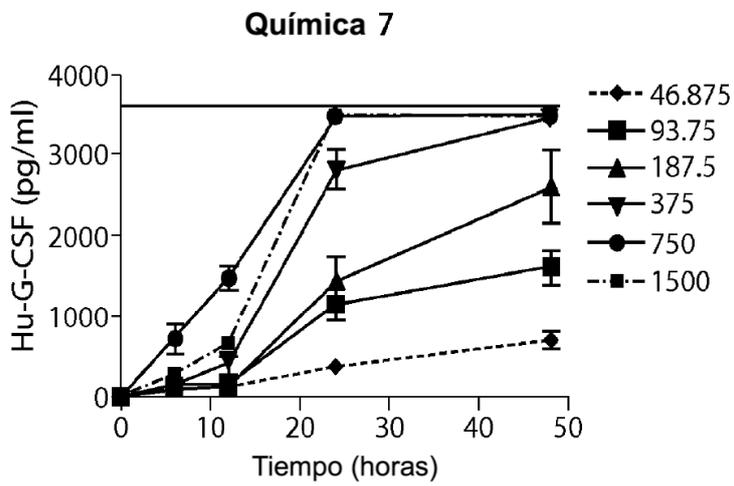


Fig. 3D

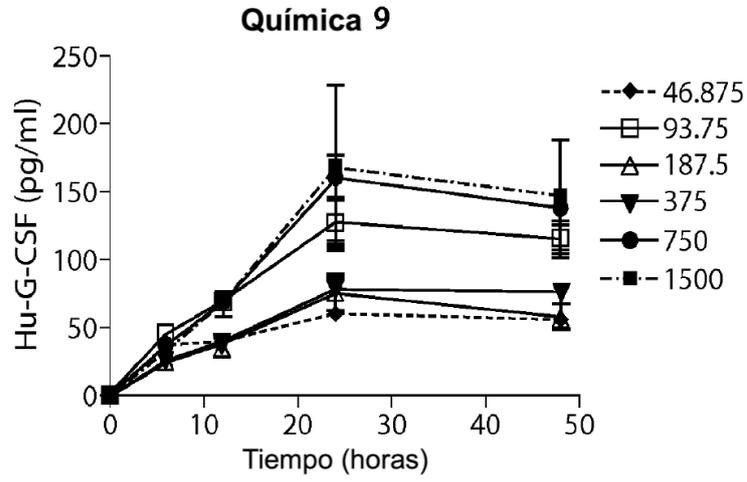


Fig. 3E

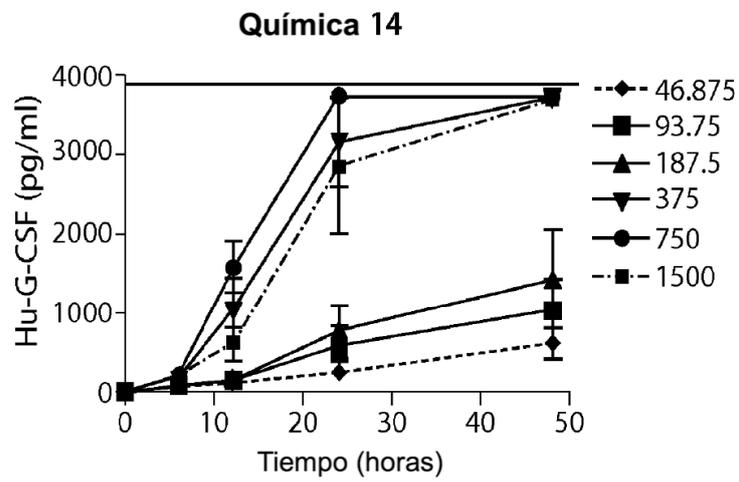


Fig. 3F

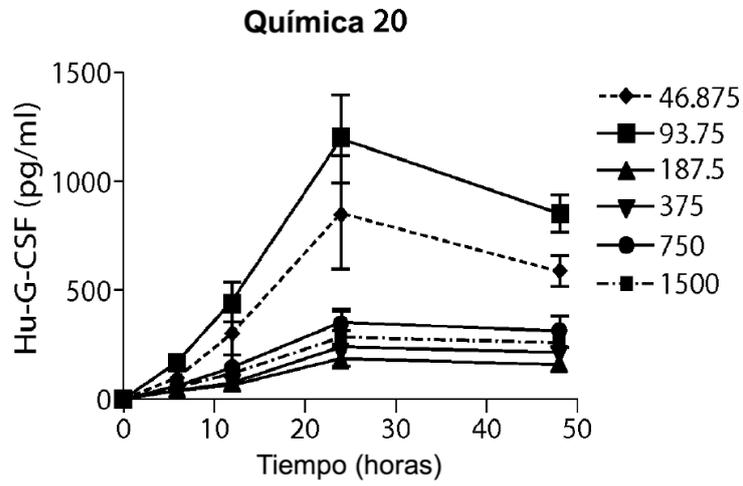


Fig. 3G

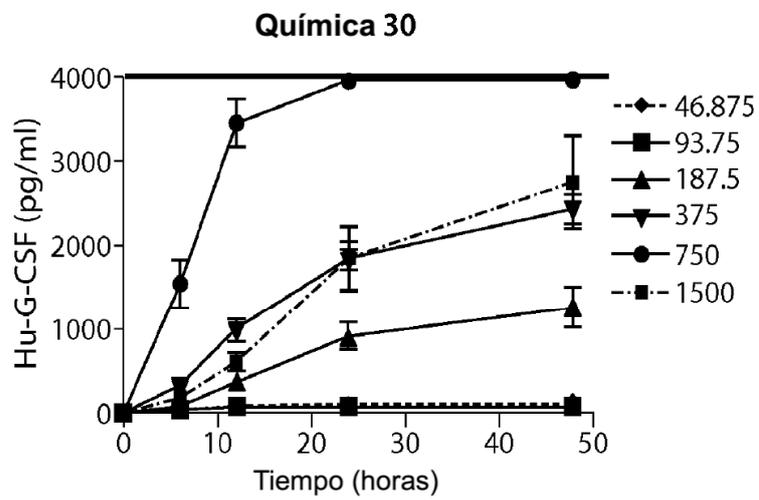


