

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 243**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2015 PCT/IB2015/052405**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15151048**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015 E 15720455 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3125945**

54 Título: **Moléculas de ARN protegidas y no protegidas y copolímeros de bloques para la administración intracelular de ARN**

30 Prioridad:

01.04.2014 EP 14305472

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

08.05.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITE DE NANTES (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (33.3%)**

72 Inventor/es:

PITARD, BRUNO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 759 243 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

Moléculas de ARN protegidas y no protegidas y copolímeros de bloques para la administración intracelular de ARN

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de la terapia génica, y más particularmente a la vectorización de los ARN mensajeros (ARNm). En particular, la invención se refiere al uso de un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional como un vehículo como los ARNm.

Más específicamente, la invención se refiere a la vectorización de ARNm protegidos y no protegidos mediante una selección de copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere al campo de la terapia génica, y más particularmente a la vectorización de los ARN mensajeros (ARNm). En particular, la invención se refiere al uso de un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional como un vehículo como los ARN mensajeros.

En la técnica se han propuesto diferentes estrategias para el suministro intracelular de compuestos, y más particularmente de moléculas de ARN.

15 En particular, se han sintetizado numerosos vectores catiónicos o agentes de transfección catiónicos no víricos, y actualmente se usan para el suministro de ácidos nucleicos en células cultivadas. El principio del suministro génico no vírico se basa en la interacción de ácidos nucleicos con restos catiónicos presentes en el vector a través de fuerzas electrostáticas.

20 El documento WO2003018603A1 se refiere a derivados lipídicos de aminoglicósidos para transfección. Este documento enseña el uso de los lipoaminoglicósidos como nanoportadores para el suministro de ácidos nucleicos. Tales lipoaminoglicósidos están compuestos generalmente de una cabeza polar, que es un aminoglicósido, de un espaciador y de una cola hidrófoba, que puede estar compuesta de cadenas dioleílicas y/o de colesterol. Los ejemplos de tales reactivos de transfección incluyen DOSP, DOST, DOSK, DOSN, CHOLP, CHOLT, CHOLK y CHOLN. Esos reactivos de transfección tienden a formar complejos laminares. Aunque se ha demostrado que son
25 útiles como reactivos de transfección *in vitro*, también tienden a ser menos eficientes *in vivo* o *in situ*.

El documento WO2010026537A1 se refiere a autoensamblajes multimodulares estabilizados para el suministro intracelular, que están compuestos de al menos un agente de transfección catiónico, de al menos una macromolécula cargada negativamente, y de al menos un copolímero de bloques anfifílico que actúa como un estabilizante coloidal estérico.

30 Más recientemente, en el documento WO2013128423A1, también se han dado a conocer copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales glicosilados como adyuvantes inmunitarios.

Sin embargo, la transfección de moléculas de ARN, y más particularmente ARN mensajeros, no siempre conduce a la producción satisfactoria *in vivo* de proteínas, lo que puede ser debido en parte a una mala eficiencia de la transfección y/o una falta de estabilidad de las moléculas de ARN transfectadas una vez que se han internalizado.

35 Lo que es más, esos sistemas se han usado mayoritariamente hasta ahora para ácidos nucleicos del tipo ADN.

Connie Cheng et al, Biomaterials, 33, 2012, 6868-6876, describen el uso de copolímeros de tribloques complejados con moléculas de ARNm en la transfección.

Todavía existe la necesidad de nuevos reactivos de transfección con respecto a moléculas de ARN, y con un buen perfil de seguridad adecuado para uso y terapia humanos.

40 También existe la necesidad de nuevos métodos para mejorar el suministro intracelular, y más específicamente la terapia génica y/o el silenciamiento de genes.

En particular, sigue existiendo la necesidad de proporcionar métodos y reactivos que permitan no solo un suministro intracelular eficiente de un ácido nucleico, tal como ARN mensajero, sino que puedan proporcionar una expresión proteica eficiente *in vivo* y/o una respuesta inmune controlada.

45 También existe la necesidad de nuevas terapias para transfectar moléculas de ARN en un hospedante, que puedan proporcionar además efectos duraderos en el contexto de la terapia génica y/o silenciamiento de genes.

La presente invención tiene por objeto satisfacer esas necesidades.

50 De este modo, un primer objeto de la invención se refiere al uso de al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional, como un vehículo para los ARNm protegidos o no protegidos para el suministro intracelular para terapia génica.

En particular, los inventores han observado inesperadamente, como se detalla en los ejemplos más abajo, que la combinación de (i) ARNm no protegidos, con (ii) copolímeros de bloques de la invención conduce a la expresión proteica *in vivo*.

5 También han observado que las moléculas de ARN mensajero transfectadas con un copolímero de bloques de la invención como vehículo conducen a una eficiencia de la transfección *in vivo*, acoplado con una inducción casi nula de reacción inmune específica.

De este modo, los inventores muestran ahora aquí que la combinación específica de los ARNm con copolímeros de bloques de la invención es particularmente eficiente para el suministro intracelular para terapia génica.

10 Este resultado fue inesperado debido a que se sabe en la técnica que los transcritos de ARN primarios tienen que pasar a través de múltiples modificaciones cotranscripcionales a fin de convertirlos en un ARN maduro. En particular, se ha conocido durante años que la etapa denominada de "protección" de transcritos de ARN premaduros es esencial para la expresión génica eficiente y la estabilidad del ARN (véase Hocine et al.; "RNA Processing and Export"; Cold Spring Harb Perspect Biol.; 2010. Véase también Schoenberg et al.; "Re-capping the message"; Trends Biochem Sci.; 2009).

15 Incluso más sorprendentemente, ahora se muestra que transfectando un ARN mensajero con un copolímero de bloques de la invención como vehículo, dicha transfección no activa, o al menos de una forma muy limitada, el reconocimiento no propio y/o la estimulación inmune innata y la inmunidad innata antiviral.

20 RIG-I (de secuencia SEQ ID N°4) se dio a conocer inicialmente en 1997 como un gen inducible por ácido retinoico (GenBank: AF038963), y pertenece a la familia de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR). También se sabe que desencadena la expresión de interferón tipo 1 al detectar ARN viral.

Sin desear estar atados por la teoría, se cree que la combinación de la invención no desencadena ninguna respuesta dependiente de RIG-I, o al menos de una forma muy limitada, lo que de este modo da como resultado una mayor estabilidad de las moléculas de ARN transfectadas.

25 Este otro resultado también fue inesperado, puesto que se sabe en la técnica que el receptor de RIG-I (gen I inducible por ácido retinoico), que está muy implicado en el reconocimiento de la inmunidad innata de moléculas de ARN exógenas (no del hospedante), tales como los ARN de origen vírico, interacciona específicamente con moléculas de ARN no protegidas (véase Kolakofsky et al.; "A structure-based model of RIG-I activation"; RNA; 2012).

30 Incluso más sorprendentemente, se muestra aquí que los ARNm no protegidos o protegidos, y los modificados, también son eficientes para el suministro intracelular y para desencadenar la expresión proteica *in vivo* en combinación con un copolímero de bloques de la invención.

En particular, también se muestra aquí que la combinación de (i) ARN mensajeros modificados no protegidos o no modificados no protegidos y de (ii) copolímeros de bloques de la invención, como vehículo, es una combinación particularmente eficiente, y una herramienta prometedora no solo para el suministro intracelular para terapia génica.

35 Sin desear estar atados por la teoría, se cree que esta combinación es también eficiente para anular la interacción del ARN con receptores similares a Toll, tales como TLR3, TLR7 y TLR8 (véase Kormann et al.; "Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice"; Nature Biotechnology; 2010).

En otras palabras, se cree que la combinación específica de (i) ARN mensajeros y (ii) copolímeros de bloques de la invención proporciona un suministro intracelular eficiente, así como una menor activación del sistema inmune, presumiblemente debido a la unión sorprendentemente reducida *in vivo* a receptores de reconocimiento de patrones.

40 En particular, se propone que una activación sorprendentemente reducida de las rutas dependiente de RIG-I y dependiente de receptores similares a Toll (TLRs), *in vivo*, puede dar cuenta del efecto sinérgico de (i) ARNm no protegidos y (ii) copolímeros de bloques de la invención sobre la eficiencia de la expresión proteica *in vivo* (Katze et al.; "Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics"; Nature Reviews Immunology; 2008). Solamente como referencia, se proporciona aquí una secuencia de aminoácidos de RIG-I (SEQ ID N° 3).

45 Como se muestra a partir de los ejemplos, esta eficiencia de la expresión proteica *in vivo* sorprendentemente elevada es específica para nanoportadores que implican, como vehículos, copolímeros de bloques de la invención, tal como el copolímero de bloques tetrafuncional 704.

50 La menor activación del sistema inmune, que corresponde a la transfección de un ácido nucleico dado en una célula eucariota, se puede evaluar usando uno de los protocolos que se han descrito en la sección Materiales y Métodos, referida a EPO o β -galactosidasa.

Esta menor activación puede corresponder a una menor respuesta inmune humoral o tipo I asociada tanto con:

(i) una variación baja o moderada del porcentaje de células CD8+IFN γ + entre todas las células CD8+ esplénicas; y/o

(ii) una producción baja o moderada de anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante codificada por la molécula de ARN transfectada.

5 Además, los inventores han descubierto inesperadamente que la eficiencia de expresión se observa incluso con concentraciones bajas de copolímero de bloques de la invención. De este modo, el copolímero de bloques se puede usar en una concentración tan baja como 20.10⁻⁴% (p/v), que es una concentración 75 veces menor que la usada para el suministro óptimo *in vivo* de ADN.

10 La eficiencia de la expresión se puede evaluar en base al nivel de expresión de una proteína dada tras la administración de copolímeros de bloques de la invención en combinación con un ARN mensajero adecuado para la expresión de la mencionada proteína. El nivel de expresión se compara entonces con un valor de referencia determinado tras la administración de ARNm no formulado (sin el mencionado copolímero de bloques).

15 Debido a que la cantidad de copolímero de bloques que se administra con el ARNm puede tener un impacto sobre el nivel de expresión de una proteína, la eficiencia de la expresión también se puede evaluar como una relación entre el nivel de expresión de la mencionada proteína y la cantidad que se administra (es decir, expresada como un porcentaje en peso en comparación con el volumen total de una dosis dada).

Los métodos para determinar el nivel de expresión se detallan adicionalmente en la sección Materiales y Métodos, en particular para la expresión de β -gal, EPO y luciferasa.

Por ejemplo, la eficiencia de la expresión para un copolímero de bloques dado se puede evaluar *in vivo* en ratones:

20 (i) administrando a ratones, preferiblemente de forma intramuscular, un copolímero de bloques dado en combinación con un ARNm que codifica la mencionada β -gal, EPO y/o luciferasa;

(ii) midiendo el nivel de expresión de la mencionada β -gal, EPO y/o luciferasa en el mencionado ratón;

25 (iii) comparando el nivel de expresión medido en la etapa (ii) con respecto a un valor de referencia, o como alternativa, comparando la relación entre el mencionado nivel de expresión y la cantidad que se administró frente a un valor de referencia.

Según realizaciones ejemplares, el copolímero de bloques se administra a una concentración tan baja como 20.10⁻⁴% (p/v).

Según dicha realización ejemplar, el copolímero de bloques se puede administrar en ratones a un volumen de alrededor de 50 μ l.

30 También, y de manera general, el incremento de expresión para un ARNm dado no necesariamente sigue de forma estricta el incremento de la cantidad de su "portador" correspondiente, y con una relación lineal; en otras palabras, no hay necesariamente una correlación estricta entre esos dos valores, que puede conducir de este modo a un fenómeno de saturación, o como alternativa, a la expresión inadecuada o retrasada de una proteína dada en el hospedante eucariota.

35 Por otro lado, los inventores han descubierto también inesperadamente que la eficiencia máxima de expresión también se puede incrementar significativamente (véanse las figuras 7 y 8), incluso a concentraciones elevadas.

De este modo, el copolímero de bloques de la invención, cuando está en combinación con los ARN mensajeros, como vehículos, son particularmente eficientes para el suministro intracelular y la terapia génica debido a:

(i) eficiencia elevada de la expresión, incluso cuando se usan en cantidades bajas;

40 (ii) eficiencia máxima de la expresión;

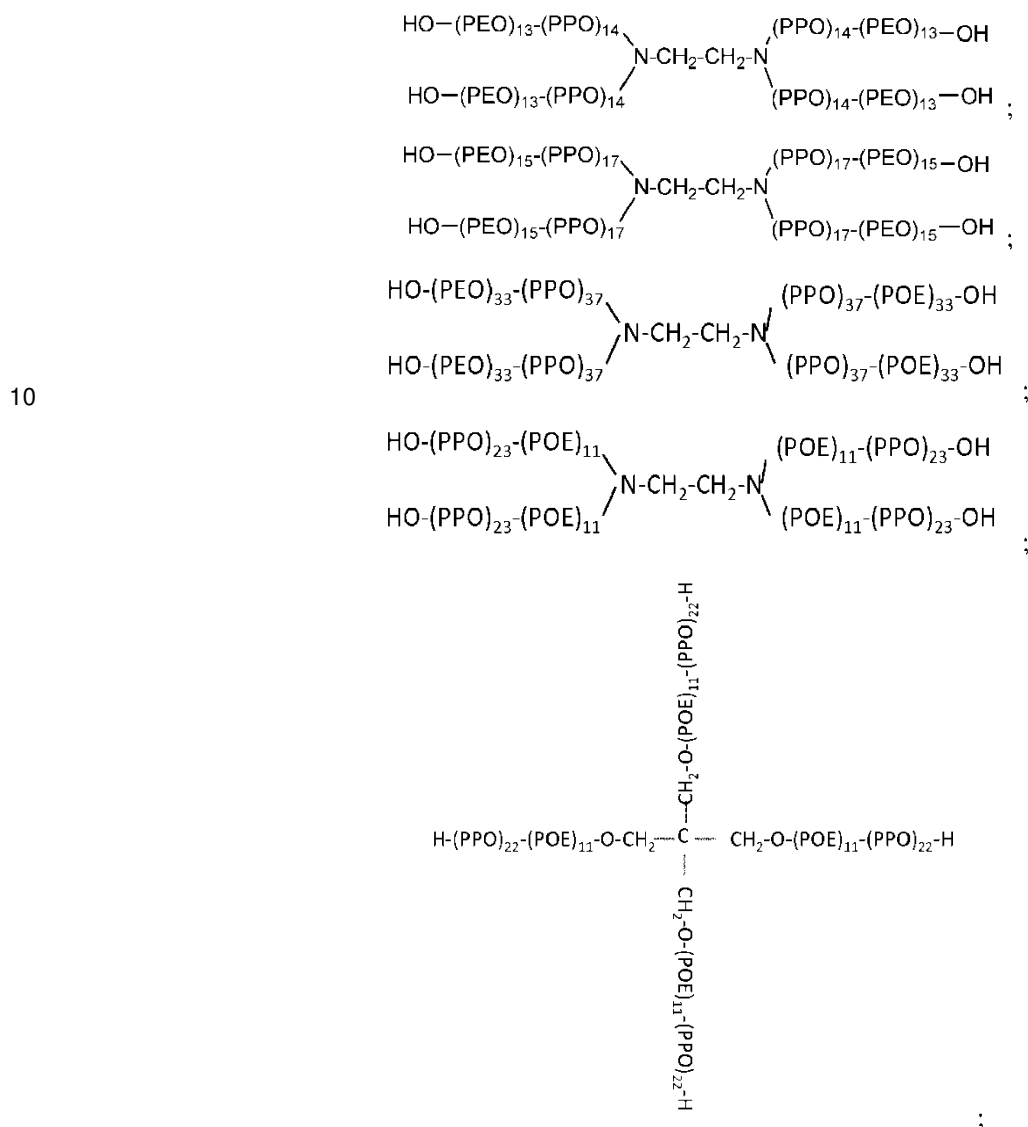
(iii) baja inmunogenicidad.

Según la invención, un "hospedante eucariota" puede englobar cualquier mamífero humano o no humano, así como cualquier muestra *in vitro* o *ex vivo*, tal como una muestra celular o tisular. Según la invención, "que comprende" también incluye "que consiste en".

45 Los métodos y reactivos de la invención también son adecuados para la terapia génica. De este modo, está claro que la invención se refiere además a una combinación de (i) al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional, y (ii) al menos una molécula de ARN, tal como un ARNm, para uso para suministro intracelular, y en el contexto de la terapia génica.

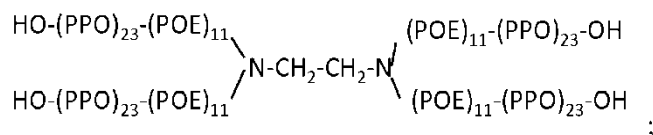
significando POE o PEO polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 5 Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a un método para incrementar, mejorar, y/o mantener la expresión de una proteína en un hospedante eucariota, que comprende una etapa de transfectar al menos un ARNm protegido o no protegido, que codifica dicha proteína en dicho hospedante, con al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional; en el que dicho hospedante eucariota es una muestra *in vitro* o *ex vivo*; en el que dicho copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional se selecciona de:



significando POE o PEO polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 15 Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional de fórmula:



significando POE polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 20 MOLÉCULAS DE ARN

Éstas pueden ser secuencias de origen natural o artificial, y en particular ARNm (ARN mensajero), ARNt (ARN de transferencia), ARNr (ARN ribosómico), ARNsi (ARN de silenciamiento), miARN (micro ARN), ARNmt (ARN mitocondrial), ARNhp (ARN de horquilla pequeño), ARNm-t (ARN mensajero de transferencia), ARNv (ARN vírico), ARN monocatenario, bicatenario y/o de bases emparejadas (ARNmc; ARNbc y ARNpb respectivamente), ARN de extremos romos o no, ARNm maduros e inmaduros, ARN codificantes y no codificantes, secuencias híbridas o secuencias sintéticas o semisintéticas de oligonucleótidos, modificadas o de otro modo, y mezclas de las mismas.

En consecuencia, éstas pueden ser ARN mensajeros (ARNm), que incluyen ARNm maduros e inmaduros, tales como ARNm precursores (pre-ARNm), o ARNm nucleares heterogéneos (ARNnh), y ARNm maduros. De este modo, las moléculas de ARN usadas en la invención también engloban ARN mensajeros monocistrónicos y policistrónicos.

En aras de la claridad, un ARNm engloba cualquier molécula de ARN codificante, que se puede traducir en una proteína por un hospedante eucariota.

Una molécula de ARN codificante se refiere generalmente a una molécula de ARN que comprende una secuencia que codifica una proteína de interés y que se puede traducir por el hospedante eucariota, partiendo dicha secuencia de un codón de partida (ATG) y terminada preferiblemente mediante un codón de parada (es decir, TAA, TAG, TGA).

Según una realización general, un ARNm usado en la invención comprende o consiste en la siguiente fórmula general:

$$[5'UTR]_x - [\text{Gen de Interés}] - [3'UTR]_y - [\text{PolyA}]_z$$

en la que [5'UTR] y [3'UTR] son regiones no traducidas (UTR),

en la que [5'UTR] contiene una secuencia de Kozak,

en la que [Gen de Interés] es cualquier gen que codifica una proteína de interés,

en la que [PolyA] es una cola de poly(A), y

en la que x, y, y z son idénticos o diferentes, e iguales a 0 o 1.

Preferiblemente, un ARNm usado en la invención consiste en la siguiente fórmula general:

$$[5'UTR] - [\text{Gen de Interés}] - [3'UTR] - [\text{PolyA}]$$

en la que [5'UTR] y [3'UTR] son regiones no traducidas,

en la que [5'UTR] contiene una secuencia de Kozak,

en la que [Gen de Interés] es cualquier ácido nucleico que codifica una proteína de interés, y

en la que [PolyA] es una cola de poly(A).

Se recuerda que una secuencia de Kozak se refiere a una secuencia, que es generalmente una secuencia de consenso, que aparece en ARNm eucariotas y que desempeña un papel importante en el inicio del proceso de traducción. Las secuencias de Kozak y las secuencias de consenso de Kozak son bien conocidas en la técnica.