Fig. 3H

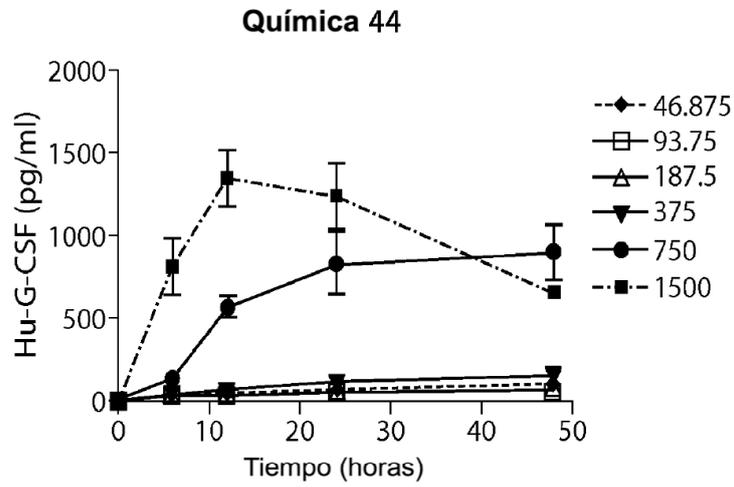


Fig. 3I

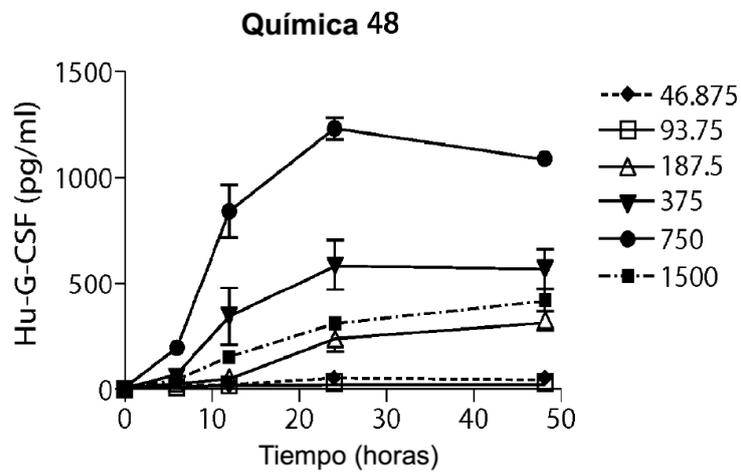


Fig. 3J

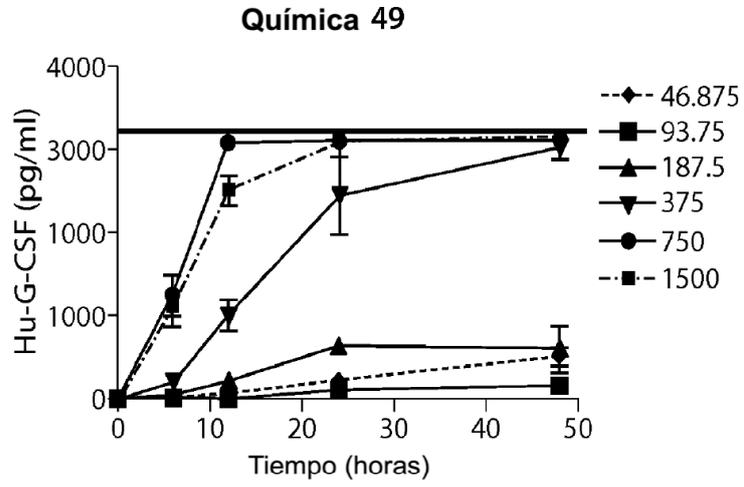


Fig. 3K

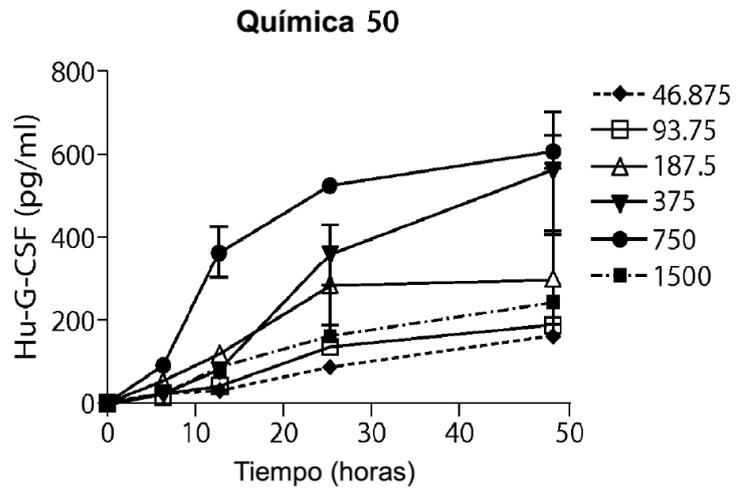


Fig. 3L

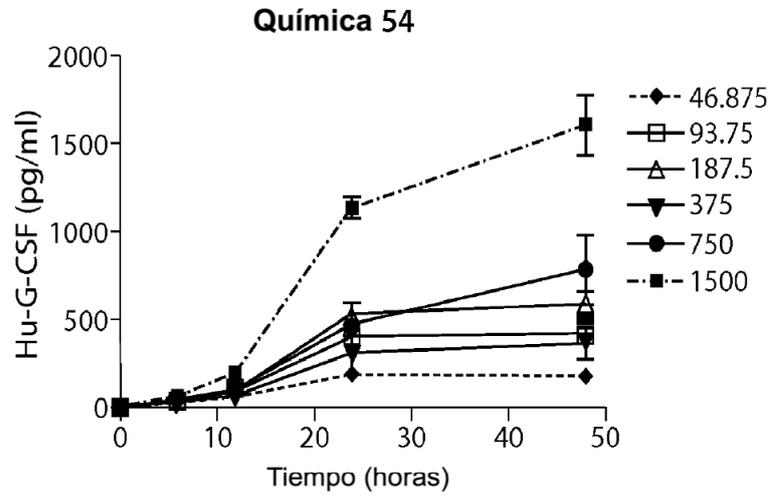


Fig. 3M

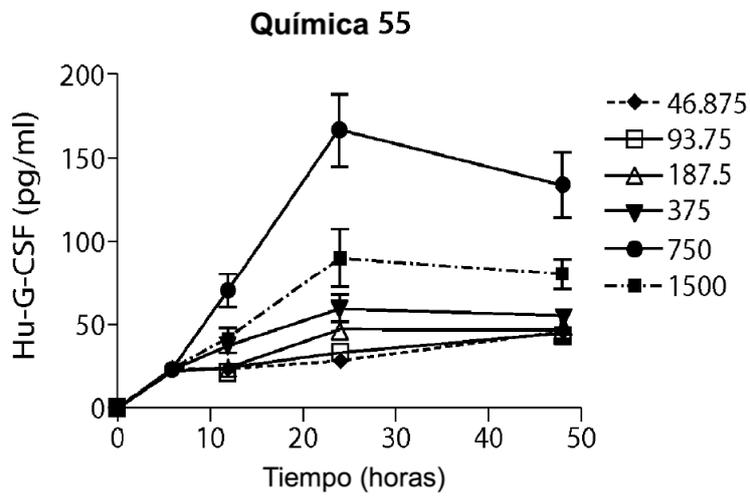


Fig. 3N

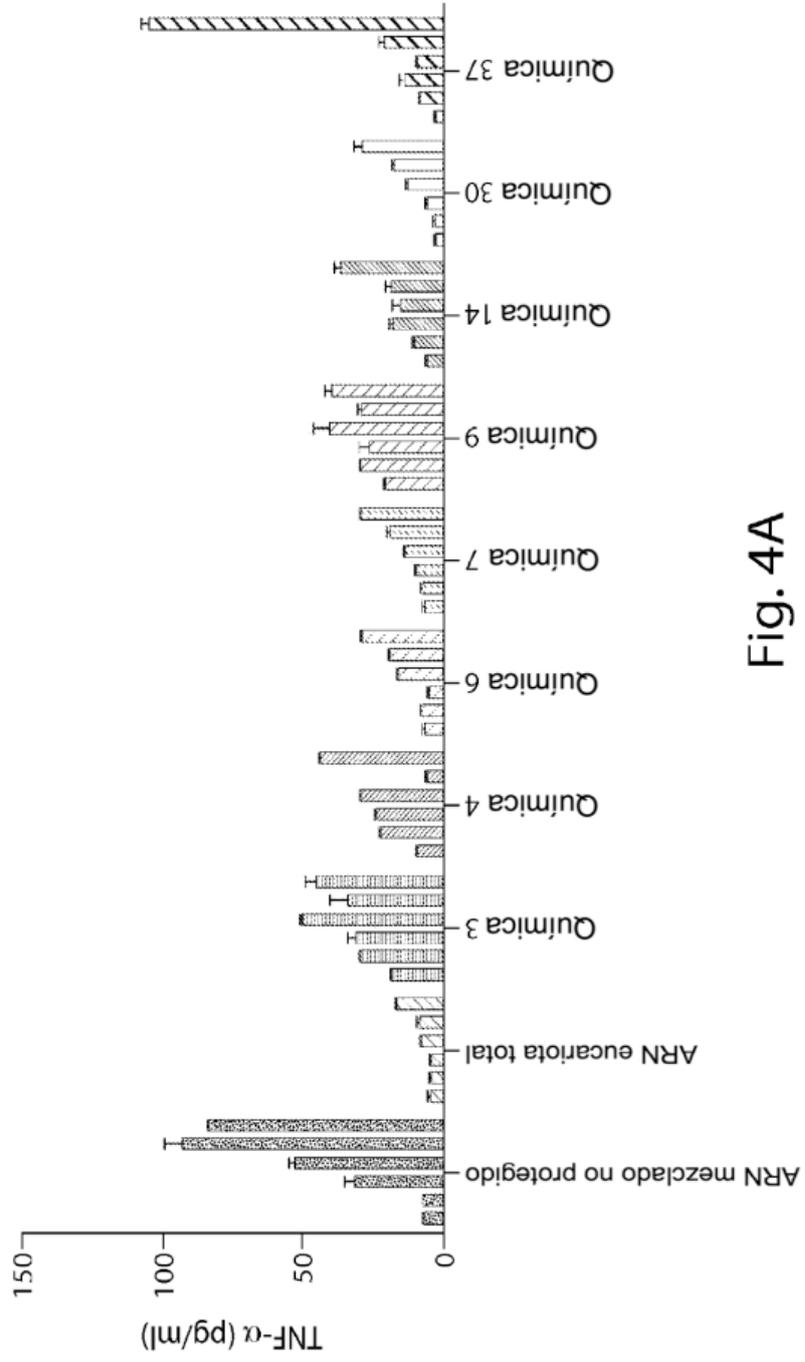


Fig. 4A

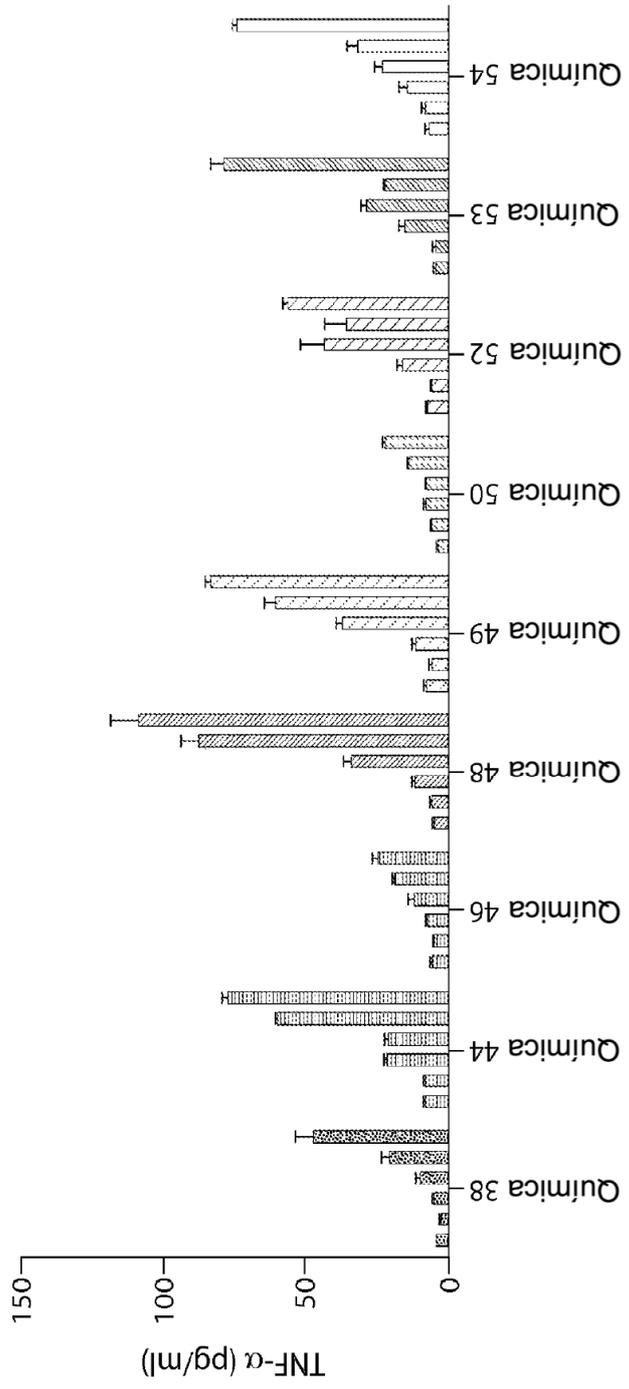


Fig. 4B

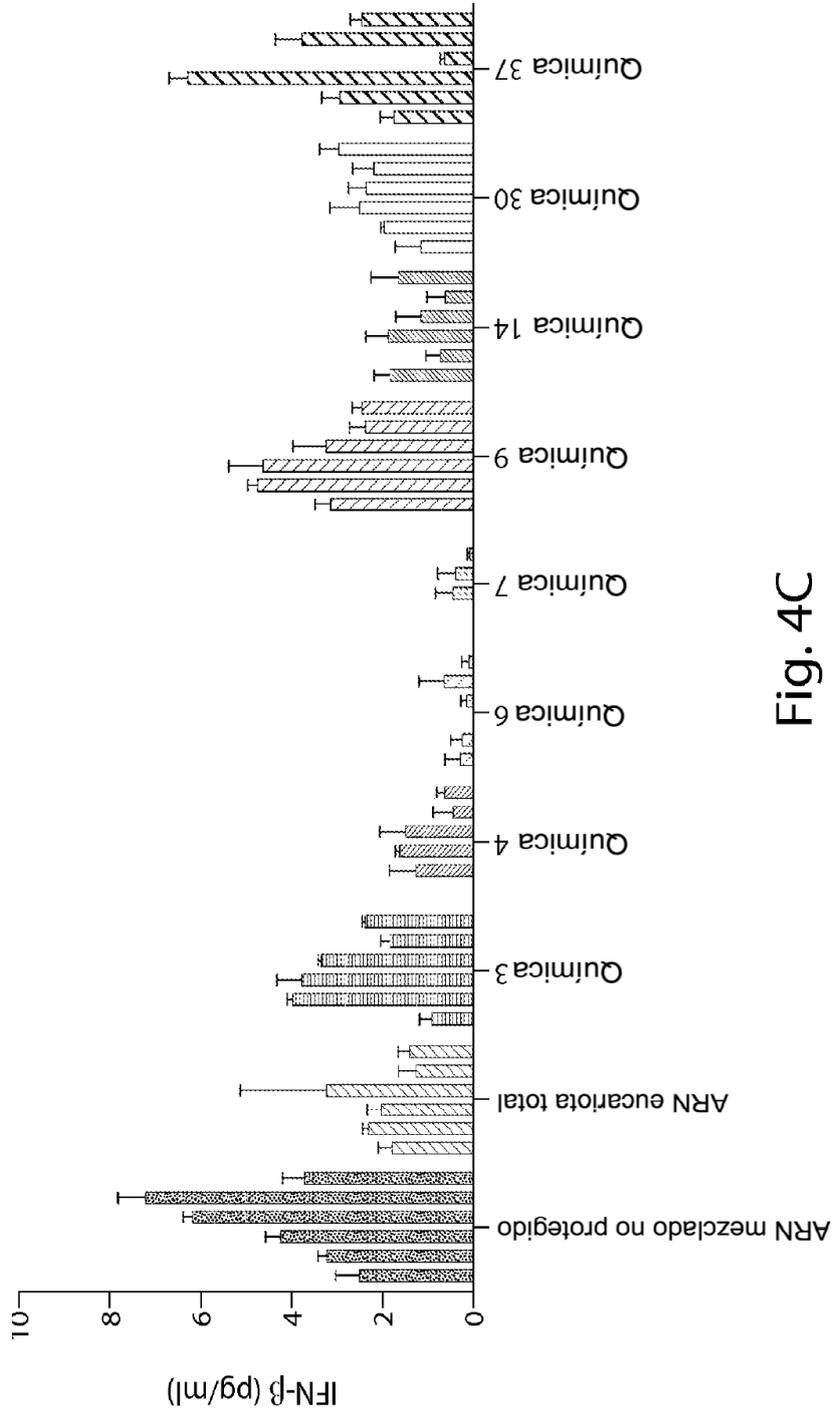
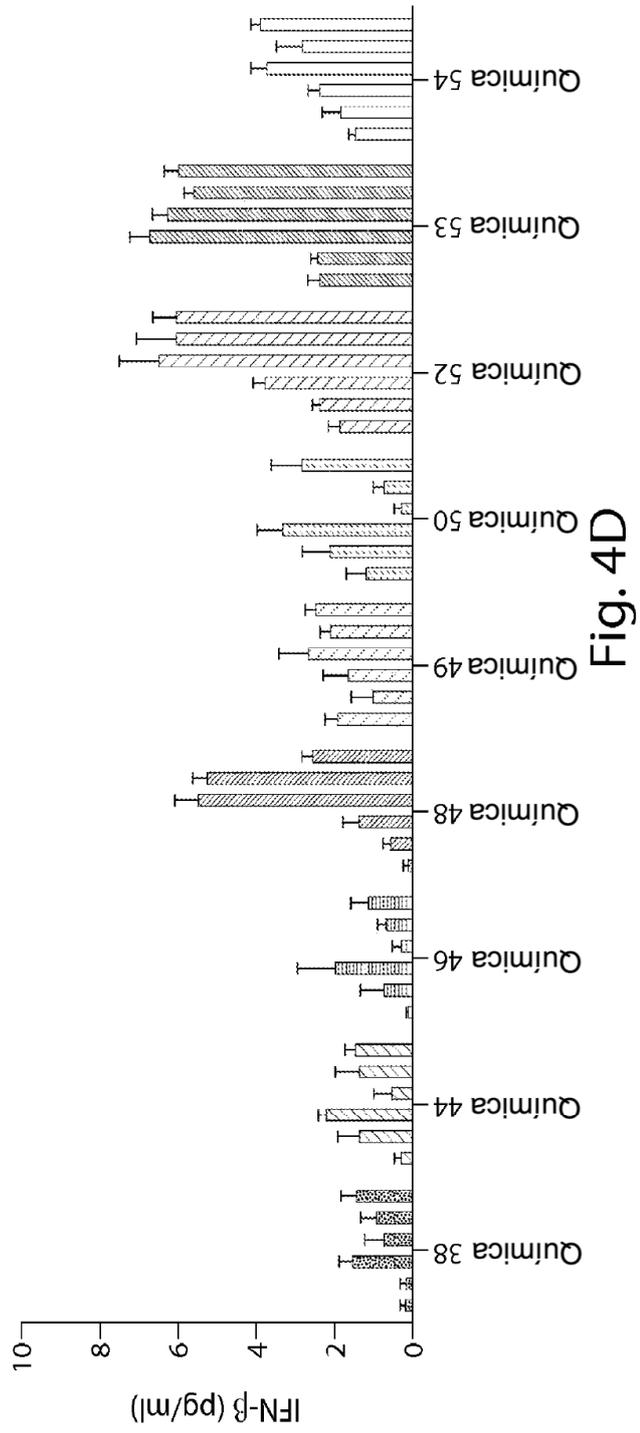