También se recuerda que una cola de poly(A) consiste en múltiples monofosfatos de adenosina, que es bien conocido en la técnica. Una cola de poly(A) se produce generalmente durante una etapa denominada de poliadenilación, que es una de las modificaciones post-traduccionales que se producen generalmente durante la producción de los ARN mensajeros maduros; tal cola de poly(A) contribuye a la estabilidad y a la semivida de dichos ARNm, y puede ser de longitud variable.

En particular, una cola de poly(A) puede ser nucleótidos iguales o mayores que 10 A, que incluye nucleótidos iguales o mayores que 20 A, que incluye nucleótidos iguales o mayores que 100 A, y por ejemplo nucleótidos de alrededor de 120 A.

La [3'UTR] no expresa ninguna proteína. El propósito de la [3'UTR] es incrementar la estabilidad del ARNm. Según una realización particular, se escoge la UTR de α -globina debido a que se sabe que está desprovista de inestabilidad.

Ventajosamente, la secuencia que corresponde al gen de interés puede estar optimizada en los codones, a fin de obtener una producción satisfactoria de proteína en el hospedante que se considere.

Las moléculas de ARN pueden ser de longitud variable. De este modo, pueden ser moléculas de ARN cortas, por ejemplo moléculas de ARN más cortas que alrededor de 100 nucleótidos, o moléculas de ARN largas, por ejemplo más largas que alrededor de 100 nucleótidos, o incluso más largas que alrededor de 300 nucleótidos.

Según realizaciones ejemplares, el gen de interés puede codificar una proteína informadora, tal como luciferasa o β -galactosidasa. La secuencia de ácido nucleico de luciferasa (SEQ ID N° 5) se proporciona únicamente aquí como referencia. La secuencia de ácido nucleico de β -galactosidasa (SEQ ID N° 1) y la secuencia de aminoácidos de β -galactosidasa (SEQ ID N° 2) se proporcionan únicamente aquí como referencia.

- 5 Estos ácidos nucleicos pueden ser de origen eucariota o procariota, y más particularmente de origen humano, animal, vegetal, bacteriano, de levadura, o vírico, y similar. Se pueden obtener mediante cualquier técnica conocida por personas expertas en la técnica, y en particular mediante cribado de genotecas, mediante síntesis química, o alternativamente, mediante métodos mixtos que incluyen modificación química o enzimática de secuencias obtenidas mediante el cribado de genotecas. Pueden estar químicamente modificados.
- 10 De este modo, las moléculas de ARN, tales como los ARNm, pueden englobar moléculas de ARN sintéticas o artificiales, pero también moléculas de ARN de origen natural.

Según la invención, un ARN mensajero (o ARNm) engloba las siguientes especies:

- (i) una molécula de ARN no modificada protegida;
- (ii) una molécula de ARN modificada protegida;
- 15 (iii) una molécula de ARN no modificada no protegida;
- (iv) una molécula de ARN modificada no protegida.

Los términos mencionados anteriormente se detallan adicionalmente aquí más abajo.

Moléculas de ARN protegidas y no protegidas

- 20 Según una realización muy general, una “molécula de ARN protegida” se refiere a una molécula de ARN cuyo extremo 5' está enlazado a una guanosina o una guanosina modificada, preferiblemente una 7-metilguanosa (m^7G), conectada a un enlace de trifosfato 5' a 5' o análogo. Esta definición es comparable con la definición más ampliamente aceptada de una caperuza en 5', en particular de una caperuza de origen natural y/o fisiológica.

- 25 En el sentido de la invención, “análogos de caperuza” incluye caperuzas que son biológicamente equivalentes a una 7-metilguanosa (m^7G), conectada a un enlace de trifosfato 5' a 5', y que de este modo también se pueden sustituir sin alterar la expresión proteica del ARN mensajero correspondiente en el hospedante eucariota.

De este modo, una “molécula de ARN no protegida” se refiere a cualquier molécula de ARN que no pertenezca a la definición de una “molécula de ARN protegida”.

- 30 De este modo, según una realización general y preferida, un “ARNm no protegido” se refiere a un ARNm cuyo extremo 5' no está enlazado a una 7-metilguanosa, a través de un enlace de trifosfato 5' a 5', o un análogo como se define previamente.

Una molécula de ARN no protegida, tal como un ARN mensajero, puede ser una molécula de ARN no protegida que tiene un extremo (5')ppp(5'), un (5')pp(5'), un (5')p(5') o incluso un (5')OH. Tales moléculas de ARN se pueden abreviar respectivamente como $ARN_{5'ppp}$; $ARN_{5'pp}$; $ARN_{5'p}$; $ARN_{5'OH}$. Preferiblemente, una molécula de ARN no protegida usada en la invención es un $ARN_{5'ppp}$ mensajero.

- 35 De este modo, cuando la molécula de ARN es una molécula de ARN monocatenaria, se puede abreviar respectivamente como $ARNm_{C5'ppp}$; $ARNm_{C5'pp}$; $ARNm_{C5'p}$; $ARNm_{C5'OH}$.

De este modo, cuando la molécula de ARN es una molécula de ARN bicatenaria, se puede abreviar respectivamente como $ARNb_{C5'ppp}$; $ARNb_{C5'pp}$; $ARNb_{C5'p}$; $ARNb_{C5'OH}$.

Preferiblemente, un ARNm no protegido usado en la invención es un ARNm monocatenario no protegido.

- 40 Según una realización incluso más preferida, un ARNm monocatenario no protegido puede ser un $ARNm_{C5'ppp}$ mensajero no protegido.

De manera no limitativa, la primera base de dicha molécula de ARN no protegida puede ser una adenosina, una guanosa, una citosina, o una uridina.

- 45 De este modo, una molécula de ARN no protegida puede ser una molécula de ARN no protegida que tiene un extremo (5')ppp(5'), un (5')pp(5'), un (5')p(5') o incluso un extremo de 5' guanosa de extremos romos.

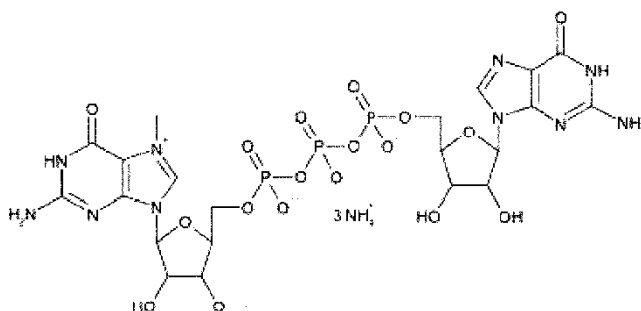
Los ejemplos de caperuzas sintéticas y/o análogos de caperuzas se pueden seleccionar de una lista que consiste en: glicerilo, resto (mitad) abásico desoxi invertido, 4',5' metilen nucleótido, 1-(beta-D-eritrofuranosil)nucleótido, 4'-tionucleótido, nucleótido carbocíclico, nucleótido de 1,5-anhidrohexitol, L-nucleótidos, alfa-nucleótido, nucleótido de bases modificadas, treo-pentafuranos 1 nucleótido, 3',4'-seco nucleótido acíclico, 3,4-dihidroxitil nucleótido

acíclico, 3,5 dihidroxipentil nucleótido acíclico, resto de nucleótido 3'-3' invertido, resto abásico 3'-3' invertido, resto de nucleótido 3'-2' invertido, resto abásico 3'-2' invertido, fosfato de 1,4-butanodiol, 3'-fosforamidato, fosfato de hexilo, fosfato de aminohexilo, 3'-fosfato, 3'fosforotioato, fosforoditioato, o resto de metilfosfonato formador de puente o no formador de puente.

- 5 Otros ejemplos de caperuzas sintéticas o análogos de caperuzas incluyen análogos de caperuzas ARCA, N1-metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-desaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina, y 2-azido-guanosina.

Es de señalar que, entre las caperuzas sintéticas, algunas de las caperuzas mencionadas anteriormente son adecuadas como análogos, pero no otras, que por el contrario pueden impedir la expresión proteica. Tal distinción es entendida por la persona experta en la técnica.

10 Como referencia, y de manera no limitativa, aquí más abajo se presenta la estructura de un análogo de caperuza 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G de tipo análogo de caperuza antiinverso (ARCA):



15 El análogo de caperuza ARCA es, por ejemplo, un ejemplo de un análogo de caperuza usado durante la transcripción *in vitro*: es una caperuza modificada en la que el grupo 3'OH (próximo a m⁷G) se sustituye por -OCH₃. Sin embargo, el 100% de los transcritos sintetizados con ARCA en el extremo 5' son traducibles, conduciendo a un fuerte efecto estimulante sobre la traducción.

Según la invención, la "activación de PRR(s)" se entiende como la estimulación, al unirse al mencionado o mencionados PRR(s) de la inmunidad innata, y más particularmente de la expresión de interferones de tipo 1.

20 Según dicha realización, un requisito para la activación de RIG-I puede ser un ARN de bases emparejadas de extremos romos (ARNpb), 10-20 pb de longitud, con un 5'trifosfato y libre de emparejamientos erróneos cerca del extremo romo.

Según otra realización, un requisito para la activación de RIG-I puede ser un ARNpb_{5'OH} corto de extremos romos (véase Kolakofsky et al.; "A structure-based model of RIG-I activation"; RNA; 2012).

25 Moléculas de ARN modificadas y no modificadas

Como se describe aquí, una "molécula de ARN modificada" se refiere a una molécula de ARN que contiene al menos un nucleótido, nucleósido o base modificados, tal como una purina modificada o una pirimidina modificada. Un nucleósido o base modificados pueden ser cualquier nucleósido o base que no sea A, U, C o G (respectivamente adenosina, uridina, citidina o guanosina para nucleósidos; y adenina, uracilo, citosina o guanina cuando se hace referencia solamente al resto de azúcar).

30 Según la invención, la expresión "al menos un...", tal como en "al menos una base modificada", se debe entender como que tiene una o más bases modificadas. De este modo, en este contexto, tal expresión puede englobar cualquier molécula de ARN que tenga dos o más bases modificadas, o incluso solamente bases modificadas.

35 En consecuencia, una "molécula de ARN no modificada" se refiere a cualquier molécula de ARN que NO corresponda con la definición de una molécula de ARN modificada.

En el sentido de la invención, las expresiones "modificada y no modificada" se consideran distintamente de las expresiones "protegida y no protegida", puesto que estas últimas se refieren específicamente a la base en el extremo 5' de un ARN mensajero en el sentido de la invención.

40 Una "molécula de ARN modificada" se refiere a una molécula de ARN, tal como un ARNm, que contiene al menos una modificación de base o de azúcar como se describe anteriormente, y preferiblemente al menos una modificación de base como se describe anteriormente.

De manera no limitativa, en el documento WO2015024667A1 se describen ejemplos de nucleótidos, nucleósidos y bases modificados.

De este modo, una molécula de ARN modificada puede contener nucleótidos, nucleósidos o bases modificados, incluyendo modificaciones de la cadena principal, modificaciones de azúcar o modificaciones de base.

5 Una modificación de la cadena principal, en relación con la presente invención, incluye modificaciones en las que los fosfatos de la cadena principal de los nucleótidos contenidos en la molécula de ARN como se define aquí están químicamente modificados.

Una modificación de azúcar, en relación con la presente invención, incluye modificaciones químicas del azúcar de los nucleótidos de la molécula de ARN como se define aquí.

10 Una modificación de base, en relación con la presente invención, incluye modificaciones químicas del resto de la base de los nucleótidos del ARN. En este contexto, los análogos o modificaciones de nucleótidos se seleccionan preferiblemente de análogos nucleotídicos que son adecuados para la transcripción y/o traducción de la molécula de ARN en una célula eucariota.

Las modificaciones de azúcar pueden consistir en la sustitución o modificación del grupo 2' hidroxilo (OH), que se puede modificar o sustituir por un número de sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes.

15 Los ejemplos de modificaciones "oxi" del grupo 2' hidroxilo incluyen, pero no se limitan a, alcoxi o ariloxi (-OR, por ejemplo R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR; ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA), en los que el 2' hidroxilo está conectado, por ejemplo mediante un puente metilénico, al carbono 4' del mismo azúcar de ribosa; y grupos amino (-O-amino, en el que el grupo amino, por ejemplo NRR, puede ser alquilamino, dialquilamino, heterocíclico, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino) o aminoalcoxi.

20 Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno, amino (por ejemplo NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterocíclico, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, o aminoácido); o el grupo amino se puede unir al azúcar a través de un enlazador, en el que el enlazador comprende uno o más de los átomos C, N, y O

25 El grupo de azúcar también puede contener uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta a aquella del carbono correspondiente en ribosa. De este modo, un ARN modificado puede incluir nucleótidos que contienen, por ejemplo, arabinosa como el azúcar.

30 La cadena principal de fosfato se puede modificar adicionalmente y se puede incorporar en la molécula de ARN modificada, como se describe aquí. Los grupos fosfato de la cadena principal se pueden modificar sustituyendo uno o más de los átomos de oxígeno por un sustituyente diferente. Además, los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir la sustitución total de un resto de fosfato no modificado por un fosfato modificado como se describe aquí.

35 Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, fosforotioato, fosforoseleniados, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, hidrogenofosfonatos, fosforoamidatos, alquil o arilfosfonatos y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no enlazantes sustituidos por azufre. El enlazador de fosfato también se puede modificar mediante la sustitución de un oxígeno enlazante por nitrógeno (fosforoamidatos en puente), azufre (fosforotioatos en puente) y carbono (metilfosfonatos en puente).

40 Los nucleósidos y nucleótidos modificados, que se pueden incorporar en la molécula de ARN modificada, como se describe aquí, se pueden modificar adicionalmente en el resto de la nucleobase. Por ejemplo, los nucleósidos y nucleótidos descritos aquí se pueden modificar químicamente en la cara de la ranura principal. En algunas realizaciones, las modificaciones químicas de la ranura principal pueden incluir un grupo amino, un grupo tiol, un grupo alquilo, o un grupo halo.

45 Para ejemplos, los análogos/modificaciones de nucleótidos se seleccionan de modificaciones de bases seleccionadas en una lista que consiste en: 2-amino-6-cloropurinaribósido-5'-trifosfato, 2-aminopurina-ribósido-5'-trifosfato; 2-aminoadenosina-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxicitidina-trifosfato, 2-tiocitidina-5'-trifosfato, 2-tiouridina-5'-trifosfato, 2'-fluorotimidina-5'-trifosfato, 2'-O-metilinosina-5'-trifosfato, 4-tiouridina-5'-trifosfato, 5-aminoalilcitidina-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina-5'-trifosfato, 5-bromocitidina-5'-trifosfato, 5-bromouridina-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-yodocitidina-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-yodouridina-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 5-metiluridina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 6-azacitidina-5'-trifosfato, 6-azauridina-5'-trifosfato, 6-cloropurinaribósido-5'-trifosfato, 7-desazaadenosina-5'-trifosfato, 7-desazaguanosina-5'-trifosfato, 8-azaadenosina-5'-trifosfato, 8-azidoadenosina-5'-trifosfato, bencimidazol-ribósido-5'-trifosfato, N1-metiladenosina-5'-trifosfato, N1-metilguanosina-5'-trifosfato, N6-metiladenosina-5'-trifosfato, O6-metilguanosina-5'-trifosfato, pseudouridina-5'-trifosfato, o puromicin-5'-trifosfato, xantosina-5'-trifosfato.

55 En algunas realizaciones, los nucleósidos modificados se pueden seleccionar de una lista que consiste en: ribonucleósido de 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 En algunas realizaciones, los nucleósidos y nucleótidos modificados incluyen 5-azacitidina, 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 En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen 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-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina, y 2-metoxi-adenina.

15 En otras realizaciones, los nucleósidos modificados incluyen inosina, 1-metilinosina, wyosina, wybutosina, 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-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina, y N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina.

En algunas realizaciones, el nucleótido se puede modificar en la cara de la ranura principal, y puede incluir la sustitución del hidrógeno en C-5 de uracilo por un grupo metilo o un grupo halo.

Según una realización adicional, el ARN modificado, como se define aquí, puede contener una modificación lipídica.

25 Las bases modificadas y/o moléculas de ARN modificadas son conocidas en la técnica, y se enseñan adicionalmente, por ejemplo, en Warren et al. ("Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA"; Cell Stem Cell; 2010).

En vista de lo anterior, una base modificada puede ser una base purínica modificada o una base pirimidínica modificada.

30 De manera no limitativa, los ejemplos de bases purínicas modificadas incluyen adenosina modificada y/o guanosina modificada, tal como hipoxantina; xantina; 7-metilguanina; inosina; xantosina y 7-metilguanosina.

Según algunas realizaciones, una molécula de ARN o ARNm modificados corresponde a un ARN para el que se modifica cada nucleósido que corresponde a uridina, citidina, adenosina y/o ribotimidina.

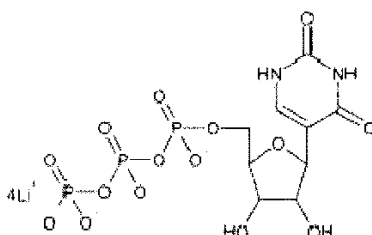
35 De manera no limitativa, los ejemplos de bases pirimidínicas modificadas incluyen citidina modificada y/o uridina modificada, tal como 5,6-dihidrouracilo; pseudouridina; 5-metilcitidina; 5-hidroximetilcitidina; dihidrouridina y 5-metilcitidina.

Preferiblemente, una base modificada de la invención puede ser una uridina o citidina modificadas, tal como pseudouridina y 5-metilcitidina.

40 Según algunas realizaciones, una molécula de ARN o ARNm modificados corresponden a un ARN para el cual se modifica cada base que corresponde a U (por uracilo), C (por citosina), A (por adenina) y/o T (por timina).

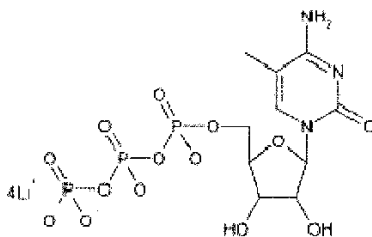
Según algunas realizaciones ejemplares, una molécula de ARN o ARNm modificados corresponde a un ARN para el cual se modifica cada base que corresponde a U (por uracilo) y C (por citosina).

Aquí a continuación se presenta como referencia una estructura de pseudouridina-5'-trifosfato, o pseudo-UTP, o 5-ribosil uracilo:



45

Aquí a continuación se presenta como referencia una estructura de 5-metilcitosina-5'-trifosfato, o 5-metil-CTP, o 5-Me-CTP:



5 Los ARNm protegidos y no protegidos, ya sea que estén modificados o no modificados, también se pueden obtener comercialmente.

De manera no limitativa, los ARNm que se han descrito aquí se pueden adquirir de TriLink Biotechnologies, Inc., y se seleccionan en la lista que consiste en:

- L-6309 β -gal ARNm no modificado, con protección de tipo ARCA (Lote nº T1-APG01A)
- 10 - L-6109 β -gal ARNm totalmente sustituido con pseudo-U y 5-metil-C, protegido con ARCA (Lote nº T1-AOL03A)
- L-6309 β -gal ARNm no modificado, SIN protección (Lote nº I9-B01A)
- L-6109 β -gal ARNm totalmente sustituido con pseudo-U y 5-metil-C, sin protección (Lote nº I9-B02A)
- L-6007 Fluc ARNm no modificado, protegido con ARCA (I99-A01A), y
- L-6007 EPO ARNm no modificado, protegido con ARCA (I9-A01A).

15 Se proporciona aquí, solamente como referencia, un ácido nucleico que codifica EPO (SEQ ID Nº 4).

Se entiende que una molécula de ARN no protegida puede ser una molécula de ARN modificada o una molécula de ARN no modificada.

En consecuencia, una molécula de ARN protegida puede ser una molécula de ARN modificada o una molécula de ARN no modificada.

20 Una molécula de ARN de la invención es un ARN mensajero (ARNm).

Una molécula de ARN de la invención es preferiblemente un ARN mensajero no protegido, ya sea en una forma modificada o en una forma no modificada.

Según una realización muy preferida, un ARNm no protegido es un ARNm no modificado no protegido, o un ARNm modificado no protegido.