Fig. 4C



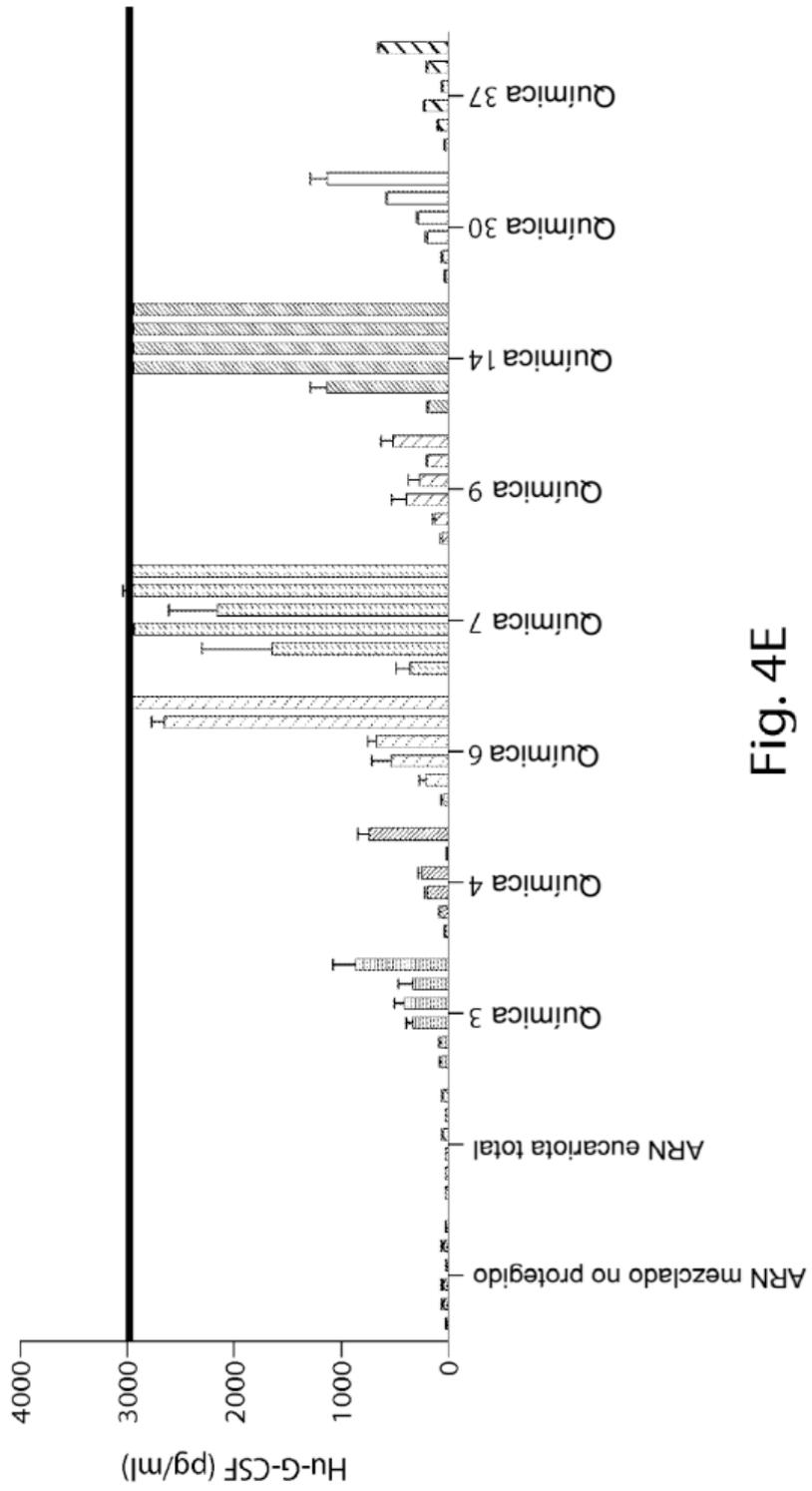


Fig. 4E

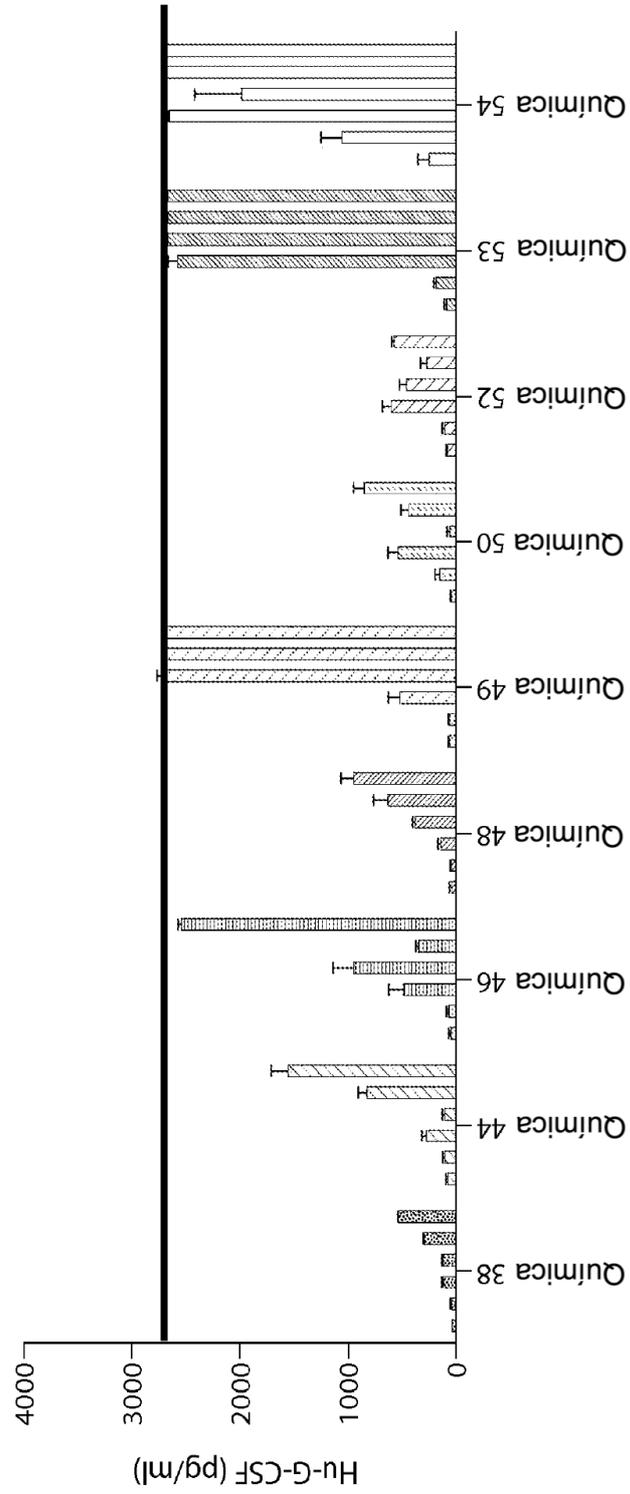


Fig. 4F

ARNmod de Hu-G-CSF	Hu-G-CSF por pozo de queratinocitos (ng/mL)	Hu-G-CSF por pozo de KG-1 (ng/mL)
Vehículo	0.0177	0.0189
Mezcla	0.6217	0.0086
Química 7	≥5	≥5
Química 20	≥5	≥5
Química 46	≥5	≥5
Química 53	≥5	≥5

ARNmod de Hu-G-CSF	Hu-G-CSF por pozo de queratinocitos (ng/mL)	Hu-G-CSF por pozo de Kasumi-1 (ng/mL)
Vehículo	0.0434	0.0256
Mezcla	0.0655	0.3317
Química 6	≥5	≥5
Química 7	≥5	≥5
Química 20	≥5	≥5
Química 37	≥5	≥5
Química 46	≥5	≥5
Química 48	≥5	≥5
Química 49	≥5	≥5
Química 53	≥5	≥5

Fig. 5A

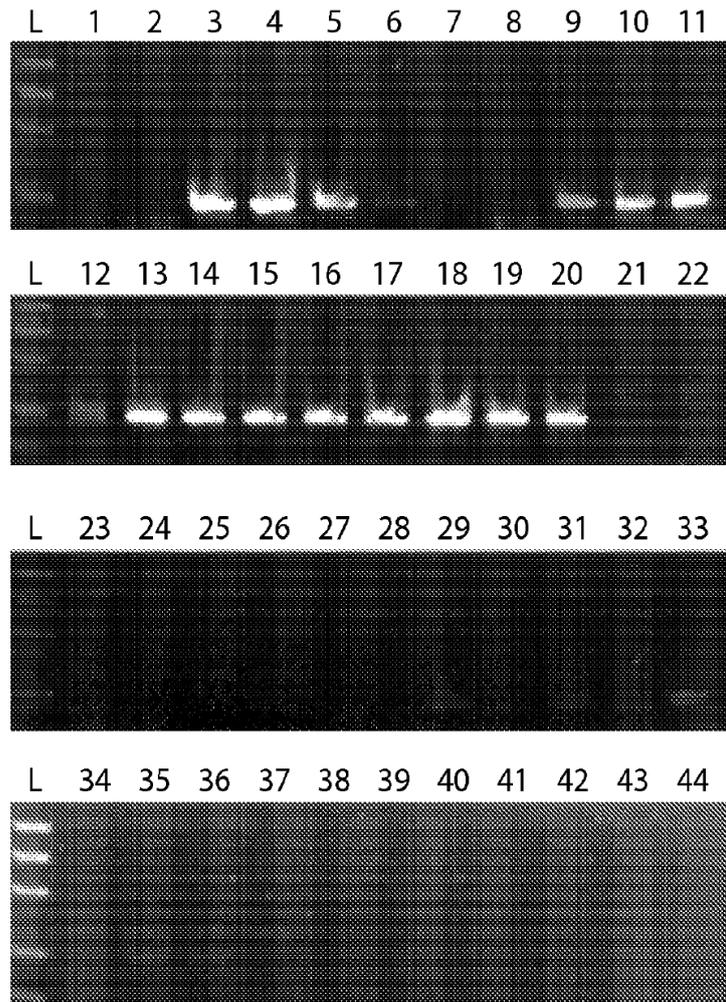
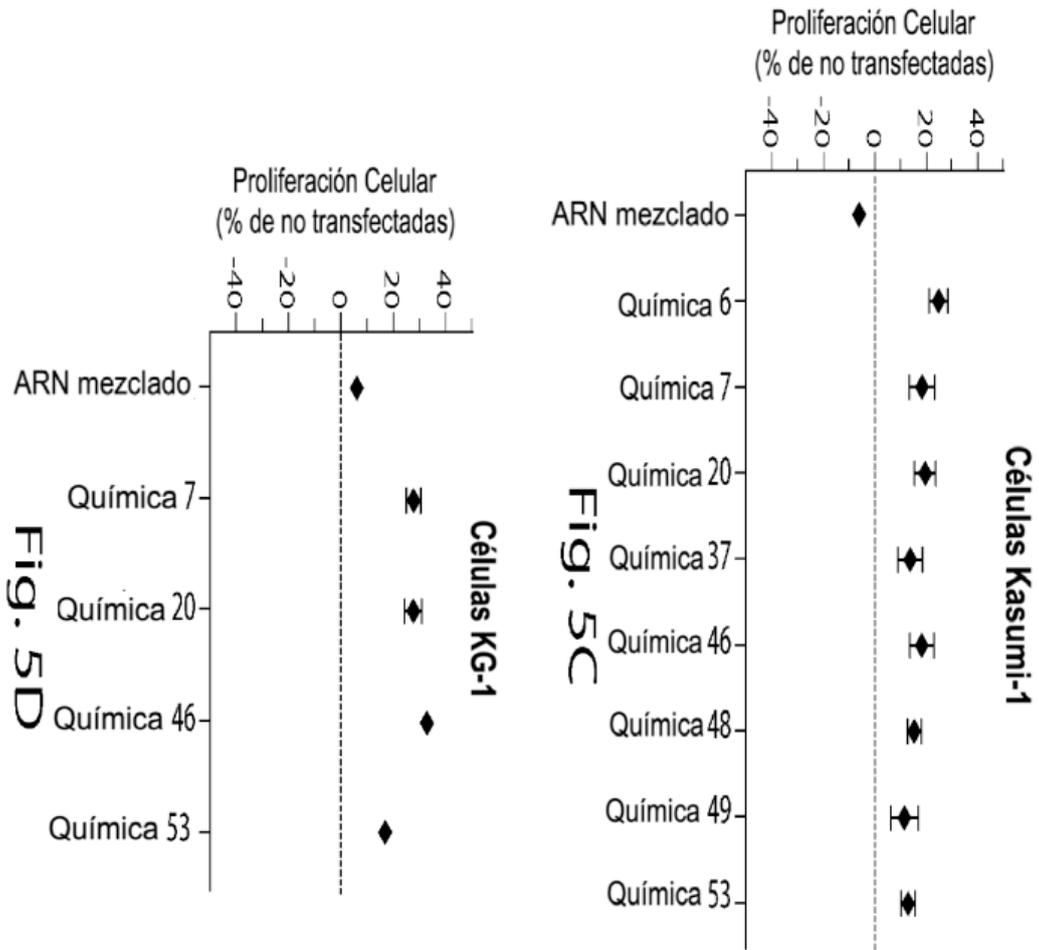