25 Una molécula de ARN no protegida, tal como un ARN mensajero, también puede ser una molécula de ARN no protegida que tiene solamente bases de origen natural.

30 Según la invención, una "base de origen natural" se refiere a una base que se puede incorporar de forma natural *in vivo* en una molécula de ARN, tal como un ARN mensajero, por el hospedante. De este modo, una "base de origen natural" es distinta de una base sintética, para la cual no habría ningún equivalente natural en dicho hospedante. Sin embargo, una "base de origen natural" puede ser o no una base modificada, ya que ambos términos no se deben confundir en el sentido de la invención.

Un ARN mensajero no protegido también puede ser un ARN mensajero no protegido y modificado, y de este modo contiene al menos una base modificada.

35 De este modo, un ARN mensajero no protegido también puede ser un ARN mensajero no protegido y modificado que tiene un extremo de (5')ppp(5') guanosina y que contiene al menos una base modificada.

Un ARN mensajero no protegido también puede ser un ARN mensajero no protegido y modificado que tiene un extremo de (5')ppp(5') guanosina y que contiene al menos una pseudouridina y al menos una 5-metilcitosina.

40 Un ARN mensajero protegido puede ser un ARN mensajero cuyo extremo 5' está enlazado a una 7-metilguanosina conectada a un enlace de trifosfato 5' a 5', y que contiene bases de origen natural o bases modificadas, tales como pseudouridina o 5-metilcitosina.

También se entiende que, cuando se usan en una realización de la invención moléculas de ARN tanto modificadas como no modificadas, se pueden usar como mezclas y/o en formas purificadas.

COPOLÍMERO DE BLOQUES ANFIFÍLICO NO IÓNICO TETRAFUNCIONAL

5 Los copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales se han dado a conocer previamente en la técnica, tal como en los documentos WO2010026537A1 y/o WO2013128423A1.

En la invención, la característica “copolímero de bloques” pretende referirse a un polímero que comprende al menos dos conjuntos, o bloques, de unidades monoméricas polimerizadas. Un “bloque” se refiere a un motivo, obtenido mediante polimerización de un monómero, y que se puede repetir en el polímero. Un copolímero de bloques comprende necesariamente al menos dos tipos distintos de bloques de monómeros polimerizados.

10 En la invención, la característica “copolímero de bloques anfifílico no iónico” pretende referirse a un copolímero de bloques que comprende al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo, siendo los bloques no iónicos, a saber, no contienen un resto que forma ion.

15 En la invención, la característica “tetrafuncional”, en relación con “copolímero de bloques”, se refiere a un compuesto que comprende cuatro copolímeros de bloques unidos a cuatro funciones reactivas portadas por un resto enlazante tetrafuncional. Dicho de otro modo, un “copolímero de bloques tetrafuncional” comprende cuatro ramas de copolímeros de bloques unidas a un resto enlazante tetrafuncional central.

20 Los protocolos para la síntesis de esos polímeros ya se han descrito en la técnica, tal como en los documentos WO2010026537A1 y/o WO2013128423A1 (véanse también: Schmolka, I.R.; J.Am. Oil Chem.; Soc. 54:110; 1977 y Schmolka, I.R., Surf. Sci. Ser. 1967, 1, 300-371). Otros copolímeros de bloques están disponibles como productos comerciales. Los ejemplos de tales copolímeros de bloques están comercialmente disponibles con las referencias P10321, P10257, P3848, P3152, vendidas por la compañía Polymer SourceTM (Dorval (Montreal) - Canadá).

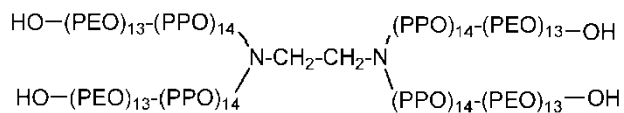
De manera no limitativa, en el documento WO2013128423A1 se describen copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales glicosilados y métodos para producir dichos copolímeros de bloques.

25 Un número de copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales de la invención, en particular de copolímeros de bloques tetrafuncionales anfifílicos no iónicos, están comercialmente disponibles con los nombres comerciales genéricos de “poloxaminas”.

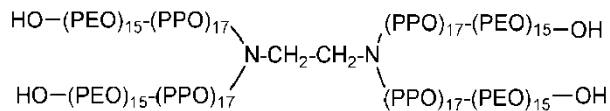
30 En particular, algunos copolímeros de bloques tetrafuncionales anfifílicos no iónicos de la invención están disponibles de BASF (Wyandotte, Mich.) con el nombre comercial TetronicTM. Otros detalles de las poloxaminas se pueden encontrar en Surfactant Systems, Eds. Attwood and Florence, Chapman and Hall, Londres 1983, p 356-361; en The Condensed Encyclopaedia of Surfactants, Ed. Ash and Ash, Edward Arnold, Londres, 1989, en Non-ionic Surfactants, p. 300-371, Ed. Nace, Dekker, Nueva York, 1996, en Santon, Am. Perfumer Cosmet. 72(4):54-58 (1958); (Dekker, N.Y., 1967), o en el documento US 6.353.055.

35 El copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional de la invención se selecciona de un grupo que consiste en copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales como se describen aquí posteriormente, incluyendo 704, 904, 1614, 7426 y 10257 como se describen aquí posteriormente, más preferiblemente 704 o 904, y lo más preferible 704.

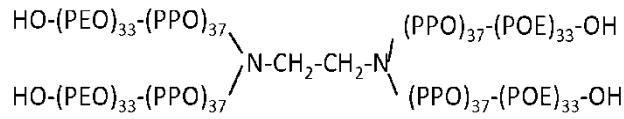
Como referencia, un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 704 (5500 g/mol) usado en la invención tiene la fórmula:



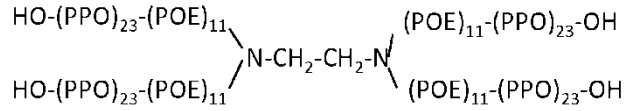
40 Como referencia, un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 904 (6700 g/mol) usado en la invención tiene la fórmula:



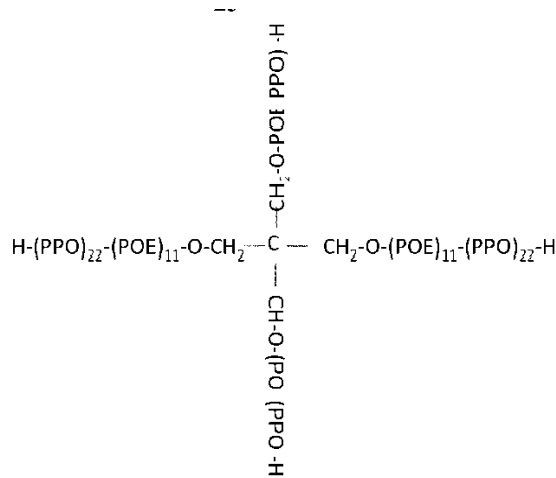
Como referencia, un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 1614 (14463 g/mol) usado en la invención tiene la fórmula:



Como referencia, un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional 7426 (7423 g/mol) usado en la invención tiene la fórmula:



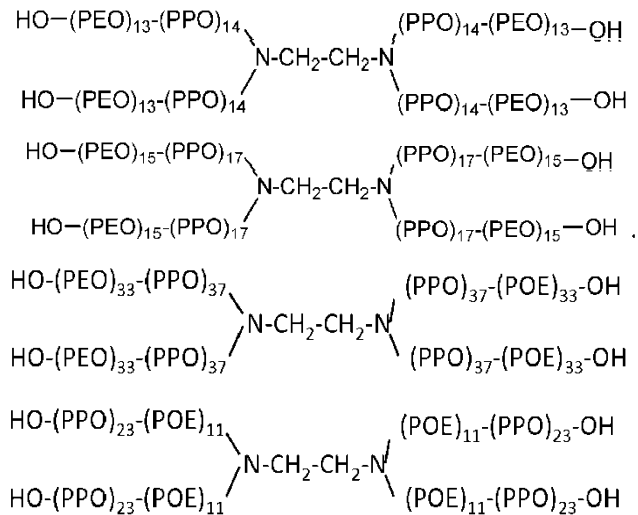
- 5 Como referencia, un copolímero de bloques anfifílico no iónico de POE-PPO tetrafuncional "10257" (7332 g/mol) usado en la invención tiene la fórmula:

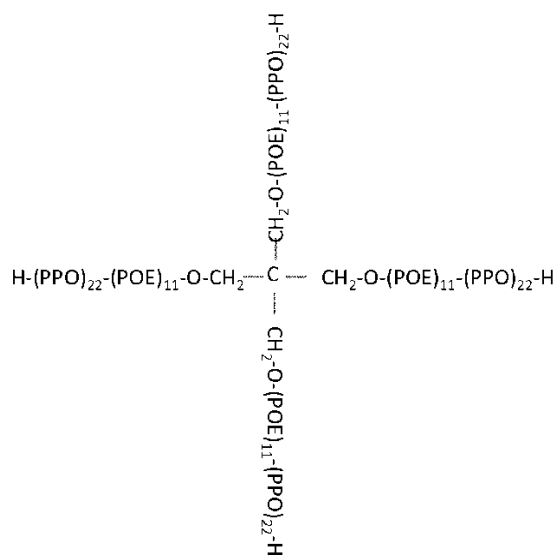


en la que POE significa polióxido de etileno y PPO significa polióxido de propileno.

Según la invención, el copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional se selecciona de:

10





o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 Como se señala previamente, los copolímeros de bloques de la invención se usan inesperadamente en concentraciones muy bajas para transfectar eficientemente ARN mensajero en comparación con la concentración habitual considerada para transfectar ADN. De hecho, aquí se ha observado que la concentración óptima de los copolímeros de bloques es 75 veces menor que la usada para el suministro óptimo in vivo de ADN.

En particular, y como se muestra a partir de los ejemplos, las moléculas de ARN mensajero (ARNm) se pueden transfectar a una concentración igual o menor que 20.10⁻⁴% (p/v), o incluso igual o menor que 10.10⁻⁴% (p/v), y/o tan baja como 5.10⁻⁴% (p/v).

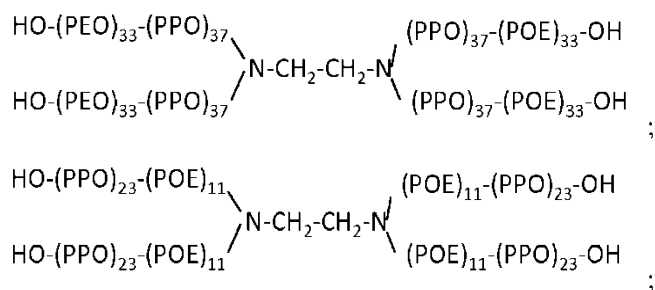
10 En el sentido de la invención, los porcentajes referidos a concentraciones de moléculas de ARN se expresan en (p/v), y como se describe anteriormente.

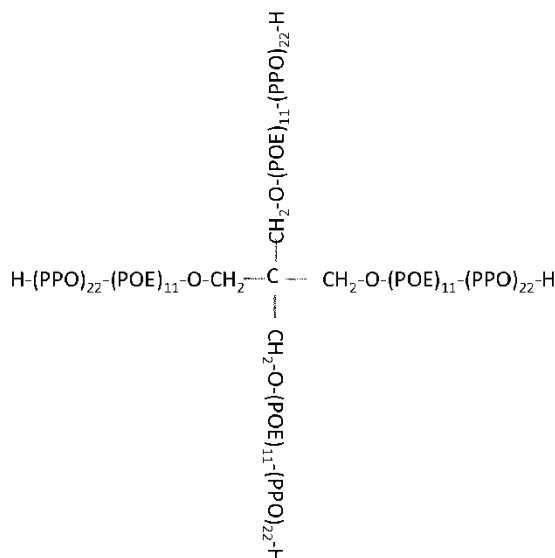
COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO

La memoria descriptiva describe copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales 704, 904, 1614, 7426 y 10257, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 La memoria descriptiva describe además composiciones, y más particularmente una composición farmacéutica, que comprende al menos una cantidad eficaz de al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional como se define anteriormente.

20 De este modo, la invención también se refiere a una composición, y más particularmente a una composición farmacéutica, que comprende un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional, en combinación con al menos un ARNm no protegido; en la que dicho copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional se selecciona de:





significando POE o PEO polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 5 De este modo, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional, como se define anteriormente, como un vehículo para al menos un ARNm no protegido.

De este modo, la presente memoria descriptiva describe cualquiera de los copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales como se describen anteriormente, para la preparación de un medicamento y/o una composición farmacéutica, incluyendo composiciones para uso para el suministro intracelular y la terapia génica.

- 10 Una composición farmacéutica puede comprender un vehículo que es farmacéuticamente aceptable, y adecuado para cualquier modo de administración, que incluye la administración entérica y parenteral, que incluye la administración tópica, inyección mediante aguja e inyección libre de agujas.

En el sentido de la invención, una inyección libre de agujas puede incluir una inyección de chorro. La inyección de chorro es conocida en la técnica, como se muestra, por ejemplo, en el documento WO2015024667A1.

- 15 La inyección de chorro incluye forzar el paso de una composición farmacéutica como se describe anteriormente, que contiene opcionalmente otros excipientes adecuados, a través de un orificio, y generar de ese modo una corriente líquida ultrafina de alta presión que es capaz de penetrar la piel del mamífero y, dependiendo de los ajustes de la inyección, el tejido subcutáneo o el tejido muscular. En principio, la corriente líquida forma un orificio en la piel, a través del cual se empuja la corriente líquida en el tejido diana. Preferiblemente, la inyección de chorro se usa para
 20 inyección intradérmica, subcutánea o intramuscular del ácido nucleico según la invención.

- Una composición farmacéutica puede comprender un vehículo que es farmacéuticamente aceptable, en particular para una formulación inyectable, en particular para inyección sistémica, inyección directamente en el órgano deseado, o para administración tópica, por ejemplo la piel y/o membranas mucosas. Pueden ser disoluciones isotónicas estériles o composiciones secas, en particular liofilizadas, que, por medio de la adición, según el caso, de
 25 agua esterilizada o de disolución salina fisiológica, hace posible constituir solutos inyectables.

Está claro que las dosis usadas para la inyección, y también el número de administraciones, se pueden ajustar por medio de diversos parámetros, y en particular como una función del método de administración bajo consideración, de la patología implicada, de la naturaleza de las macromoléculas cargadas negativamente a administrar, del efecto terapéutico o profiláctico a alcanzar, del individuo a tratar, y de las afecciones a tratar o prevenir.

- 30 Por ejemplo, en el campo de la terapia génica, las dosis dependerán del gen a expresar o reprimir, o de la naturaleza del ARN mensajero.

Dentro del significado de la invención, el término “prevenir”, con respecto a una enfermedad, se ha de entender que significa reducir el riesgo de aparición de dicha enfermedad.

- 35 Con respecto más particularmente al método de administración, puede implicar la inyección directa en los tejidos o el sistema circulatorio, o el tratamiento de células en cultivo, seguido del reimplante *in vivo* mediante inyección o injerto.

Para los fines de la presente invención, la expresión "administración interna" significa que una composición de la invención es compatible con la administración en el tejido de un organismo, por ejemplo un músculo (intramuscular), intradérmicamente o subcutáneamente. Además, se puede usar la administración tópica, oral, pulmonar, nasal y mucosal, tal como, por ejemplo, bucal, vaginal o rectal.

- 5 Las composiciones según la invención son particularmente ventajosas desde un punto de vista terapéutico, en particular en terapia génica, y para uso como un medicamento.

Las composiciones así preparadas se inyectan entonces en células, preferiblemente células musculares o células dendríticas.

- 10 En tanto que una composición de la invención es particularmente ventajosa para incrementar la cantidad de proteínas sintetizadas por las células transfectadas.

La administración se puede llevar a cabo tópicamente, directamente en las células bajo consideración, o por medio de una de las vías de administración explicadas anteriormente.

- 15 Según una realización preferida, un copolímero de bloques de la invención se formula en un medio de Tyrode (CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 6 mM, NaCl 140 mM, glucosa 10 mM, y Hepes 10 mM, pH 7,4; Tyrode Pharmacology. Filadelfia, 1908, 2ª Edición, 1912) o un medio equivalente.

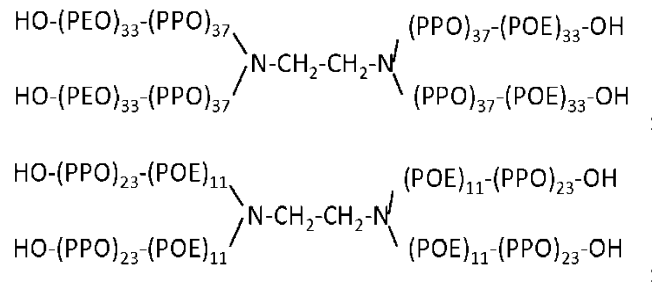
Sin embargo, también se pueden considerar otros medios equivalentes, en particular medios en los que HEPES se sustituye por NaHCO₃. De hecho, los resultados han mostrado (véase la figura 6) que la eficiencia de la transfección aumenta con tales amortiguadores.

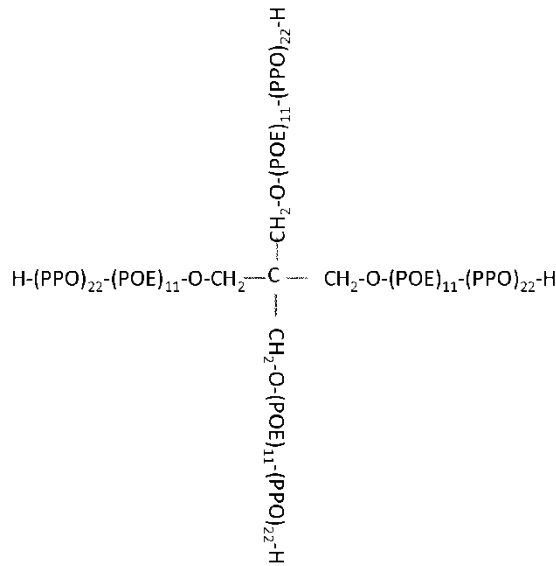
- 20 La descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional al que pertenece la invención, como un vehículo para al menos un ARNm protegido o no protegido, en la que dicho copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional y dicho ARNm se formulan en un medio de Tyrode o un medio equivalente.

De este modo, la invención también se refiere a un kit para el suministro intracelular o para terapia génica, que comprende:

- 25 (i) al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional; y
(ii) al menos un ARNm no protegido;

en el que dicho copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional se selecciona de:

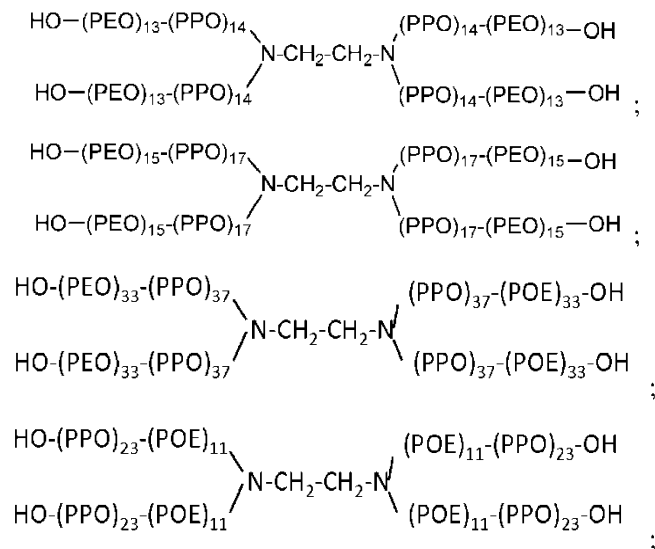


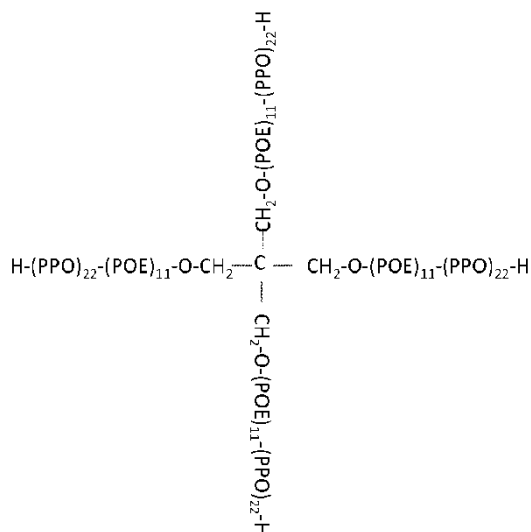


significando POE o PEO polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 5 De este modo, la invención también se refiere a un método para incrementar, mejorar, y/o mantener la expresión de una proteína en un hospedante eucariota, que comprende una etapa de transfectar al menos un ARNm protegido o no protegido, que codifica dicha proteína en dicho hospedante, con al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional; en el que dicho hospedante eucariota es una muestra *in vitro* o *ex vivo*; en el que dicho copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional se selecciona de:

10





significando POE o PEO polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 Según realizaciones ejemplares, el copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional mencionado anteriormente, como vehículo para al menos un ARNm protegido o no protegido, es particularmente eficiente para incrementar, mejorar, y/o mantener la expresión de eritropoyetina (EPO) en un hospedante eucariota.

De este modo, los copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales usados en la invención, como vehículos para al menos un ARNm protegido o no protegido, son particularmente eficientes como un medicamento y/o en una composición farmacéutica, para tratar o prevenir, y/o reducir la probabilidad de aparición de un trastorno asociado con eritropoyesis alterada, o producción alterada de glóbulos rojos, tales como trastornos seleccionados de anemia e insuficiencia renal.

Según algunas realizaciones, la molécula de ARN es un ARNm adecuado para la expresión de eritropoyetina en un individuo.

15 Según algunas realizaciones, los copolímeros de bloques anfifílicos no iónicos tetrafuncionales usados en la invención, como vehículos para un ARN mensajero adecuado para la expresión de EPO en un individuo, son particularmente eficientes para mejorar, restaurar o estabilizar el porcentaje de hematocrito en dicho individuo.

Una combinación como se describe anteriormente es particularmente eficiente para mejorar, restaurar o estabilizar el porcentaje de hematocrito en un individuo en un nivel fisiológico, incluyendo por encima de 40%, que incluye 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 52, 54, y 55%.

20 La presente invención se describirá de forma más completa con la ayuda de los siguientes ejemplos y figuras, que se deberían considerar como ilustrativos y no limitantes.

FIGURAS

25 Figura 1. Influencia de la protección del ARNm y/o de la modificación nucleotídica sobre la expresión de β -galactosidasa en músculo esquelético de ratón C57B16, y reacción inmune frente a β -galactosidasa. (A) Actividad de β -galactosidasa un día tras la inyección intramuscular de 20 μg de ARNm no protegido totalmente modificado o no modificado, ya sea no formulado o formulado con 20.10⁻⁴% de 704. (B) Actividad de β -galactosidasa un día después de la inyección intramuscular de 20 μg de ARNm protegido totalmente modificado o no modificado, ya sea no formulado o formulado con 20.10⁻⁴% de 704. (C) Respuesta humoral a los 42 días tras un esquema de vacunación que consiste en una inyección intramuscular 20 μg en el día 0 y 21 de ARNm protegido o no protegido, modificado y/o no modificado, ya sea no formulado o formulado con 20.10⁻⁴% de 704. Cada columna representa el título medio de anticuerpos determinado mediante ELISA de al menos ocho ratones individuales. (D) Porcentaje de células específicas CD8+IFN γ + β -galactosidasa. Se prepararon esplenocitos en el día 42 estimulados toda la noche con la estirpe celular dendrítica murina (Jaws) transfectada con ICAfectin@441 y ADN plasmídico que codifica β -galactosidasa, o como control con ADN plasmídico que codifica la alfafetoproteína. Tras el lavado, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD8 y anti-IFN γ . Cada columna representa el porcentaje de células CD8+IFN γ en células CD8+ esplénicas totales +/-SEM de al menos seis ratones individuales.

Figura 2. Influencia de la protección del ARNm y/o de la modificación nucleotídica sobre la expresión de β -galactosidasa en células en cultivo. Células Hela (parte superior de la Figura 2), C2C12 (centro de la Figura

2) y JAWII (parte inferior de la Figura 2) se transfectaron con el derivado lipídico de aminoglicósido DOST, a una relación de carga de 5 (+/-) con 05 μg de ARNm formulado o ADN formulado que codifica beta galactosidasa. Las moléculas de ARN se protegieron o no se protegieron con U y C totalmente modificadas, mediante pseudo-U o 5-metilcitosina, o con U y C no modificadas. Tras 24 h, las células se recogieron, y se midió la expresión de beta galactosidasa. Los resultados se expresan mediante pg de beta galactosidasa por mg de proteína celular (pg/mg de prot). Los datos se muestran como la media \pm SEM de la (beta gal (pg/mg de prot) de las células transfectadas. Como control, las células transfectadas con ARN solo o ADN solo no dieron expresión significativa de la beta galactosidasa.

Figura 3. Hematocrito de ratón como una función del tiempo tras la inyección de formulaciones de copolímero de bloques. (A) Hematocrito de ratón como una función del tiempo tras la inyección intramuscular de formulaciones de 704/ARN que contienen 20 μg de ARNm que codifica EPO murina y $10 \times 10^{-4}\%$ (círculos blancos), $20 \times 10^{-4}\%$ (cuadrados blancos) o $100 \times 10^{-4}\%$ (triángulos blancos) de 704. Como control, también se inyectó a los ratones con 20 μg de ARN no formulado que codifica EPO murina (círculos negros). Como control, un grupo de ratones también se dejó sin inyectar (cuadrados negros). (B) Hematocrito de ratón como una función del tiempo tras la inyección intramuscular de una formulación de 704/ADN que contiene 10 μg de ADN plasmídico que codifica EPO murina y 0,15% de 704 (círculos blancos). Como control, también se inyectó a los ratones con 10 μg de ADN no formulado que codifica EPO murina (círculos negros). Como control, un grupo de ratones también se dejó sin inyectar (cuadrados negros). (C) Hematocrito de ratón como una función del tiempo tras la inyección intramuscular de formulaciones de 904/ARN que contienen 20 μg de ARNm que codifica EPO murina y $10 \times 10^{-4}\%$ (círculos blancos), $20 \times 10^{-4}\%$ (cuadrados blancos) o $100 \times 10^{-4}\%$ (triángulos blancos) de 904. Como control, también se inyectó a los ratones con 20 μg de ARN no formulado que codifica EPO murina (círculos negros). Como control, un grupo de ratones también se dejó sin inyectar (cuadrados negros).

Figura 4: Modulación del hematocrito en ratones inyectados intramuscularmente con formulaciones de copolímero de bloques/ARN y formulaciones de 704/ADN (B). (A) Seis ratones se trataron 2 veces en el día 0 y 42 con 2 inyecciones sucesivas, con un intervalo de una semana. Los tratamientos consistieron en 20 μg de ARNm que codifica EPO murina ya sea no formulado (triángulos blancos) o formulado con $100 \times 10^{-4}\%$ (cuadrados negros) de 904 y $20 \times 10^{-4}\%$ (círculos negros) de 704. En el día 100 después del comienzo del tratamiento, los ratones recibieron una única inyección que consiste en 20 μg de ARNm que codifica EPO ya sea no formulado (triángulos blancos) o formulado con $100 \times 10^{-4}\%$ (cuadrados negros) de 904 y $20 \times 10^{-4}\%$ (p/v) (círculos negros) de 704. En el día 134 después del comienzo del tratamiento, los ratones recibieron una única inyección de 20 μg de ARNm que codifica la EPO murina con $100 \times 10^{-4}\%$ de 904 (cuadrados negros). Como control, los ratones también se dejaron sin inyectar (cuadrados blancos). Las líneas discontinuas representan la fluctuación con respecto al hematocrito de ratones no inyectados sanos. (B) Seis ratones se trataron en el día 0, 56 y 100 con 10 μg de ADN no formulado (diamante blanco) o formulado con 0,15% de 704 (diamante negro). Como control, los ratones también se dejaron sin inyectar (cuadrados blancos). Las líneas discontinuas representan la fluctuación con respecto al hematocrito de ratones no inyectados sanos. (C) Expresión de EPO murina medida en el día 135 en suero de ratones 24 horas tras la inyección de 20 μg de ARN que codifica EPO murina ya sea no formulado o formulado con $100 \times 10^{-4}\%$ de 904, y de 10 μg de ADN plasmídico que codifica EPO ya sea no formulado o formulado con 0,15% de 704. Cada barra representa la media \pm SEM de 6 valores individuales. (D) Respuesta humoral a los 170 días tras el comienzo del tratamiento con ADN o ARNm que codifica la EPO murina formulado con copolímeros de bloques tetrafuncionales. Cada columna representa la cantidad media de anticuerpos frente a EPO murina medida en el suero de ratones inyectados con las diversas composiciones, determinada mediante ELISA usando una curva patrón obtenida de una cantidad conocida de anticuerpos comercialmente disponibles frente a EPO murina.

Figura 5: Expresión de luciferasa en músculo esquelético de ratón tras la inyección intramuscular de ARNm formulado con 704 a $20 \cdot 10^{-4}\%$. Actividad de luciferasa 24 horas tras la inyección intramuscular de 10 μg de ARNm formulado con 704 en diversos medios amortiguados con Hepes, NaHCO_3 o lactato sódico, que corresponden respectivamente a pH de 7,4, 7,4 y 6,7. También se midió el efecto de la concentración de CaCl_2 , que oscila desde 1 a 5 mM, sobre la expresión de luciferasa en dos medios diferentes amortiguados mediante Hepes o NaHCO_3 . Como control, un grupo de ratones se inyectó con un medio que consiste en NaCl 150 mM. Cada columna representa la media \pm SEM de al menos seis valores individuales.

Figura 6: Expresión de luciferasa en músculo esquelético de ratón tras la inyección intramuscular de ARNm formulado con 704 a diversas concentraciones. Actividad de luciferasa 24 horas tras la inyección intramuscular de 10 μg de ARNm formulado con 704 a diversas concentraciones que oscilan desde $10 \cdot 10^{-4}$ hasta $1000 \cdot 10^{-4}\%$ (p/v). Cada columna representa la media \pm SEM de al menos seis valores individuales.

Figura 7: Expresión de luciferasa en músculo esquelético de ratón tras la inyección intramuscular de ARNm modificado protegido, ya sea no formulado o formulado con copolímero de bloques anfifílico de PEO-PPO tetrafuncional de 14463 g/mol. Actividad de luciferasa 24 horas tras la inyección intramuscular de 5 μg de ARNm formulado con el copolímero de bloques a diversas concentraciones que oscilan desde 5 hasta

1000.10⁻⁴% (p/v). Cada columna representa la media +/- SEM de al menos seis valores individuales. La columna "no formulado" se refiere a la expresión de luciferasa tras la administración del mismo ARNm pero sin el copolímero de bloques. La columna "ref" se refiere a la expresión de luciferasa tras la administración del mismo ARNm en combinación con el copolímero de bloques tetrafuncional 704 cuando se administra a una concentración de alrededor de 20.10⁻⁴% (p/v).

5
10
15
10
Figura 8: Expresión de luciferasa en músculo esquelético de ratón tras la inyección intramuscular de ARNm modificado protegido no formulado o formulado con copolímero de bloques anfifílico de PPO-POE tetrafuncional de 7423 g/mol. Actividad de luciferasa 24 horas tras la inyección intramuscular de 5 µg de ARNm formulado con el copolímero de bloques a diversas concentraciones que oscilan desde 5 hasta 1000.10⁻⁴% (p/v). Cada columna representa la media +/- SEM de al menos seis valores individuales. La columna "no formulado" se refiere a la expresión de luciferasa tras la administración del mismo ARNm pero sin el copolímero de bloques. La columna "ref" se refiere a la expresión de luciferasa tras la administración del mismo ARNm en combinación con el copolímero de bloques tetrafuncional 704 cuando se administra a una concentración de alrededor de 20.10⁻⁴% (p/v).

15
20
Figura 9: Expresión de luciferasa en músculo esquelético de ratón tras la inyección intramuscular de ARNm modificado protegido no formulado o formulado con copolímero de bloques anfifílico de PLA-POE tetrafuncional de 8996 g/mol. Actividad de luciferasa 24 horas tras la inyección intramuscular de 5 µg de ARNm formulado con el copolímero de bloques a 10 y 100.10⁻⁴% (p/v). Cada columna representa la media +/- SEM de al menos seis valores individuales. La columna "no formulado" se refiere a la expresión de luciferasa tras la administración del mismo ARNm pero sin el copolímero de bloques.

25
Figura 10: Expresión de luciferasa en músculo esquelético de ratón tras la inyección intramuscular de ARNm modificado protegido no formulado o formulado con copolímero de bloques anfifílico de POE-PPO tetrafuncional de 7332 g/mol. Actividad de luciferasa 24 horas tras la inyección intramuscular de 5 µg de ARNm formulado con el copolímero de bloques a 10 y 100.10⁻⁴% (p/v). Cada columna representa la media +/- SEM de al menos seis valores individuales. La columna "no formulado" se refiere a la expresión de luciferasa tras la administración del mismo ARNm pero sin el copolímero de bloques.

30
35
40
45
Figura 11: Hematocrito de ratón y niveles de EPO como una función del tiempo tras la inyección de formulaciones de copolímero de bloques. (A) Hematocrito de ratón como una función del tiempo tras la inyección intramuscular de formulaciones de 704/ARN que contienen 20 µg de ARNm que codifica EPO murina y 10 x 10⁻⁴% (círculos blancos), 20 x 10⁻⁴% (cuadrados blancos) o 100 x 10⁻⁴% (triángulos blancos) de 704. Como control, también se inyectó a los ratones con 20 µg de ARN no formulado que codifica EPO murina (círculos negros). Como control, un grupo de ratones también se dejó sin inyectar (cuadrados negros). (B) Hematocrito de ratón como una función del tiempo tras la inyección intramuscular de formulaciones de 904/ARN que contienen 20 µg de ARNm que codifica EPO murina y 10 x 10⁻⁴% (círculos blancos), 20 x 10⁻⁴% (cuadrados blancos) o 100 x 10⁻⁴% (triángulos blancos) de 904. Como control, los ratones también se inyectaron con 20 µg de ARN no formulado que codifica EPO murina (círculos negros). Como control, un grupo de ratones también se dejó sin inyectar (cuadrados negros). (C) EPO de ratón como una función del tiempo tras la inyección intramuscular de formulaciones de 704/ARN que contienen 20 x 10⁻⁴% de 704 y diversas cantidades de ARNm que codifica murina, incluyendo 1 (círculos blancos), 5 (diamantes blancos), 10 (triángulos blancos) y 50 µg (octágono blanco). Como control, los ratones también se inyectaron con 1 (círculos negros), 5 (diamantes negros), 10 (triángulos negros) y 50 µg (octágono negro) de ARN no formulado que codifica EPO murina. Como control, un grupo de ratones también se dejó sin inyectar (cuadrados negros, línea discontinua). (D) Nivel de hematocrito como una función del tiempo del mismo descrito en (C). Tras 10 horas, los niveles de EPO de ratón se midieron en suero (E) y en los músculos (F) de ratones inyectados intramuscularmente con ADN plasmídico que codifica EPO murina formulado con 704 (símbolos negros) o con ARNm formulado con 704 (símbolos en blanco). Cada símbolo representa la media +/- SEM de al menos 6 ratones individuales.

50
Figura 12: Expresión de β-galactosidasa tras la inyección intramuscular de ARNm modificado no protegido en combinación con copolímeros de bloques. El eje y representa la expresión de β-galactosidasa en cps. El eje x representa, de izquierda a derecha, los conjuntos de datos que corresponden a los copolímeros de bloques 704; 10257; 3648; 1614 y 7426.

55
Figura 13: Respuesta humoral en ratones en el día 35 tras 2 inyecciones intramusculares de ARNm no modificado protegido en el día 0 y 21, en presencia de copolímeros de bloques 904 y 10257. El eje y representa el título medio de anticuerpos determinado mediante ELISA de al menos seis ratones individuales. El eje x representa, de izquierda a derecha, los conjuntos de datos que corresponden a los ARNm no formulados, copolímeros de bloques 904 y 10257. Para cada conjunto de datos, la columna en la izquierda representa ADN, y la columna en la derecha ARN.

Ejemplos

Material y métodos

Moléculas de ácidos nucleicos

El ARNm, ya sea que esté protegido o no, y completamente sustituido o no para cada U o C por pseudo-U y 5-metil-C respectivamente, que codifica β -galactosidasa, luciferasa, eritropoyetina (EPO), se adquirió en Trilink (San Diego, USA). El plásmido que contiene el ADNc de EPO murina, bajo el control del promotor/potenciador del citomegalovirus (CMV) IE1, se construyó recuperando ADNc de EPOm mediante PCR a partir del plásmido pTetO-mEPO (Richard et al., Human Gene Therapy 2005), y se introdujo en el vector pcDNA-3 (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia). Como antígeno, se usó el plásmido pCMV-bGal (Clontech, St Germain en Laye, Francia) que codifica β -galactosidasa controlado por el promotor del gen inmediato-temprano de citomegalovirus humano. Los plásmidos se purificaron a partir de *Escherichia coli* recombinante transformada, por medio de columnas de purificación de plásmidos libres de endotoxinas (Qiagen, Chatsworth, CA, USA).

Experimentos con animales y formulaciones de ácidos nucleicos

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según las directrices del French Institut National de la Santé y de la Recherche Médicale. Se obtuvieron ratones Swiss y C57bl/6 hembras de ocho semanas de Janvier (Le Genest Saint Isle, Francia). En cada grupo experimental se inyectaron al menos seis a ocho ratones. Para las inyecciones intramusculares, los ratones se anestesiaron. Se inyectaron en un único sitio cincuenta microlitros de formulaciones sintéticas en músculos anteriores tibiales afeitados, usando una jeringuilla microfina (U100, Becton Dickinson, Rungis, Francia). Se prepararon disoluciones madre de copolímero de bloques a 2% (p/v) en agua, y se almacenaron a 4°C. Las formulaciones de ADN y ARNm con copolímero de bloques se prepararon mezclando equívolumétricamente el copolímero de bloques en agua a la concentración deseada con disolución de ADN plasmídico a la concentración deseada en amortiguador.

Cultivo celular

Se hicieron crecer HeLa, C2C12, JAW II a 37°C 5% de CO₂ en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con penicilina, estreptomina, L glutamina y 10% de suero fetal de ternera. Un día antes de la transfección, las células se colocaron en placas en 1 ml de medio de crecimiento completo, de manera que las células alcanzan una confluencia del 70-80% en el momento de la transfección (0,5 – 2 x 10⁵ células por pocillo). Un día después de la transfección, las células se cosecharon, y se añadió a cada pocillo Reporter Lysis Buffer (Promega) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). Tras centrifugar a 10.000 rpm durante 4 min., se midió la actividad de luciferasa a partir de una alícuota de sobrenadante con Victor² (PerkinElmer), usando un Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega). La actividad de luciferasa se determinó midiendo la emisión de luz tras la adición de 100 μ l de sustrato de ensayo de luciferasa a 10 μ l de sobrenadante.

Análisis de la expresión de EPO

Los valores del hematocrito se midieron mediante centrifugación microcapilar. A diferentes puntos de tiempo tras la inyección intramuscular, se recogió sangre de ratón de la cavidad retroorbital, y el suero se obtuvo mediante centrifugación (3 minutos a 1000 g). Para las muestras de plasma, se recogió sangre del seno retroorbital en tubos heparinizados, y se centrifugó 3 minutos a 1000 g. Los niveles de EPO en suero de ratón se midieron mediante inmunoensayo enlazado a enzima (ELISA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (R&D Systems).