Fig. 5B



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

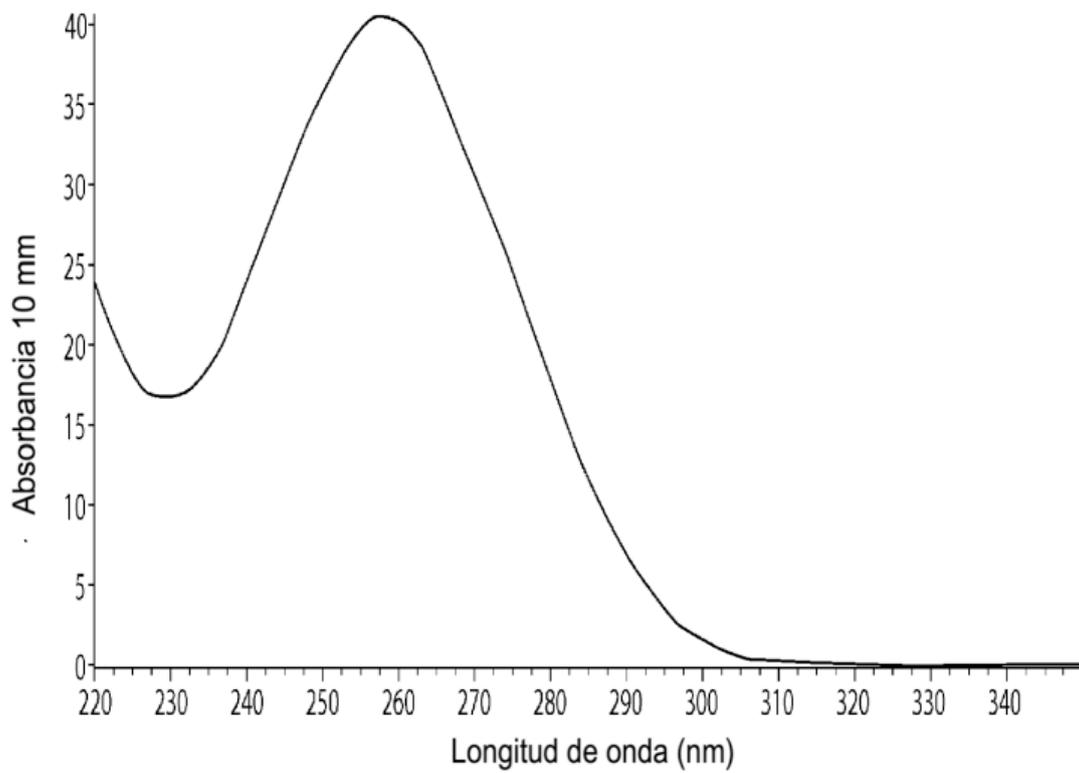


Fig. 6A

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

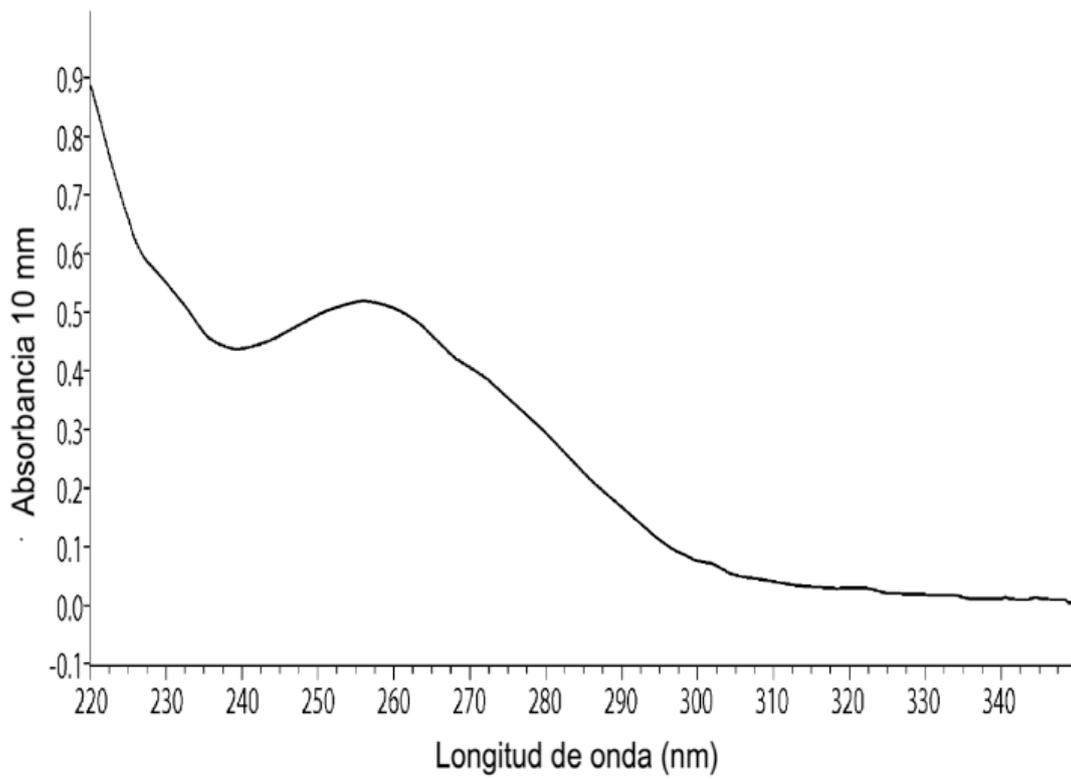


Fig. 6B

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

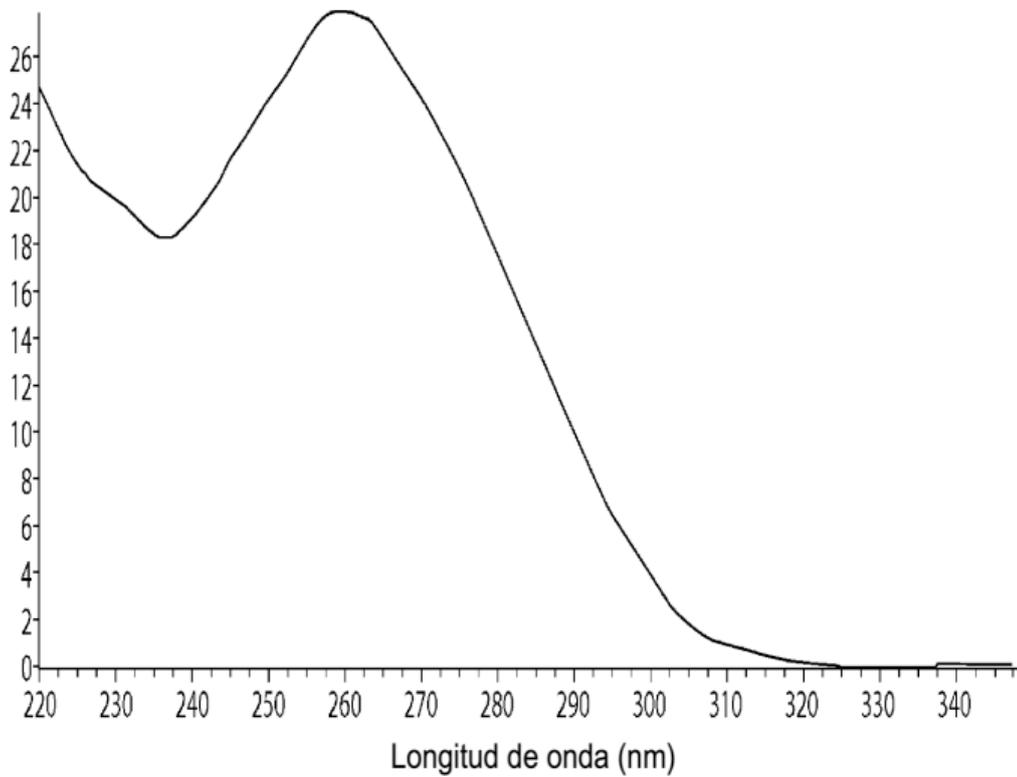


Fig. 6C

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



Fig. 6D

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

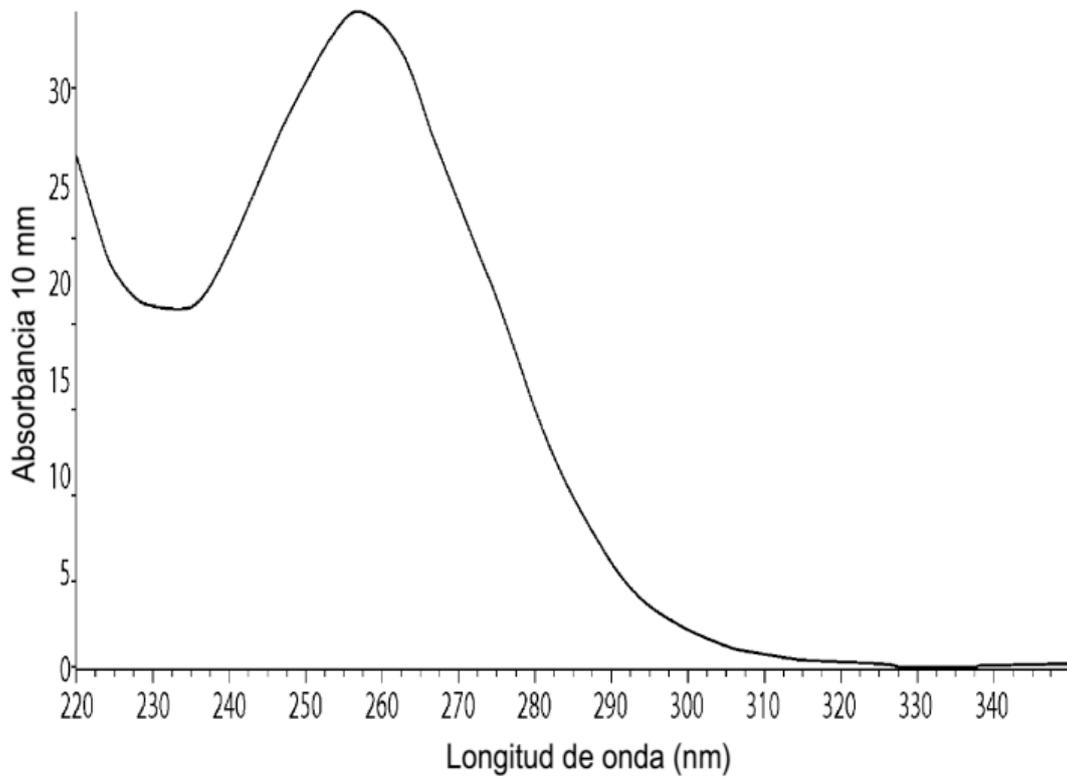


Fig. 6E

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y Hora	Conc. de Ácido Nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
6	5-yodo-UTP	lab	8/15/2011 11:31:06 AM	1179.4	ng/ $\mu$ l	29.486	16.726	1.76	1.10	ARN	40.00