Respuesta inmune específica anti-EPO murina

Las respuestas inmunes humorales se midieron mediante ELISA. Brevemente, se revistieron placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) toda la noche a 4°C con EPO murina recombinante en NaHCO₃ 50 mM pH 9,5, después se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS 0,05% Tween-20 1% seroalbúmina bovina (BSA) antes de distribuir por triplicado los sueros diluidos. Las placas se incubaron a 37°C durante 90 minutos, después se detectó IgG específica de EPO usando anti-IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK) diluido 1/5000 en PBS 0,05% Tween-20 1% BSA. Las placas se lavaron tres veces en PBS 0,05% Tween-20 entre etapas, y la actividad de peroxidasa se reveló con 1 mg/ml de OPD en amortiguador de citrato pH 5. Las reacciones se detuvieron mediante adición de H₂SO₄ 1 M, y después se midió la absorción a 492 nm. Los sueros se estudiaron a 1/100, 1/1000 y 1/10000, y se calculó la cantidad de anticuerpo anti-EPO murina con respecto a una curva patrón que consiste en cantidades conocidas fijas de anticuerpos comercialmente disponibles anti-EPO murina crecientes presentes en cada placa de ELISA.

Expresión de luciferasa

La expresión de la proteína luciferasa se evaluó mediante formación de imágenes en el animal vivo usando un sistema PhotonIMAGER Optima (<http://www.biospacelab.com>). De forma breve, se inyectaron intraperitonealmente en ratones 2 mg de sustrato de luciferasa *in vivo* (sustrato de luciferina de escarabajo, Promega), y, después de 10

minutos, los ratones se anestesiaron y la señal luminiscente se midió hasta que la línea base fue estable. Tras la estabilización de la señal luminiscente, se llevó a cabo la medida de la luminiscencia durante 30 s.

Expresión de β -Gal

5 La expresión de β -Gal se cuantificó en extractos musculares usando el sistema de ensayo BetaGlo (Promega, Charbonnières, Francia) según el protocolo del fabricante.

Respuesta inmune específica anti- β -Gal

10 Las respuestas inmunes humorales se midieron mediante ELISA. Brevemente, se revistieron placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) toda la noche a 4°C con bGal recombinante en NaHCO₃ 50 mM pH 9,5, después se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS 0,05% Tween-20 1% seroalbúmina bovina (BSA) antes de distribuir por triplicado los sueros diluidos. Las placas se incubaron a 37°C durante 90 minutos, después se detectó IgG específica de bGal usando anti-IgG de ratón de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK) diluido 1/5000 en PBS 0,05% Tween-20 1% BSA. Las placas se lavaron tres veces en PBS 0,05% Tween-20 entre etapas, y la actividad de peroxidasa se reveló con 1 mg/ml de OPD en amortiguador de citrato pH 5.

15 Las reacciones se detuvieron mediante adición de H₂SO₄ 1 M, y después se midió la absorción a 492 nm. Los sueros se estudiaron a 1/100, 1/1000 y 1/10000, y se calcularon los títulos con respecto a diluciones duplicadas de un suero de control presente en cada placa de ELISA.

20 Para medir el porcentaje de células CD8 que expresan IFN γ en el total de células CD8 esplénicas, se cultivaron esplenocitos a 5x10⁶ células/ml en medio completo. Una estirpe celular dendrítica murina (JAWS) se transfectó con ICAfectin@441 con ADN plasmídico que codifica b-galactosidasa o alfafetoproteína murina, y las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Las células se cosecharon a 24 horas, después se tiñeron con un anticuerpo anti-CD8 y anti-IFN γ , y se cuantificaron mediante FACS.

Protocolos para la funcionalización de copolímeros de bloques 704 en sus bloques terminales

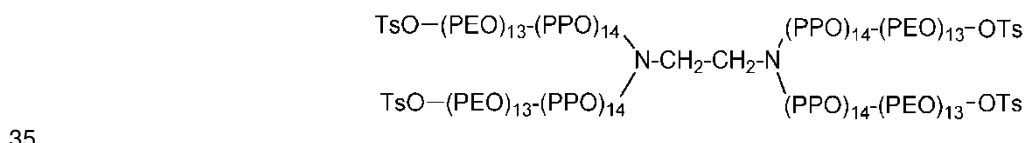
I- Preparación de 704-Me

25 704 (1,07 g, 0,19 mmoles, 1 eq.) se secó durante 30 min a vacío, y después se disolvió en THF seco (25 ml). A 0°C, se añadió NaH (95%, 56 mg, 2,33 mmoles, 12 eq.), y la mezcla se agitó durante 30 min. a rt. Entonces se añadió yodometano (0,14 ml, 2,33 mmoles, 12 eq.), y la mezcla se agitó a rt toda la noche. Tras concentrar, el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH) para dar 704-Me (0,93 g, 88%).

II- Preparación de 704-NH₂

30 A una disolución de 704 (4,7 g, 0,85 mmoles, 1 eq.) en DCM (120 ml) se añadió cloruro de p-toluenosulfonilo (1,95 g, 10,25 mmoles, 12 eq.). Entonces se añadió en porciones KOH en polvo (0,77 g, 13,67 mmoles, 16 eq.) a lo largo de 30 min., y la mezcla se agitó a rt durante 2 días. Se añadió DCM (100 ml), y la mezcla se lavó con H₂O, con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH) para dar 704-Tos (4,37 g, 84%).

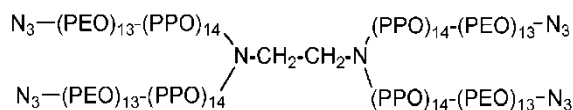
Como referencia, 704-Tos tiene la fórmula:



en la que TsO se refiere a un grupo tosilo.

40 A una disolución de 704-Tos (4,37 g, 0,71 mmoles, 1 eq.) en EtOH (100 ml) se añadió azida sódica (1,16 g, 17,85 mmoles, 25 eq.). La mezcla se puso a reflujo durante 20 h. Tras enfriar hasta rt, se evaporaron los volátiles. El residuo se recogió con DCM (100 ml), se lavó con NaHCO₃ sat., con H₂O, con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH) para dar 704-N₃ (3,30 g, 82%).

Como referencia, 704-N₃ tiene la fórmula:



A una disolución de 704-N₃ (3,30 g, 0,58 mmoles, 1 eq.) en EtOH (60 ml) se añadió Pd/C (10%, 0,75 g, 0,11 mmoles, 0,2 eq.). Se aplicaron 3 ciclos de vacío/N₂, seguido de 3 ciclos de vacío/H₂. La mezcla se agitó a rt durante

2 días, después se filtró sobre una almohadilla de celite, se lavó con MeOH y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH) para dar 704-NH₂ (2,81 g, 88%).

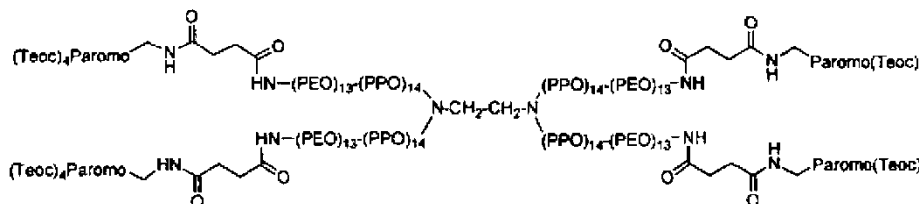
III- Preparación de 704-NOx

- 5 A una disolución de 704-NH₂ (0,2 g, 0,036 mmoles, 1 eq.) en DCM (20 ml) se añadieron sucesivamente Et₃N (0,06 ml, 0,36 mmoles, 10 eq.) y anhídrido succínico (0,036 g, 0,36 mmoles, 10 eq.). La mezcla se agitó a rt toda la noche, después se lavó con HCl 1M, con H₂O, se secó sobre MgSO₄ y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH) para dar 704-NOx (0,185 g, 87%).

IV- Preparación de 704-Paromo

- 10 A una disolución de 704-NOx (0,185 g, 0,031 mmoles, 1 eq.) en DMF (15 ml) se añadieron sucesivamente Paromo(Teoc)-NH₂ (0,224 g, 0,188 mmoles, 6 eq.), HBTU (0,083 g, 0,220 mmoles, 7 eq.) y DMAP (0,053 g, 0,440 mmoles, 14 eq.). La mezcla se agitó a 50°C durante 48 h, después se concentró y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH) para dar 704-Paromo(Teoc) (0,149 g, 48%).

Por referencia, 704-Paromo (Teoc) es de la fórmula:



- 15 A una disolución de 704-Paromo(Teoc) (0,149 g, 0,014 mmoles) en DCM (3 ml) se añadió ácido trifluoroacético (4 ml) a 0°C. Tras 30 min. a 0°C, la mezcla se agitó durante 1 h a rt, y después se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH) para dar 704-Paromo (0,042 g, 39%).

V- Preparación de 704-OOx

- 20 A una disolución de 704 (2 g, 0,36 mmoles, 1 eq.) en piridina (15 ml) se añadió anhídrido succínico (0,36 g, 3,63 mmoles, 10 eq.). La mezcla se agitó a 55°C toda la noche, y después se concentró. El residuo se recogió con EtOAc (100 ml), se lavó con HCl 1M, H₂O, con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH) para dar 704-OOx (1,78 g, 84%).

Ejemplo 1: Transfección in vivo de músculos esqueléticos e inmunogenicidad, usando diferentes estructuras y secuencias de ARNm

- 25 Fin: este experimento proporciona un estudio comparativo de la influencia de la protección y modificación nucleotídica de ARNm sobre la expresión proteica en un músculo esquelético C57Bl6, y también evalúa la importancia de la reacción inmune tras la inyección.

- 30 Como se muestra a partir de la figura 1, la transfección de un ARNm que codifica una β-galactosidasa usando el copolímero de bloques tetrafuncional 704 como vehículo permite tanto (i) la expresión proteica eficiente como (ii) una reacción inmune mínima.

Ejemplo 2: Transfección in vitro de células cultivadas, usando diferentes estructuras y secuencias de ARNm.

Fin: Este experimento (véase la figura 2) proporciona pruebas de que los derivados lipídicos de aminoglicósidos no son tan satisfactorios para la transfección de ARNm en tres estirpes celulares diferentes

Ejemplo 3: Secreción de eritropoyetina murina.

- 35 Fin: este experimento proporciona un seguimiento, a lo largo de 20 días, de la inyección de un ARNm que codifica EPO murina usando, como vehículo, copolímero de bloques 704 (véase la figura 3).

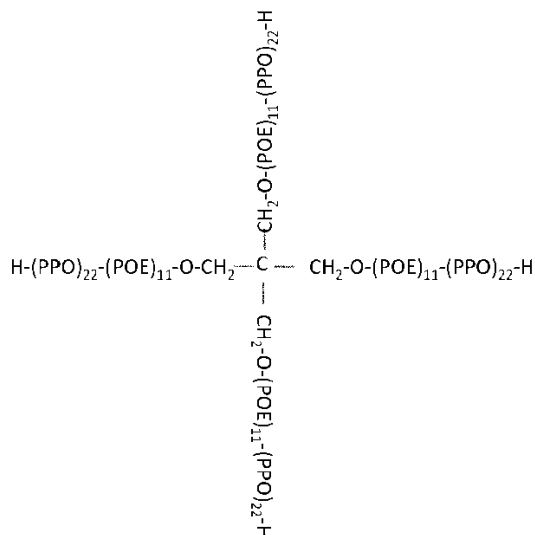
Ejemplo 4: Inyección repetida de ARNm y de ADN y expresión de EPO murina en ratón.

- 40 Fin: Este experimento proporciona un seguimiento, a lo largo de 180 días, de la inyección de un ARNm que codifica EPO murina usando, como vehículos, los copolímeros de bloques 704 o 904, y con inyecciones repetidas de ARNm. Se proporciona además un estudio comparativo que muestra la eficiencia de los copolímeros de bloques 704 y 904 como vehículos para la transfección de ARN (véase la figura 4).

De hecho, se observa que los copolímeros de bloques son muy eficientes para la transfección de moléculas de ARN, incluso a concentraciones bajas de copolímeros de bloques (véase la figura 9), tras la administración intramuscular en músculo esquelético de ratón.

5 **Ejemplo 10: Influencia de la concentración de un copolímero de bloques anfifílico no iónico de POE-PPO tetrafuncional de 7332 g/mol sobre la eficiencia de la transfección.**

Fin: Este estudio comparativo proporciona pruebas de la eficiencia de un copolímero de bloques de fórmula general:



10 De hecho, se observa que los copolímeros de bloques son muy eficientes para la transfección de moléculas de ARN, incluso a concentraciones bajas de copolímeros de bloques (véase la figura 10), tras la administración intramuscular en músculo esquelético de ratón.

15 **Ejemplo 11: Efecto *in vivo* de una administración intramuscular de formulaciones de copolímeros de bloques con un ARNm que codifica EPO, sobre el nivel de hematocrito en ratones.**

Fin: Este estudio proporciona muestras de la variación de EPO y hematocrito en ratones a lo largo del tiempo, tras la administración intramuscular en ratones (véase la figura 11).

20 **Ejemplo 12: Influencia de los copolímeros de bloques como vehículos para los ARNm modificados no protegidos.**

Fin: Este estudio proporciona pruebas de que los copolímeros de bloques son particularmente eficientes para promover la expresión de los ARNm modificados no protegidos en un hospedante eucariota (véase la figura 12).

25 Actividad de β-galactosidasa un día después de la inyección intramuscular de 15 μg de ARNm modificado no protegido que codifica la β-galactosidasa formulado con 704 a 20 x 10⁻⁴% como referencia y 10257 a 100 x 10⁻⁴%, 3648 a 10 x 10⁻⁴%, 1614 a 20 x 10⁻⁴% y 7426 a 100 x 10⁻⁴%.

Los ARN modificados que se usaron se modificaron en todas las bases de uracilo y de citosina, respectivamente, usando los nucleótidos pseudouridina-5'-trifosfato y 5-metilcitosina-5'-trifosfato. Veinticuatro horas después de la inyección, los músculos se cosecharon y se congelaron en nitrógeno líquido. La expresión de beta gal se evaluó con la ayuda del sistema de ensayo beta-Glo siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega #E4720) en extracto de músculo puro. Los resultados muestran que los copolímeros de bloques 10257, 3648, 1614 y 7426 son particularmente eficientes como vehículos, incluso en comparación con el copolímero de bloques 704.

30 **Ejemplo 13:**

Fin: Este estudio proporciona pruebas de la falta de respuesta inmune tras la administración de moléculas de ARN en combinación con copolímeros de bloques (véase la figura 13).

35 Se inyectaron a ratones con 20 μg de ADN plasmídico o de ARNm modificado protegido que codifica beta-galactosidasa, ya sea no formulado o formulado con copolímero de bloques tetrafuncional 904 o 10257. Cada columna representa el título medio de anticuerpos determinado mediante ELISA de al menos seis ratones individuales. Se observa que dichos copolímeros de bloques son particularmente eficientes para el suministro intracelular de moléculas de ARN y para terapia génica.

ES 2 759 243 T3

Listado de secuencias

SEQ ID N° 1: ácido nucleico que codifica β -galactosidasa de *E. coli*

ATGTCGTTTACTTTGACCAACAAGAACGTGATTTTCGTTGCCGGTCTGGGAGG
CATTGGTCTGGACACCAGCAAGGAGCTGCTCAAGCGCGATCCCGTCGTTTTAC
AACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCA
CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC
TTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGG
CACCAGAAGCGGTGCCGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGA
TACTGTCGTCTGCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCT
ACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACGGAG
AATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACA
GGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGT
GGTGCAACGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAA
TTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGT
GCTGCGTTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATG
AGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAG
CGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTTAATGATGATTTTCAGCCGCGCTGTACTGGA
GGCTGAAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTT
CTTTATGGCAGGGTGAAACGCAGGTCCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGT
GAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGTCTGAA
CGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGG
TGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGA
TGTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCA
AGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTACGAGCATCATCCTCTGCATGGT
CAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGA
ACAACTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGCATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTAC
ACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAAC
CCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGG
CGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCGAG
TGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACG
CGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAA

GGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGTACGCGCG
CGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAAT
GGCTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCAC
GCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCA
GTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGA
TTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGC
GATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCG
CACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGT
TCCGTTTATCCGGGCAAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCAT
AGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGG
CAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCACAAGGTAAACAGTTGATTGAA
CTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTAC
GCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGC
CTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCGT
CCCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTG
GGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTCTTTTACAGATGTG
GATTGGCGATAAAAAACAACCTGCTGACGCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTG
CACCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAAC
GCCTGGGTGCAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGT
TGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCT
CACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACC
GGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGC
GATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAG
CAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCG
CCTTACTGCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATAC
CCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGA
ATTATGGCCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTAC
AGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAG
AAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGAC
TCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGGCGGAATTACAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCA
TTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAA

ES 2 759 243 T3

SEQ ID N° 2: secuencia de la proteína β -galactosidasa de *E. coli*

MSFTLTNKNVIFVAGLGGIGLDTSKELLKRDPVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHP
PFASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEWRFAWFPAPEAVPESWLECDLPEADTVV
VPSNWQMHGYDAPIYTNVTYPITVNPFFVPTENPTGCYSLTFNVDESWLQEGQTR
IIFDGVNSAFHLWCNGRWVGYGQDSRLPSEFDLSAFLRAGENRLAVMVLRWSDG
SYLEDQDMWRMSGIFRDVSLHKKPTTQISDFHVATRFDNDFSRAVLEAEVQMCG
ELRDYLRVTVSLWQGETQVASGTAPFGGEIIDERGGYADRVTLRNLNVENPKLWS
AEIPNLYRAVVELHTADGTLIEAEACDVGFREVRIENGLLLLNGKPLLIRGVNRHE
HHPLHGQVMDEQTMVQDILLMKQNNFNNAVRC SHYPNHPLWYTLCDRYGLYVV
DEANIETHGMVPMNRLTDDPRWLPAMSERVTRMVQRDRNHPSVIIWSLGNESGH
GANHDALYRWIKSVDPSPRVQYEGGGADTTATDIICPMYARVDEDQPFPAVPKW
SIKKWLSLPGETRPLILCEYAHAMGNSLGGFAKYWQAFRQYPRLQGGFVWDWV
DQSLIKYDENGNPWSAYGGDFGDTPNDRQFCMNGLVFADRTPHPALTEAKHQQ
QFFQFRLSGQTIEVTSEYLF R HSDNELLHWMVALD GKPLASGEVPLDVAPQGKQL
IELPELPQPESAGQLWLTVRVVQPNATAWSEAGHISAWQQWR LAENLSVTLP AAS
HAIPHLTTSEMDFCIELGNKRWQFN R QSGFLS QMWIGDKKQLLTPLRDQFTRAPL
DNDIGVSEATRDPNAWVERWKAAGHYQAEAALLQCTADTLADAVLITTAHAW
QHQGKTLFISRKTYRIDGSGQMAITVDVEVASDTPHPARIGLNCQLAQAERVNW
LGLGPQENYPDRLTAACFDRWDLPLSDMYTPYVFPS ENGLRCGTRELNYGPHQW
RGDFQFNISRYSSQQQLMETSHRHLLHAE EGTWLNIDGFHMGIGGDDSWSPSVSAE
LQLSAGRYHYQLVWCQK

SEQ ID N° 3: RIG-I helicasa de *Homo sapiens*

MTTEQRRSLQAFQDYIRKTLDPITYILSYMAPWFREEEVQYIQA EKNNKGPMEAAT
 LFLKFLLELQEEGWFRGFLDALDHAGYSGLYEAIESWDFKKIEKLEEYRLLKRL
 QPEFKTRIIPTDIISDLSECLINQECEEILQICSTKGMMAGAEKLV ECLLRSDKENWP
 KTLKLALEKERNKFSELWIVEKGIKDVETEDLEDKMETSDIQIFYQEDPECQNLSE
 NSCPPSEVSDTNLYSPFKPRNYQLELALPAMKGKNTIICAPTGCGKTFVSLICEHH
 LKKFPQGQK GKVVFFANQIPVYEQQKSVFSKYFERHGYRVTGISGATAENVPVEQ
 IVENNDIILTPQILVNNLKKGTIPSLSIFTLMIFDECHNTSKQHPYNMIMFNYLDQK
 LGGSSGPLPQVIGLTASVGVGDAKNTDEALDYICKLCASLDASVIATVKHNLEELE
 QVVYKPQKFFRKVESRISDKFKYIIAQLMRDTESLAKRICKDLENLSQIQNREFGT
 QKYEQWIVTVQKACMVFMQMPDKDEESRICKALFLYTSHLRKYNDALIISEHARM
 KDALDYLKDFFSNVRAAGFEEIEQDLTQRFEELQELESVSRDPSNENPKLEDLCF
 ILQEEYHLNPETITILFVKTRALVDALKNWIEGNPKLSFLKPGILTGRGKTNQNTG
 MTLPAQKCILDAFKASGDHNILIATSVADEGIDIAQCNLVILYEYVGNVIKMIQTR
 GRGRARGSKCFLLTSNAGVIEKEQINMYKEKMMNDSILRLQTWDEAVFREKILHI
 QTHEKFIRDSQEKPKPVPDKENKLLCRKCKALACYTADVRVIEECHYTVLGDAF
 KECFVSRPHPKPKQFSSF EKRAKIFCARQNC SHDWGIHVKYKTFEIPVIKIESFVVE
 DIATGVQTLYSKWKDFHF EKIPFDPAEMSK

SEQ ID N° 4: EPO de *Mus musculus*

ATGGGGGTGCCCCAACGTCACCCTGCTGCTTTTACTCTCCTTGCTACTGATT
 CCTCTGGGCCTCCCAGTCCTCTGTGCTCCCCACGCCTCATCTGCGACAGTCGA
 GTTCTGGAGAGGTACATCTTAGAGGCCAAGGAGGCAGAAAATGTCACGATGG
 GTTGTGCAGAAGGTCCCAGACTGAGTGAAAATATTACAGTCCCAGATACCAA
 AGTCAACTTCTATGCTTGGAAAAGAATGGAGGTGGAAGAACAGGCCATAGAA
 GTTTGGCAAGGCCTGTCCCTGCTCTCAGAAGCCATCCTGCAGGCCCAGGCCCT
 GCTAGCCAATTCCTCCCAGCCACCAGAGACCCTTCAGCTTCATATAGACAAAG
 CCATCAGTGGTCTACGTAGCCTCACTTCACTGCTTCGGGTACTGGGAGCTCAG
 AAGGAATTGATGTCGCCTCCAGATAACCACCCACCTGCTCCACTCCGAACACT
 CACAGTGGATACTTTCTGCAAGCTCTTCCGGGTCTACGCCAACTTCCTCCGGG
 GGAAACTGAAGCTGTACACGGGAGAGGTCTGCAGGAGAGGGGACAGGTGA

ES 2 759 243 T3

SEQ ID Nº 5: Luciferasa de luciérnaga

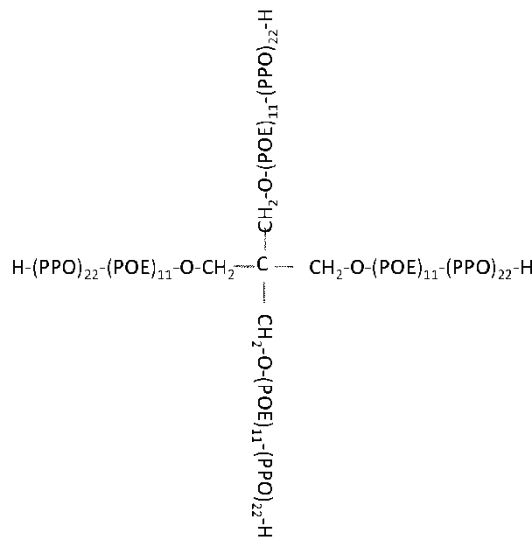
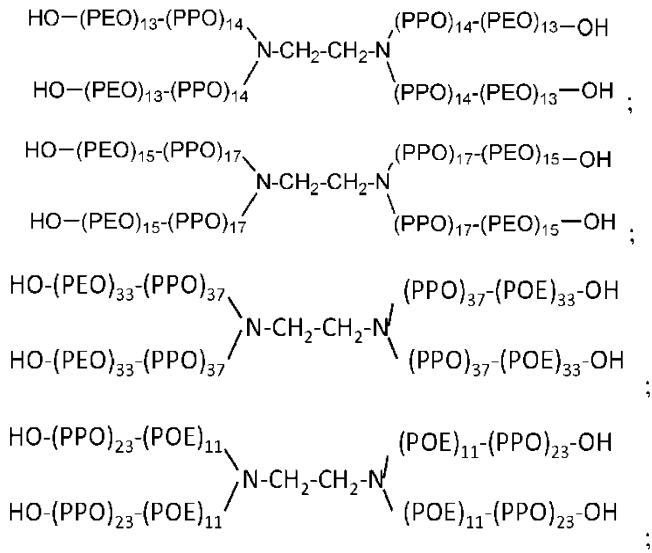
ATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACGCGGAATACTTCGAAATGTCCGTT
CGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCG
TCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGGCGCGTTAT
TTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTATAATGAACGTAAGCAC
CCTCGCCATCAGACCAAAGGGAATGACGTATTTAATTTTTAAGGTGAATTGCT
CAACAGTATGAACATTTTCGCAGCCTACCGTAGTGTGGTTTCCAAAAAGGGGT
TGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAATTATT
ATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGT
CACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTACCAGAGTCCTT

TGATCGTGACAAAACAATTGCACTGATAATGAATTCCTCTGGATCTACTGGGT
TACCTAAGGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAAGTGCCTGCGTCAGATTCTCGCAT
GCCAGGTATGTCGTATAACAAGAGATTAAGTAATGTTGCTACACACATTGTAG
AGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTTGT
TCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGG
ATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCT
TCAGGATTACAAAATTCAAAGTTCGTTGCTAGTACCAACCCTATTTTCATTCTT
CGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTG
CTTCTGGGGGCGCACCTCTTTTCGAAAGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCAAAAACG
GTGAGTTAAGCGCATTGCTAGTATTTCAAGGCTCTAAAACGGCGCGTAGCTTC
CATCTTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTAT
TCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCCGGTAAAGTTGTTC
CATTTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTT
AATCAGAGAGGCGAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCCGGTTATGT
AAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACAT
TCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTGACCG
CTTGAAGTCTTTAATTAATAACAAAGGATATCAGGTAATGAAGATTTTTACAT
GCACACACGCTACAATACCTGTAGGTGGCCCCCGCTGAATTGGAATCGATATT
GTTACAACACCCCAACATCTTCGACGCGGGCGTGGCAGGTCTTCCCGACGATG
ACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATG
ACGGAAAAGAGATCGTGGATTACGTGCCAGTAAATGAATTCGTTTTACGTT
ACTCGTACTACAATCTTTTCATAGGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCG
CGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTC
GACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAG
TCCAAATTGTAAAATGTAAGTGTATTTCAGCGATGACGAAATCTTAGCTATTG
TAATATTATATGCAAATTGATGAATGGTAATTTTTGTAATTGTGGGGTCACTGTAC
TATTTTAACGAATAATAAAATCAGGTATAGGTAAGTAAAAA

REIVINDICACIONES

1. Un copolímero de bloques anfílico no iónico tetrafuncional, para uso en un método para el suministro intracelular de un ARNm protegido o no protegido en terapia génica; en el que dicho copolímero de bloques anfílico no iónico tetrafuncional se selecciona de:

5



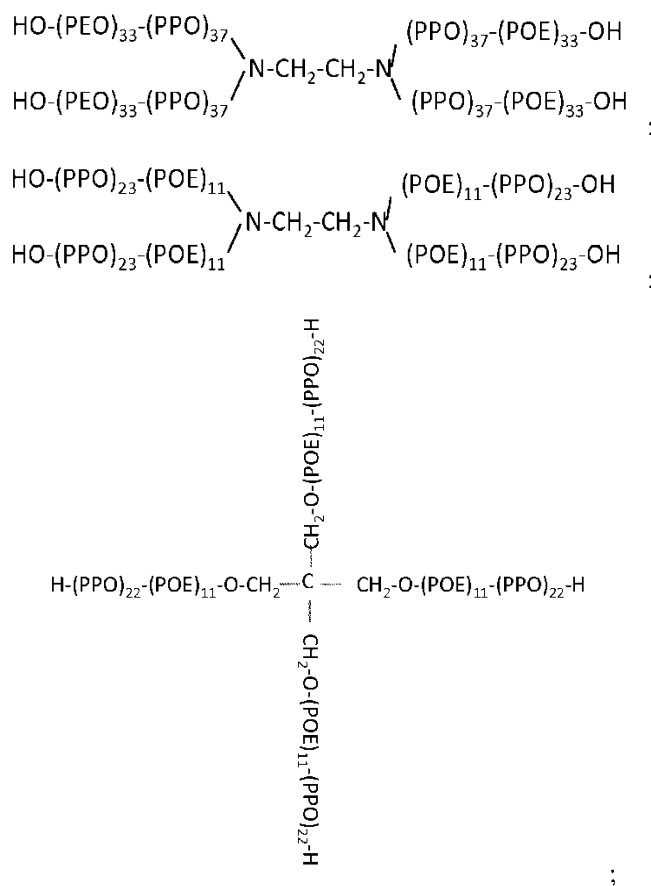
10 significando POE o PEO polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2. El copolímero de bloques anfílico no iónico tetrafuncional para uso en el método según la reivindicación 1, en el que dicho ARNm es un ARNm no protegido.

15 3. El copolímero de bloques anfílico no iónico tetrafuncional para uso en el método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho ARNm es un ARNm modificado no protegido o un ARNm no modificado no protegido.

4. El copolímero de bloques anfílico no iónico tetrafuncional para uso en el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ARNm es ARN_{5'ppp}; ARN_{5'pp}; ARN_{5'p} o ARN_{5'OH} mensajero.

20 5. Una composición que comprende un copolímero de bloques anfílico no iónico tetrafuncional, en combinación con al menos un ARN no protegido; en el que dicho copolímero de bloques anfílico no iónico tetrafuncional se selecciona de:

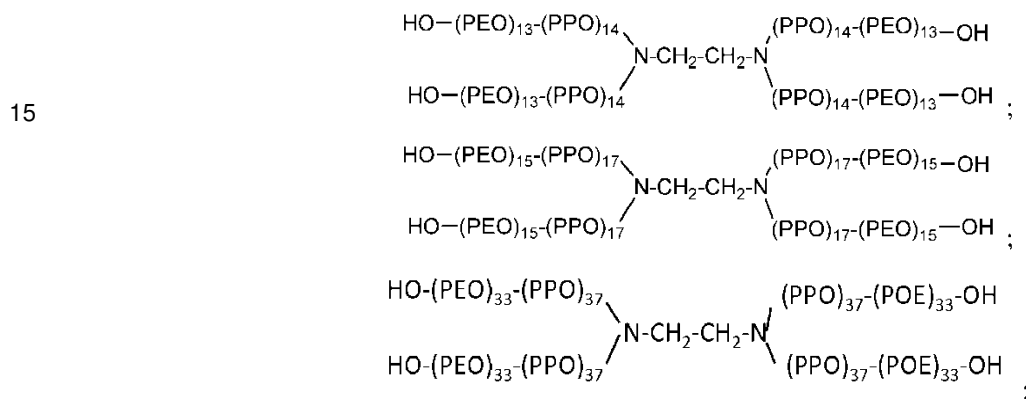


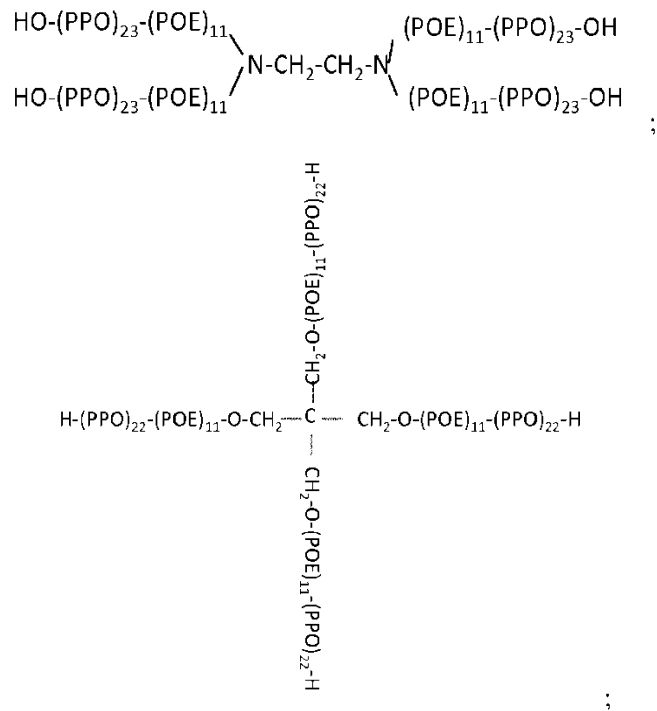
significando POE o PEO polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno;

5 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

6. El copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional para uso en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el al menos un ARNm protegido o no protegido es adecuado para expresar eritropoyetina (EPO) en un hospedante eucariota, y por que es para uso en un método para incrementar, mejorar, y/o mantener la expresión de eritropoyetina (EPO) en dicho hospedante eucariota.

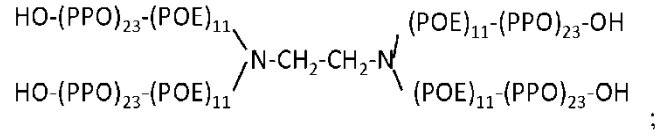
10 7. Un método para incrementar, mejorar, y/o mantener la expresión de una proteína en un hospedante eucariota, que comprende una etapa de transfectar al menos un ARNm protegido o no protegido, que codifica dicha proteína en dicho hospedante, con al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional; en el que dicho hospedante eucariota es una muestra *in vitro* o *ex vivo*; en el que dicho copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional se selecciona de:





significando POE o PEO polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 8. Un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional de fórmula:

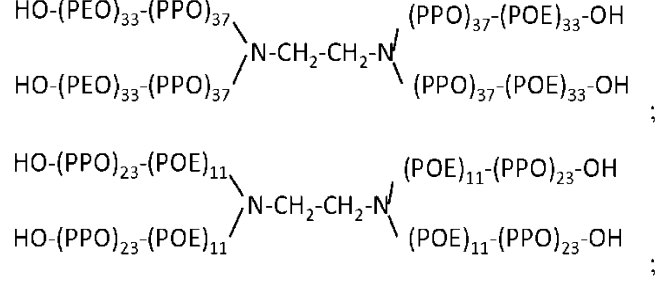


significando POE polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

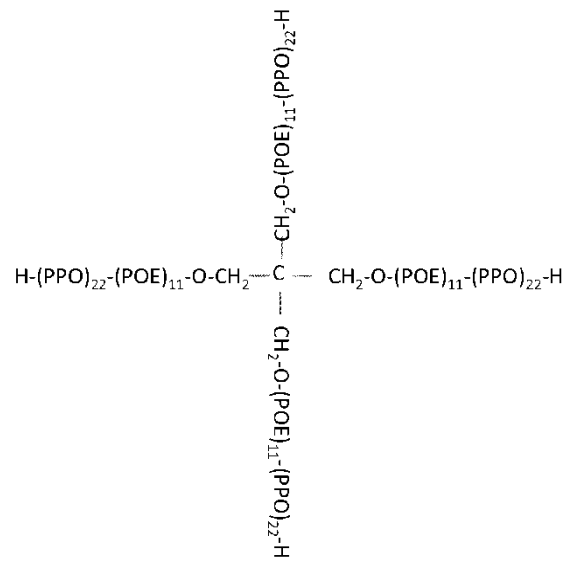
9. Un kit para el suministro intracelular o para terapia génica, que comprende:

- 10 (i) al menos un copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional; y
- (ii) al menos un ARNm no protegido;

en el que dicho copolímero de bloques anfifílico no iónico tetrafuncional se selecciona de:

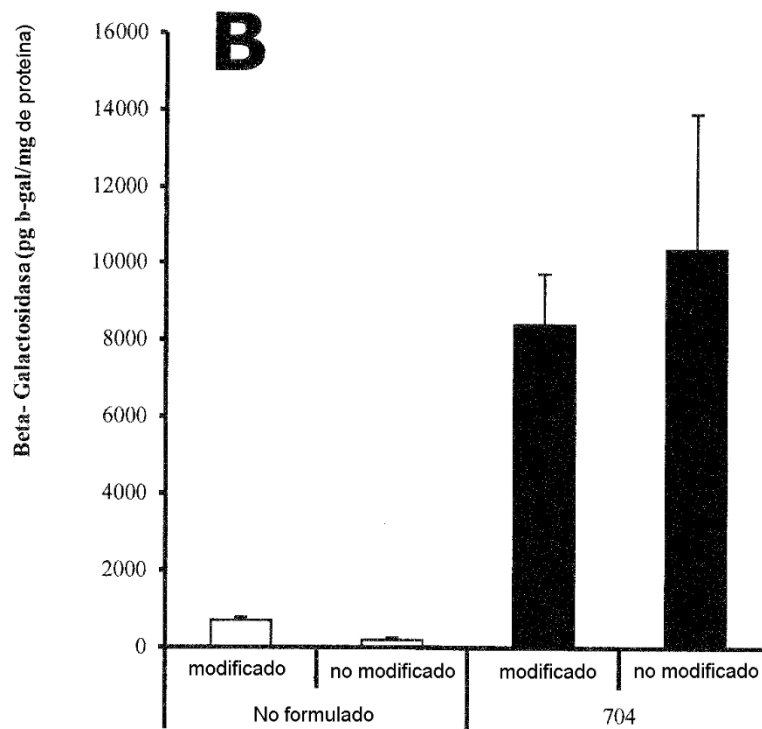
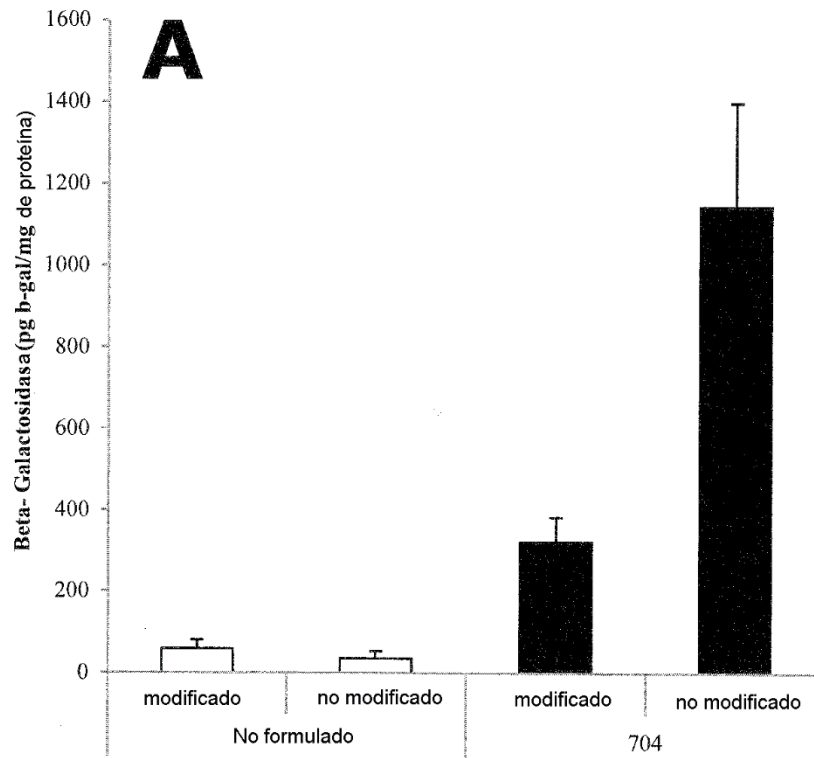