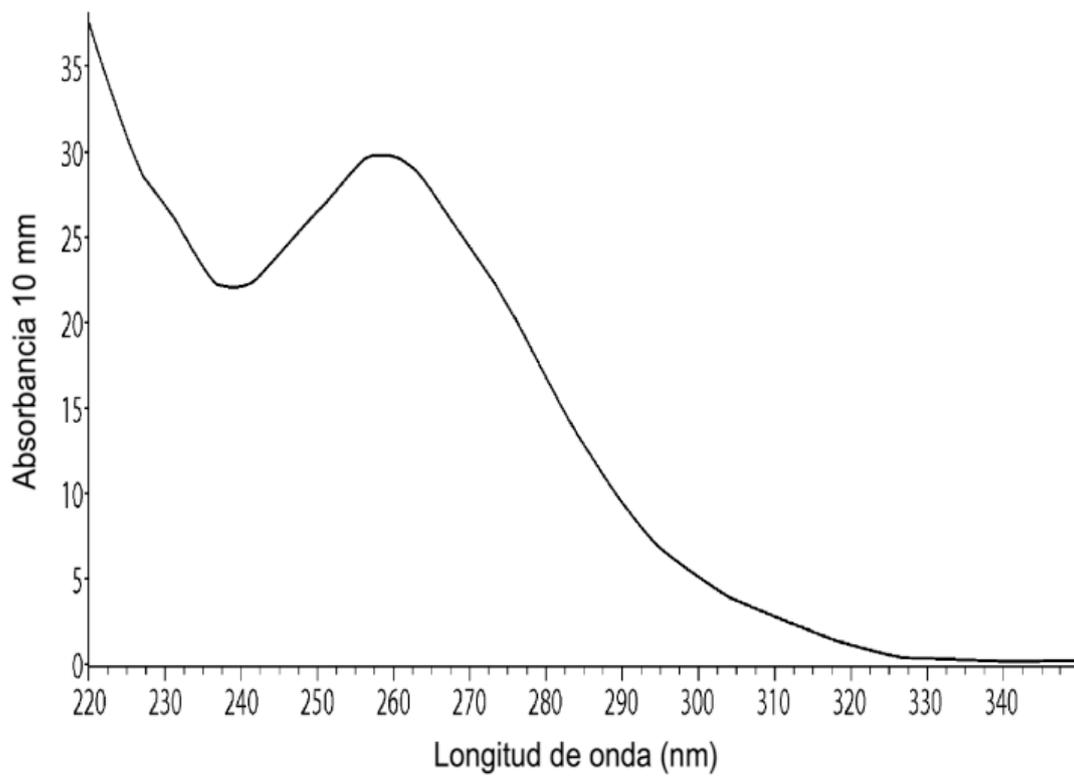


Fig. 6F

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y Hora	Conc. de Ácido Nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
7	N1 metil-pseudoUTP	lab	8/15/2011 11:32:15 AM	1408.1	ng/µl	35.202	18.565	1.90	2.17	ARN	40.00

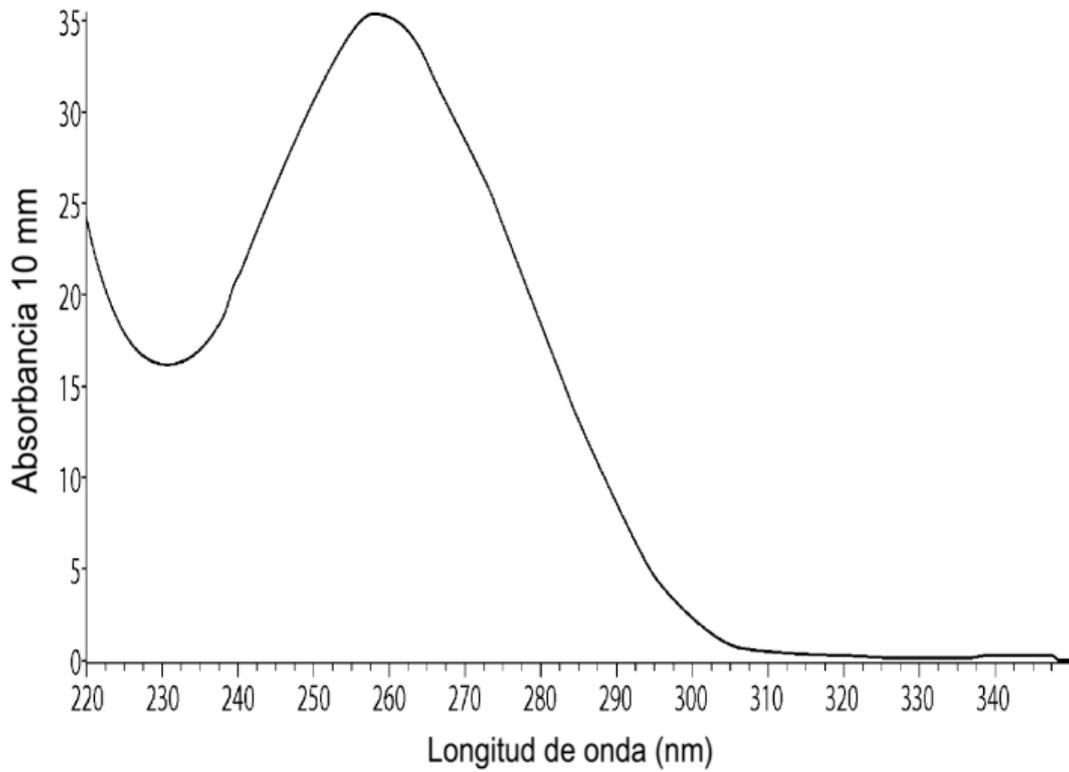


Fig. 6G

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

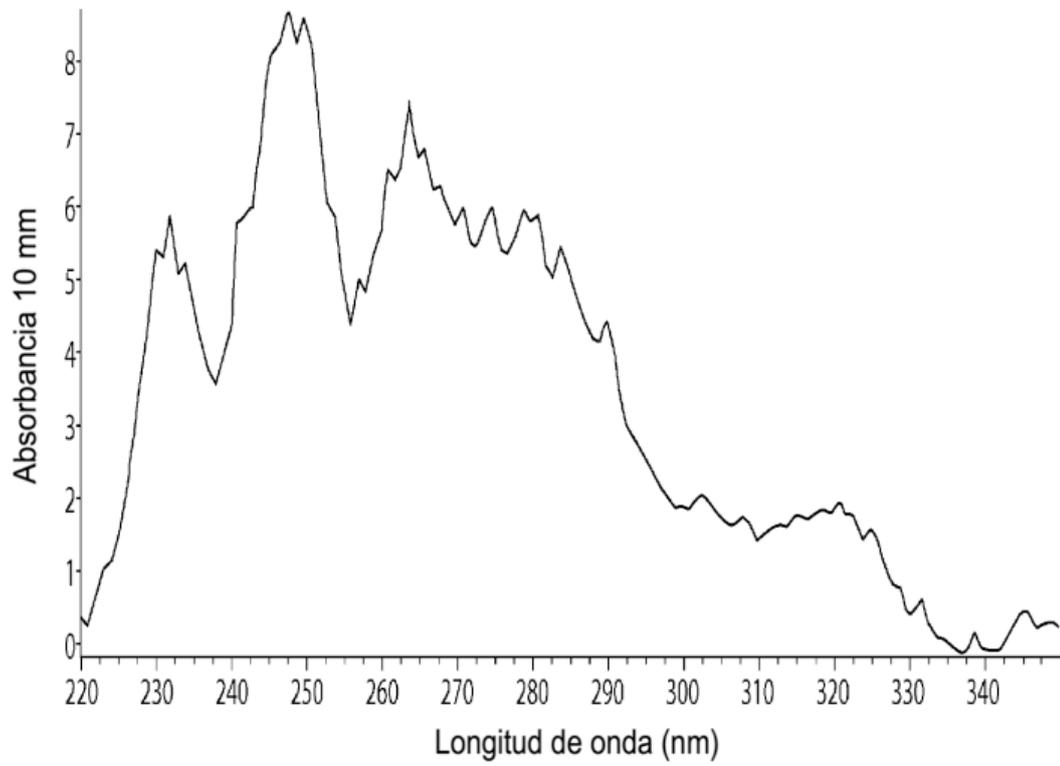


Fig. 6H

#	ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y Hora	Conc. de Ácido Nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
18	N1-metil-GTP	lab	8/15/2011 11:43:10 AM	161.5	ng/μl	4.036	2.917	1.38	0.67	ARN	40.00

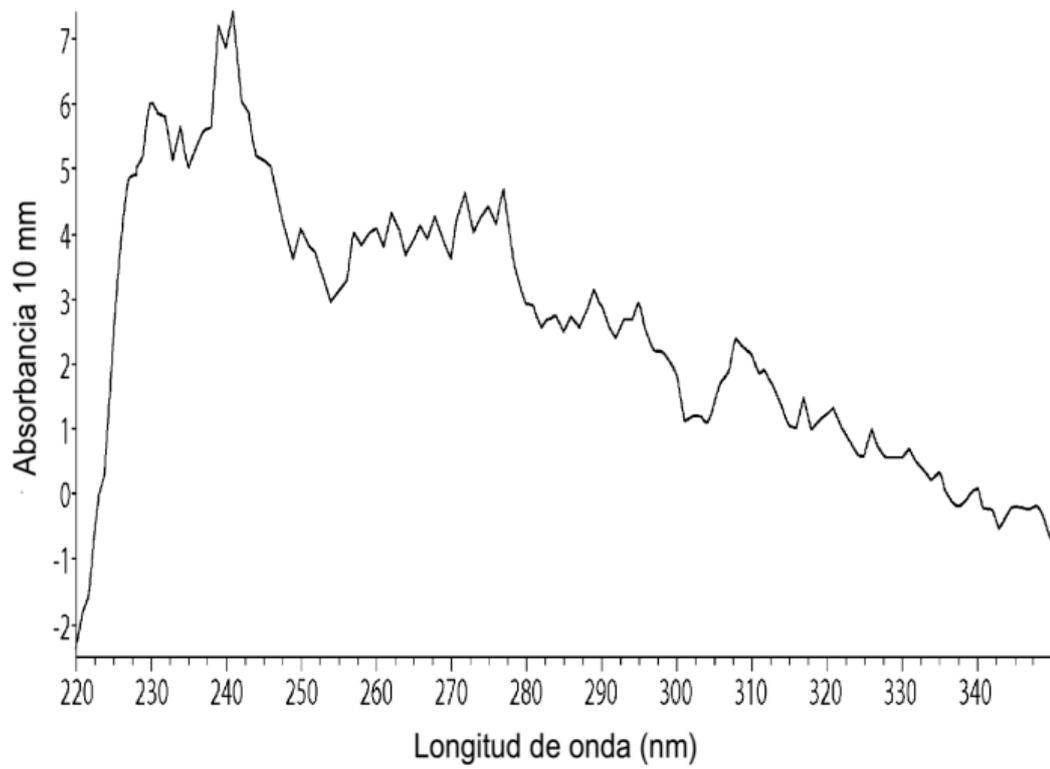


Fig. 6l

ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y Hora	Conc. de Ácido Nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
pseudo-iso-CTP/N1-metil-pseudo-UTP	lab	9/2/2011 3:48:37 PM	1268.3	ng/μl	31.707	17.208	1.84	1.64	ARN	40.00