ES 2 759 243 T3

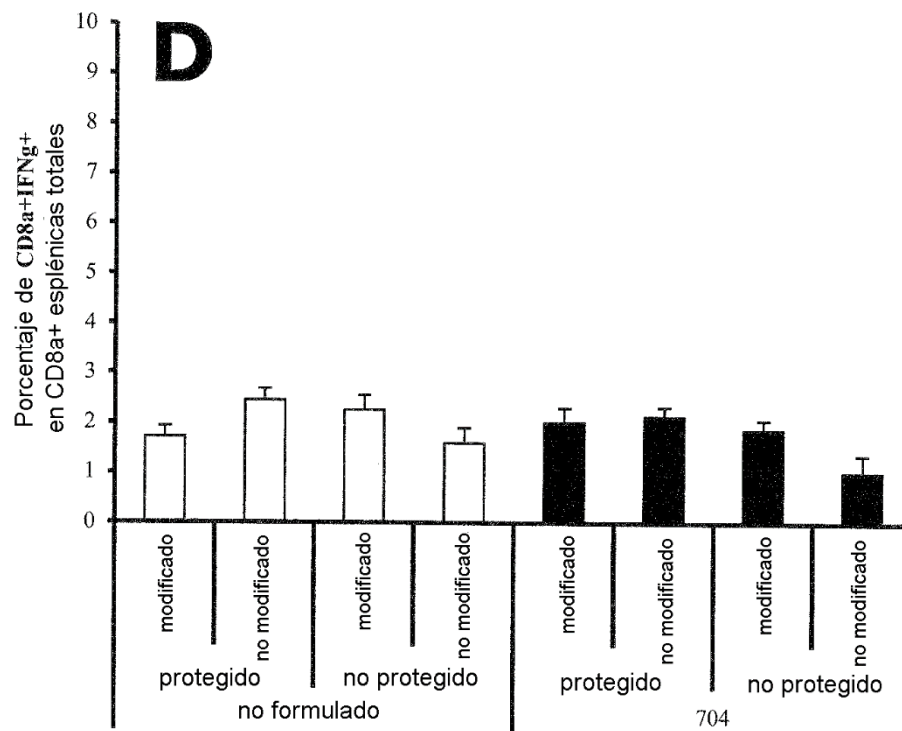
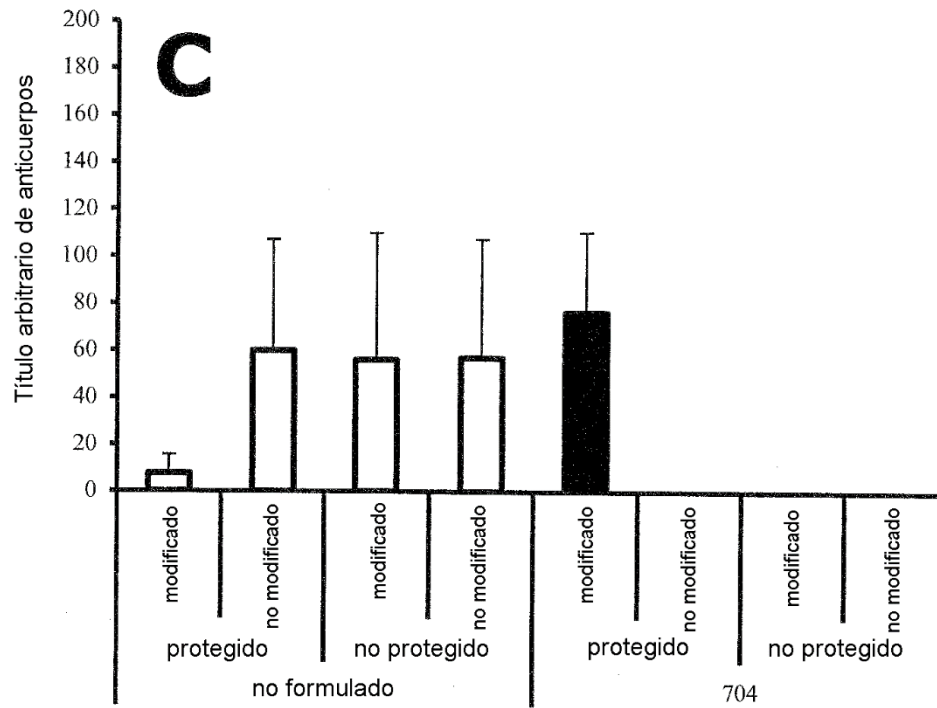


;

significando POE o PEO polióxido de etileno, y significando PPO polióxido de propileno;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.



Figuras 1A, 1B



Figuras 1C, 1D

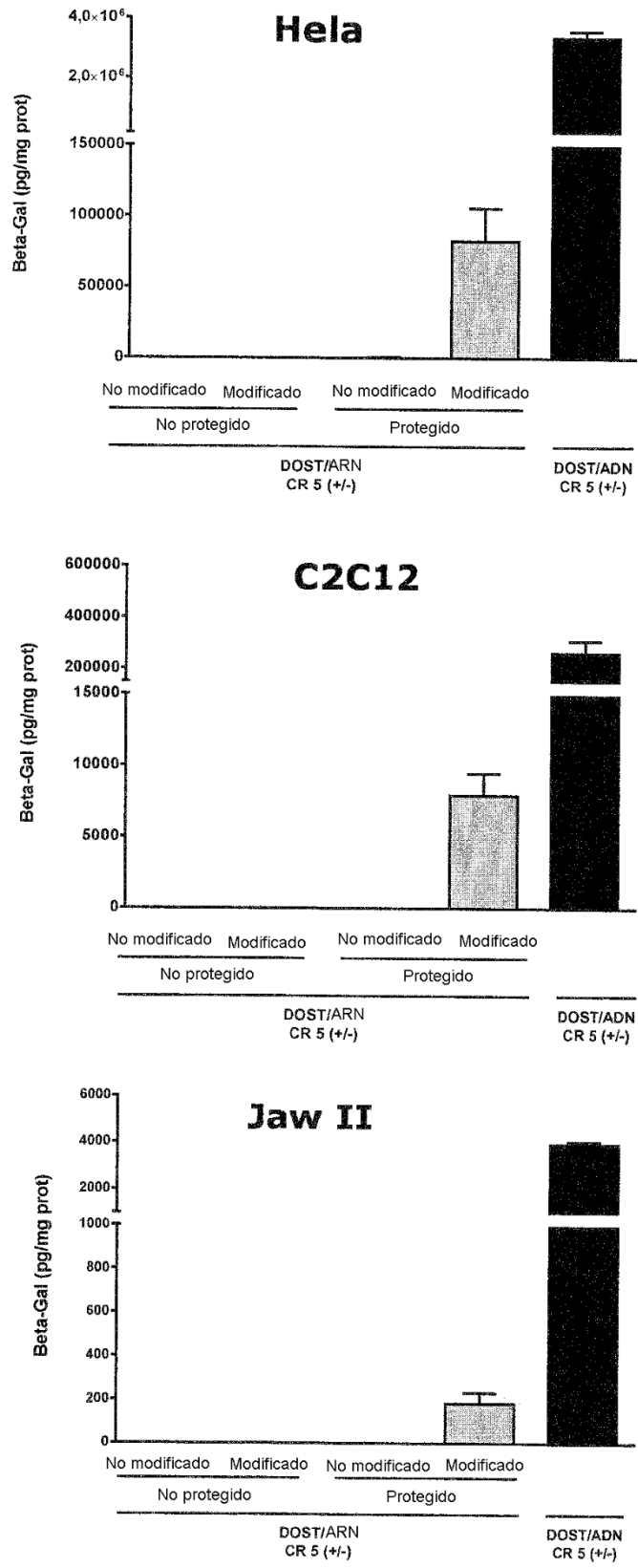


Figura 2

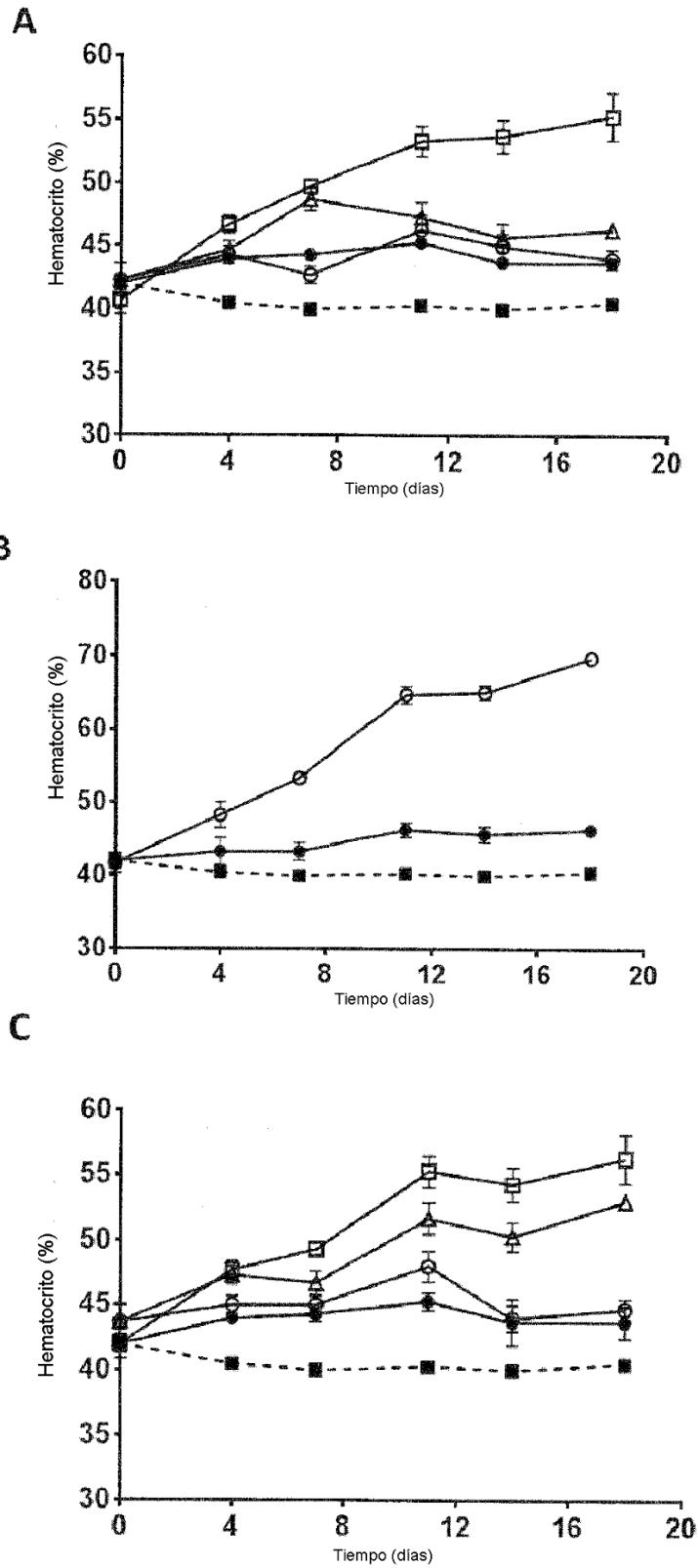


Figura 3 A, B, C

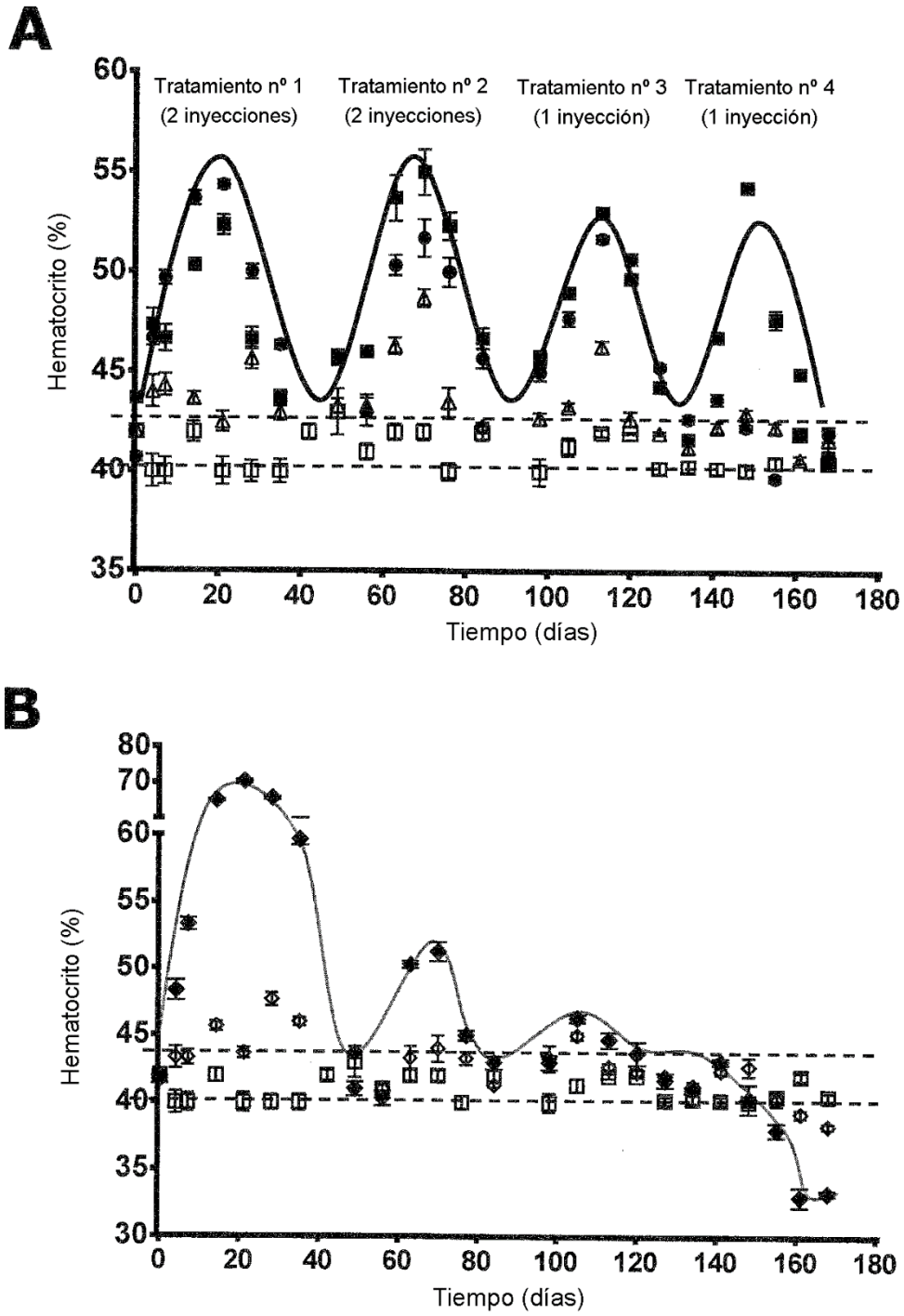
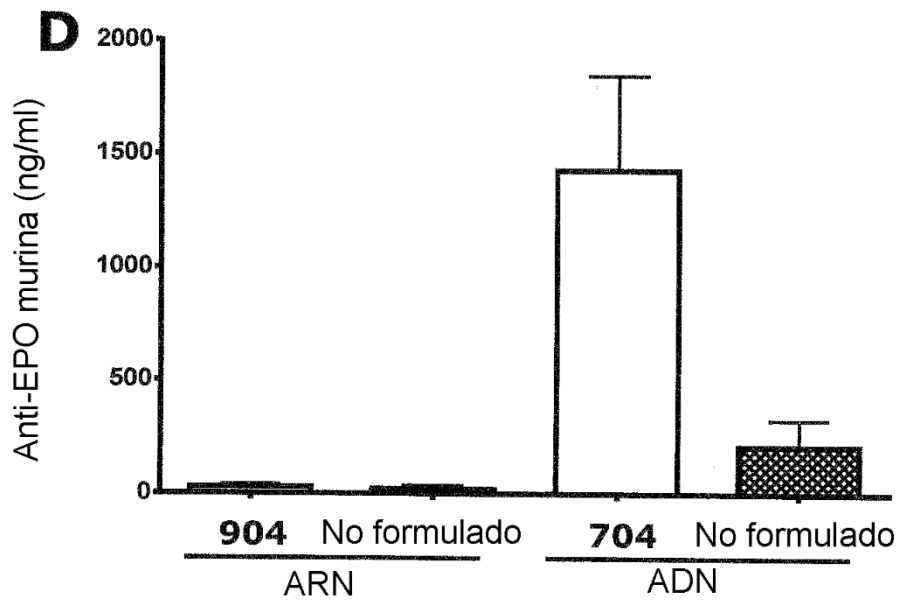
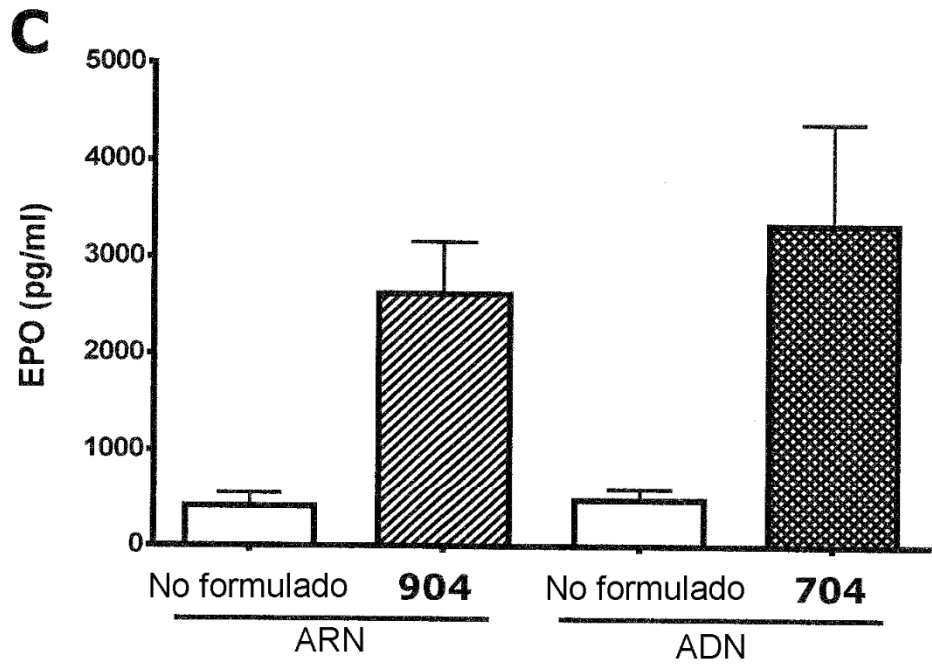