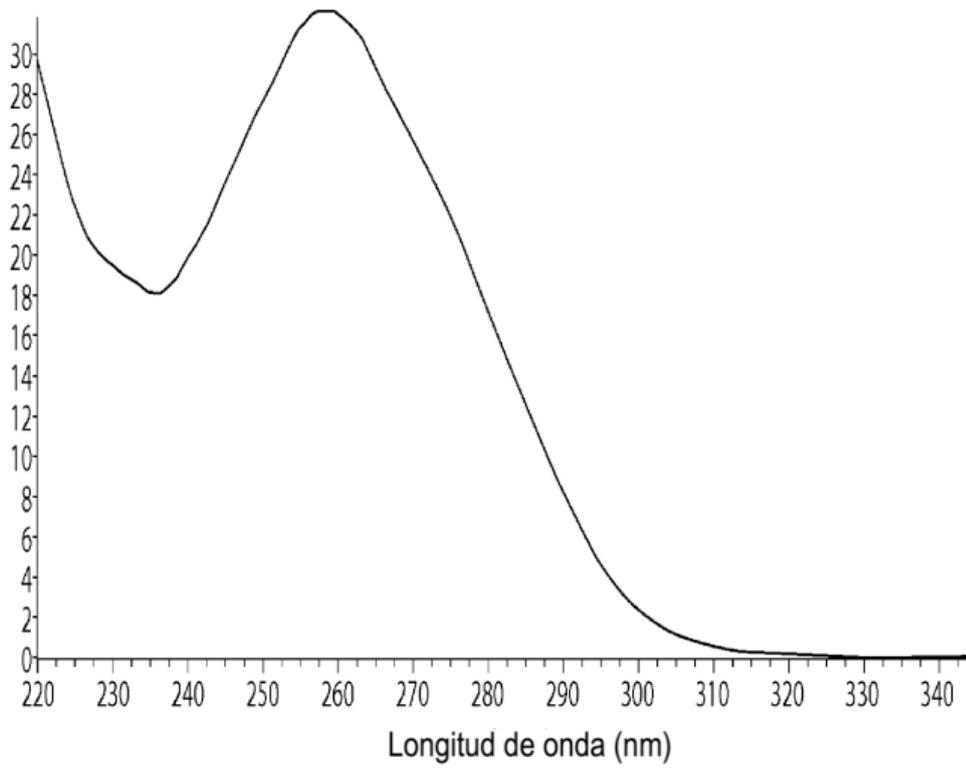


Fig. 6J

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

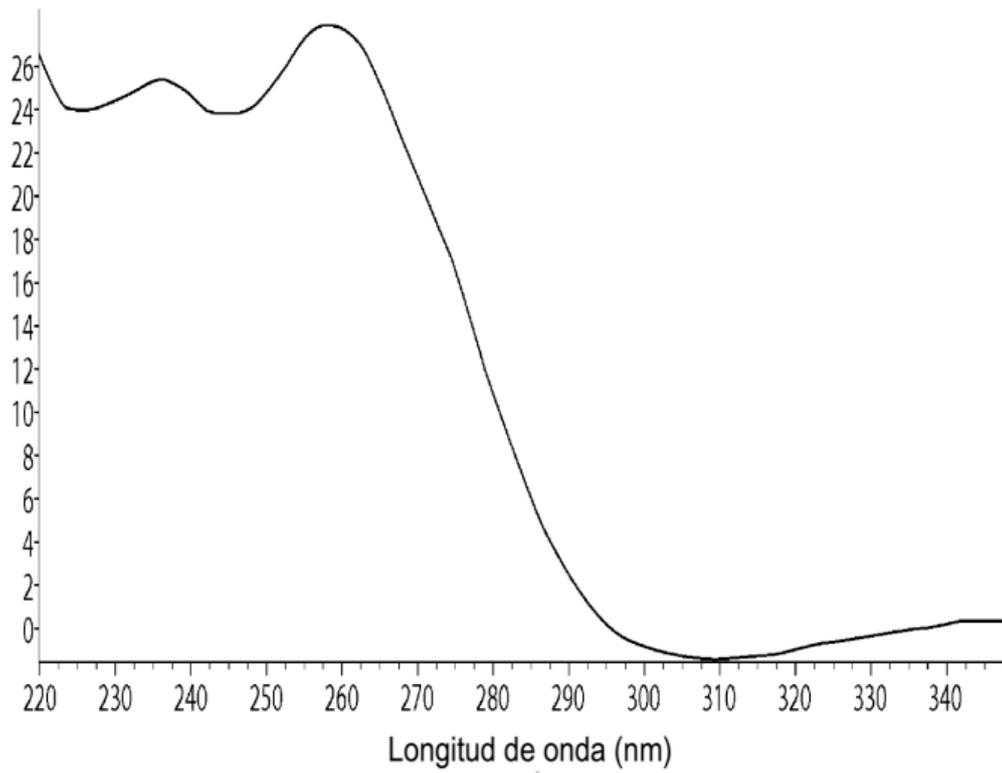


Fig. 6K

ID de la muestra	Nombre de usuario	Fecha y Hora	Conc. de Ácido Nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor
5-Me-CTP/N1-Me-pseudo-UTP	lab	9/12/2011 3:47:12 PM	1094.3	ng/ $\mu$ l	27.358	16.135	1.70	2.11	ARN	40.00

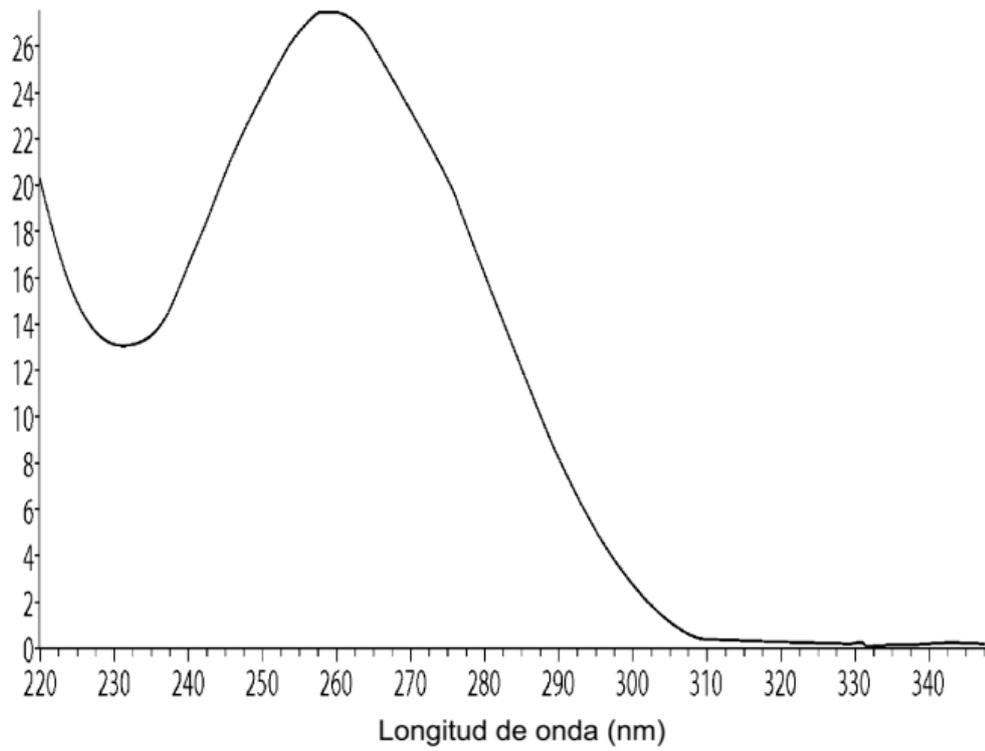


Fig. 6L