Figura 4 A, B



Figuras 4 C, D

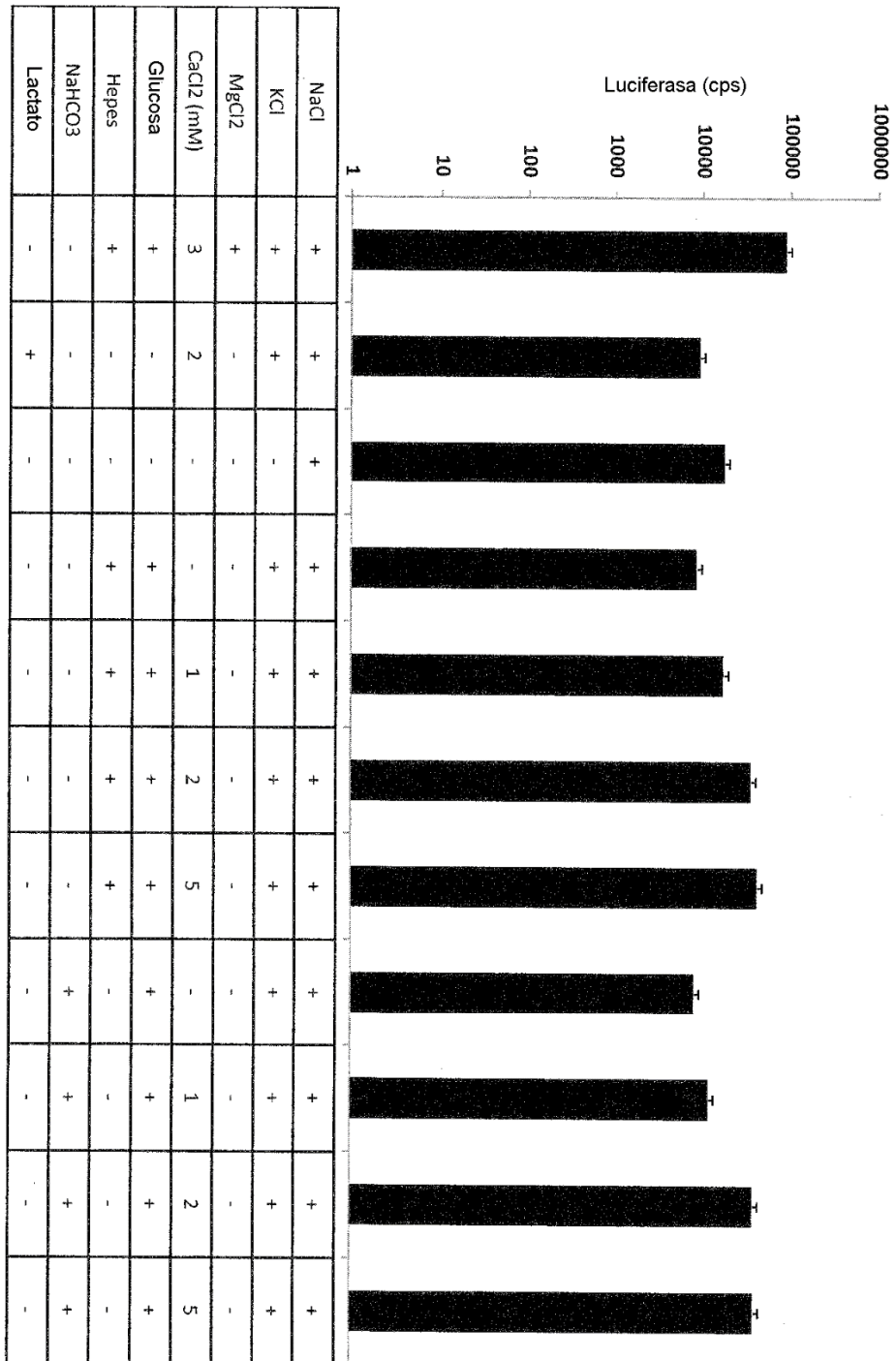


Figura 5

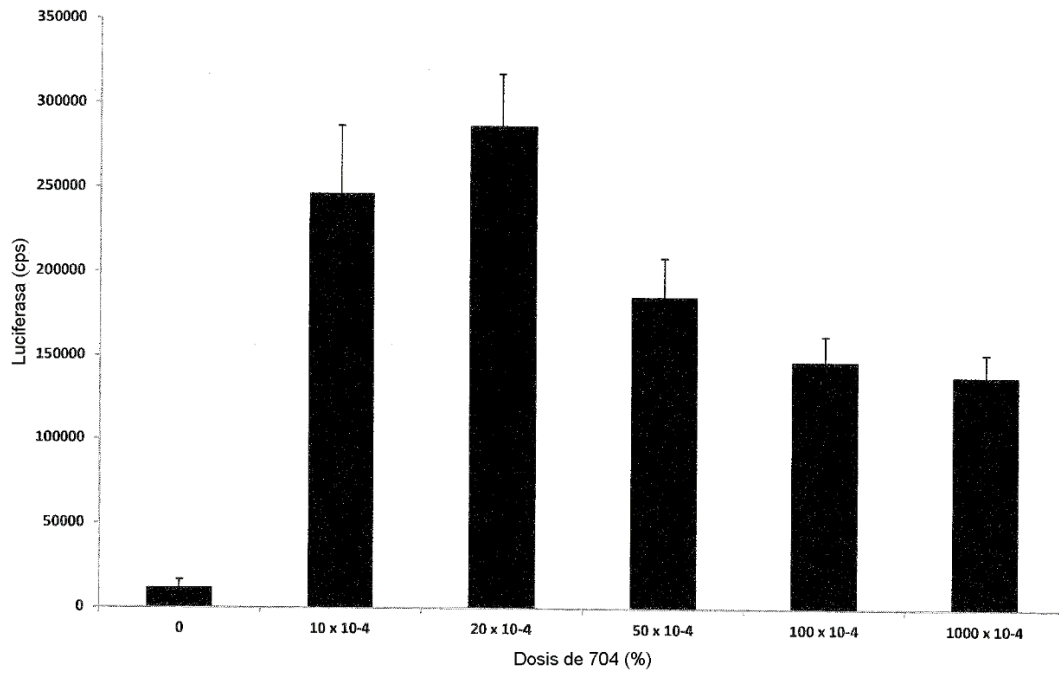


Figura 6

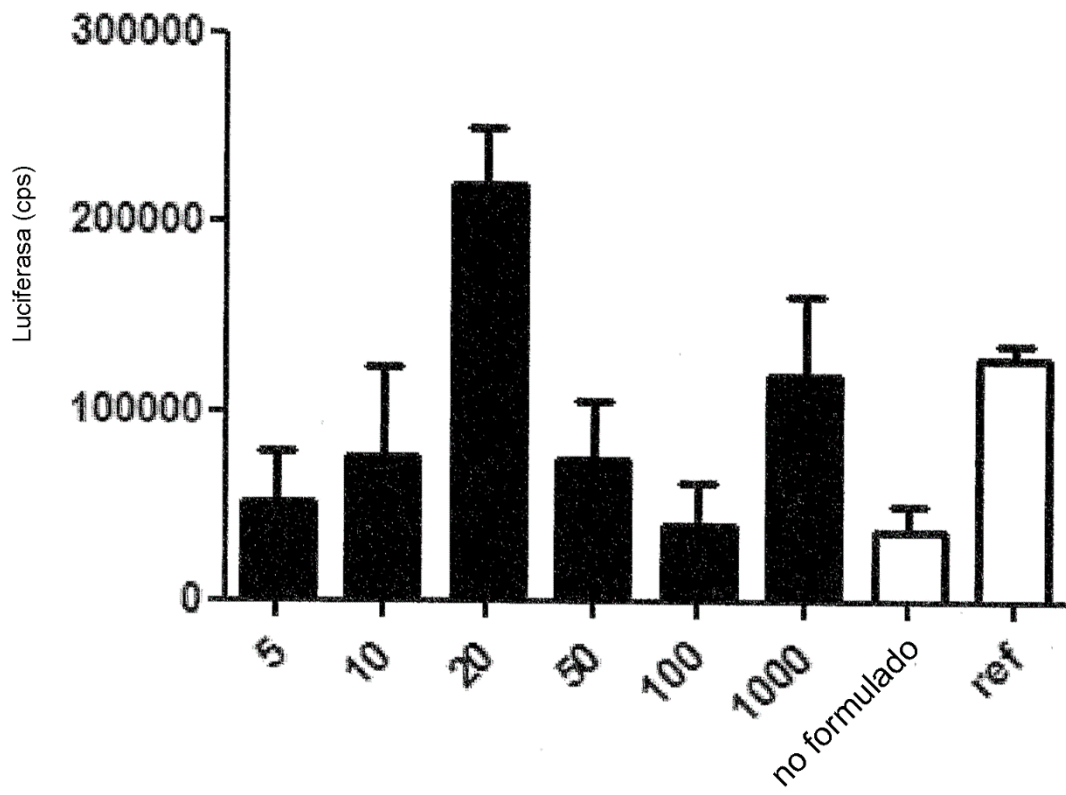


Figura 7

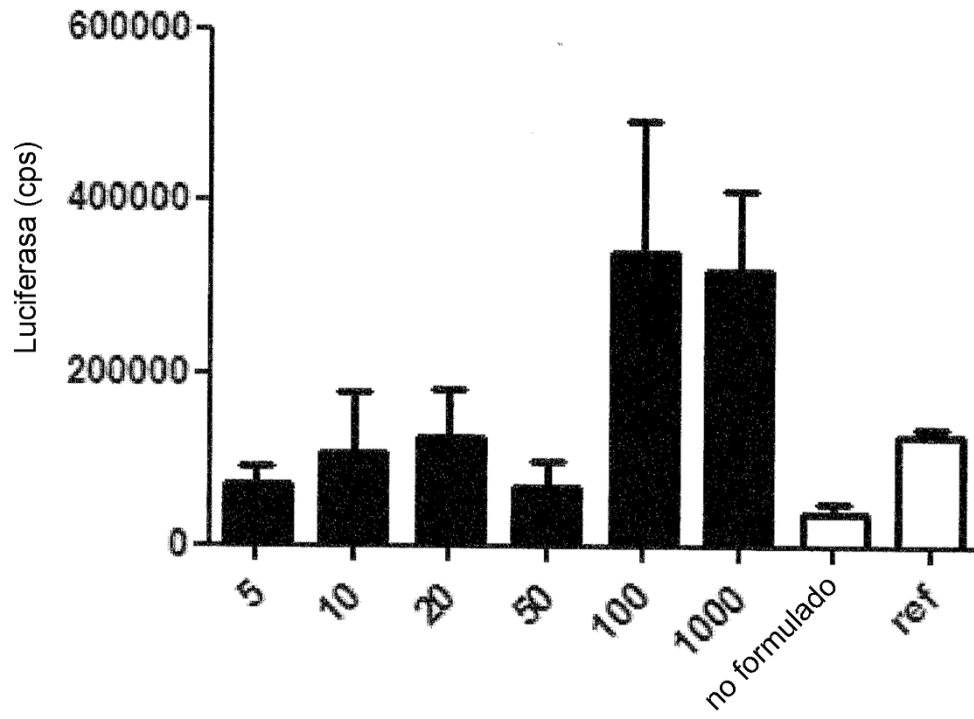


Figura 8

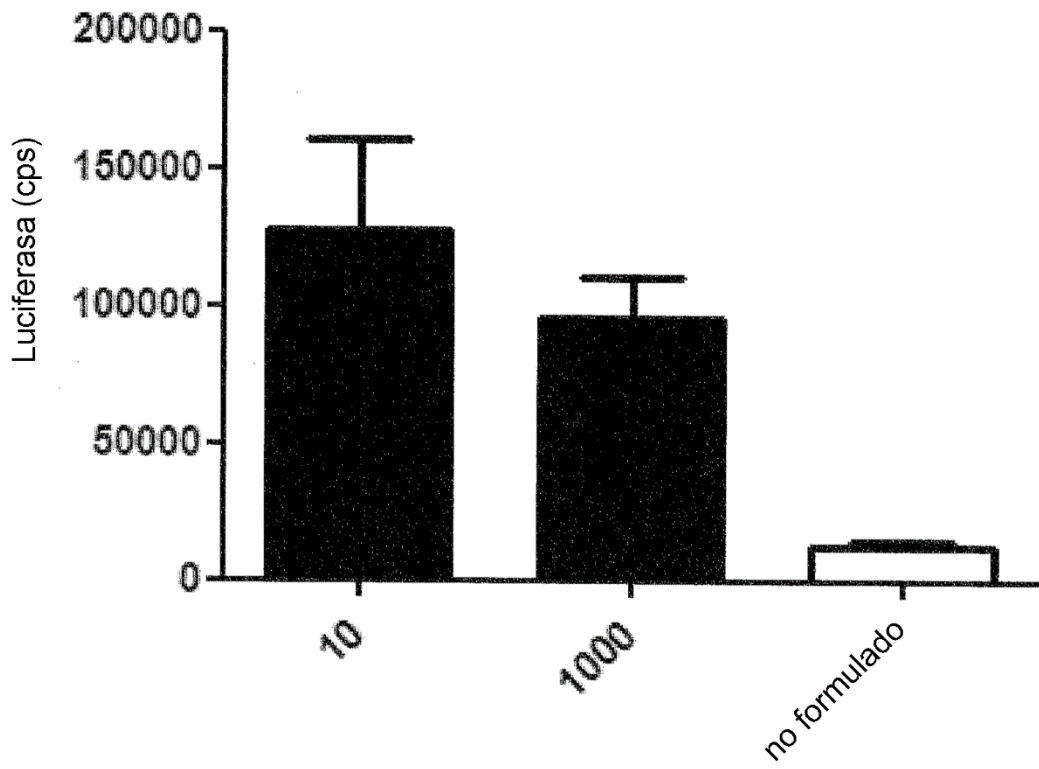


Figura 9

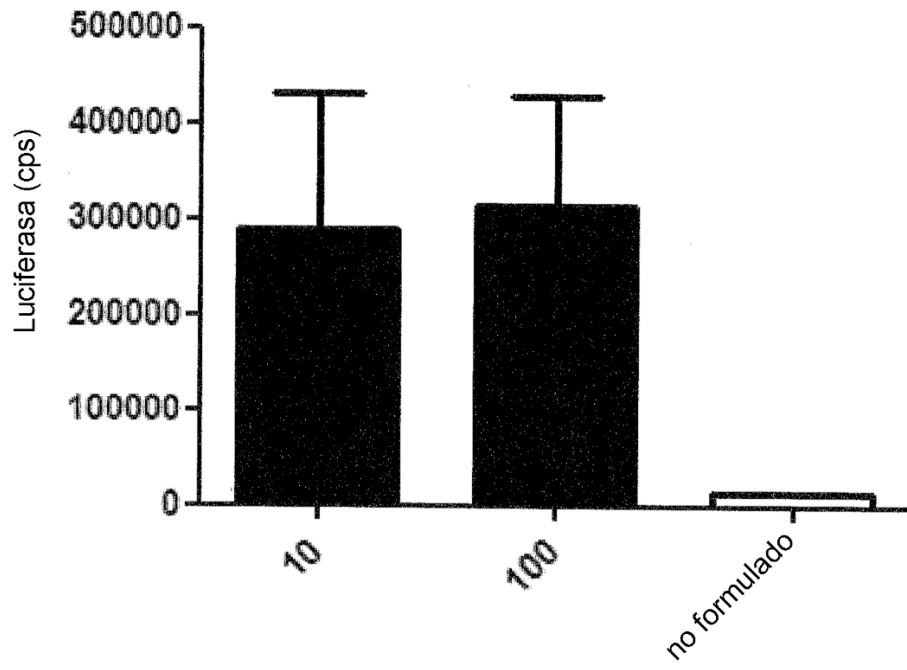


Figura 10

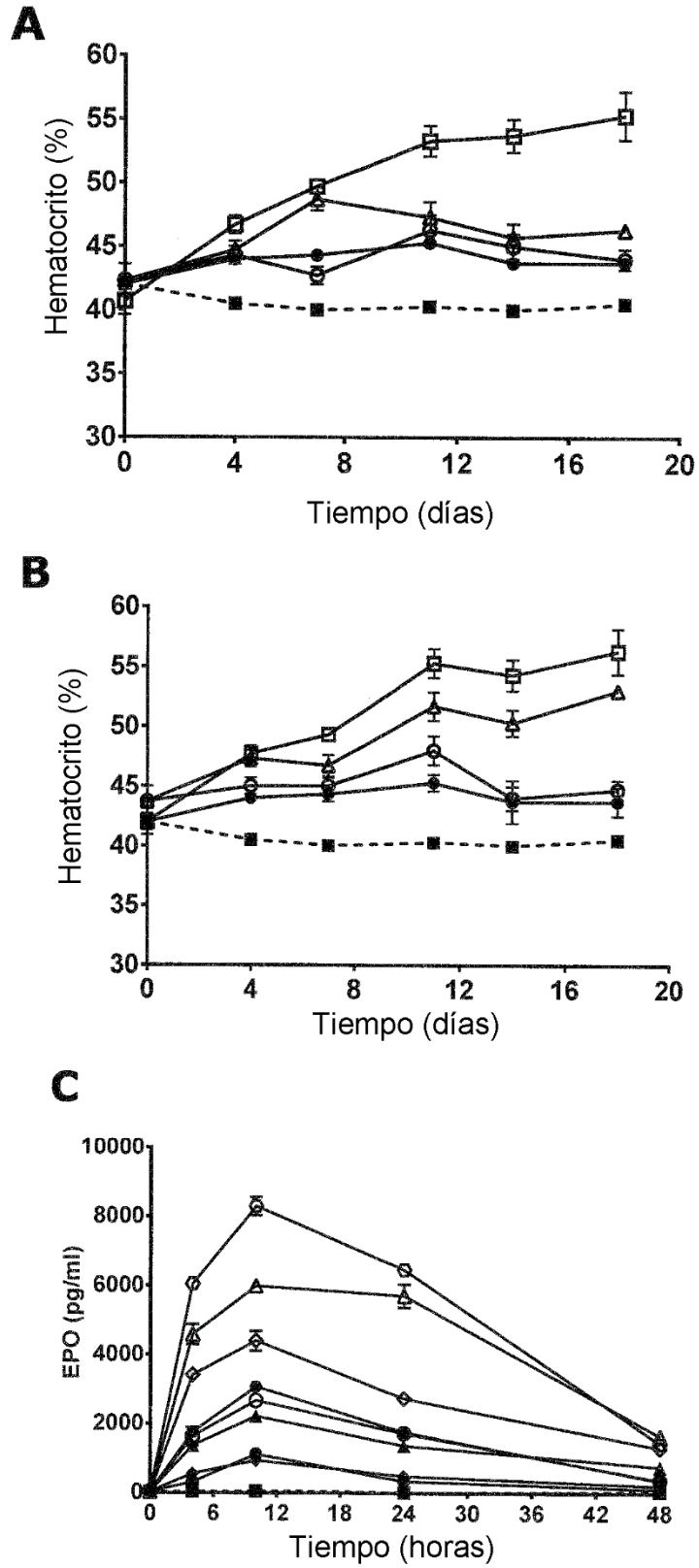
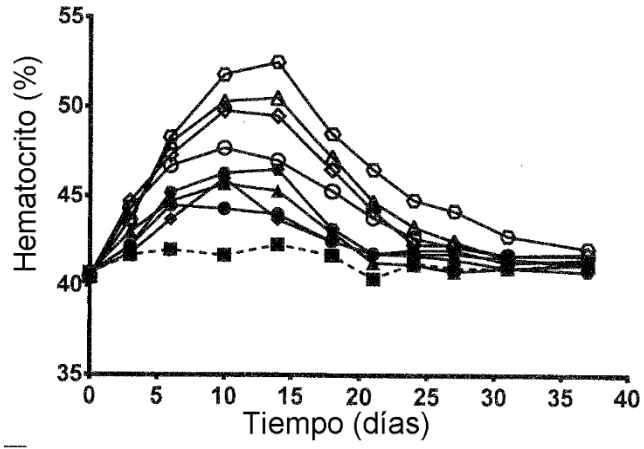
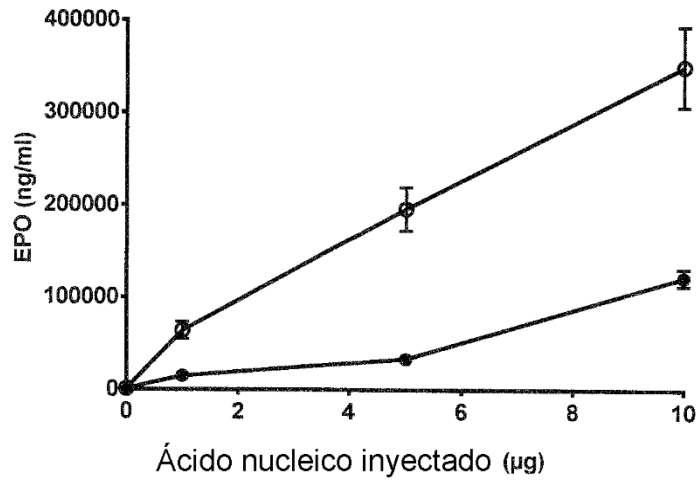


Figura 11 A, B, C

D



E



F

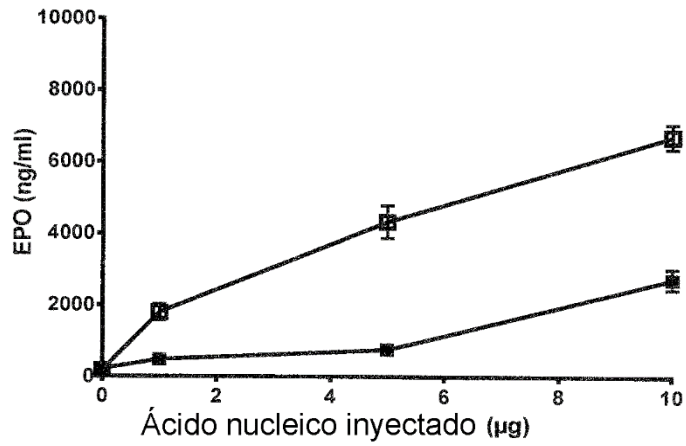


Figura 11 D, E, F

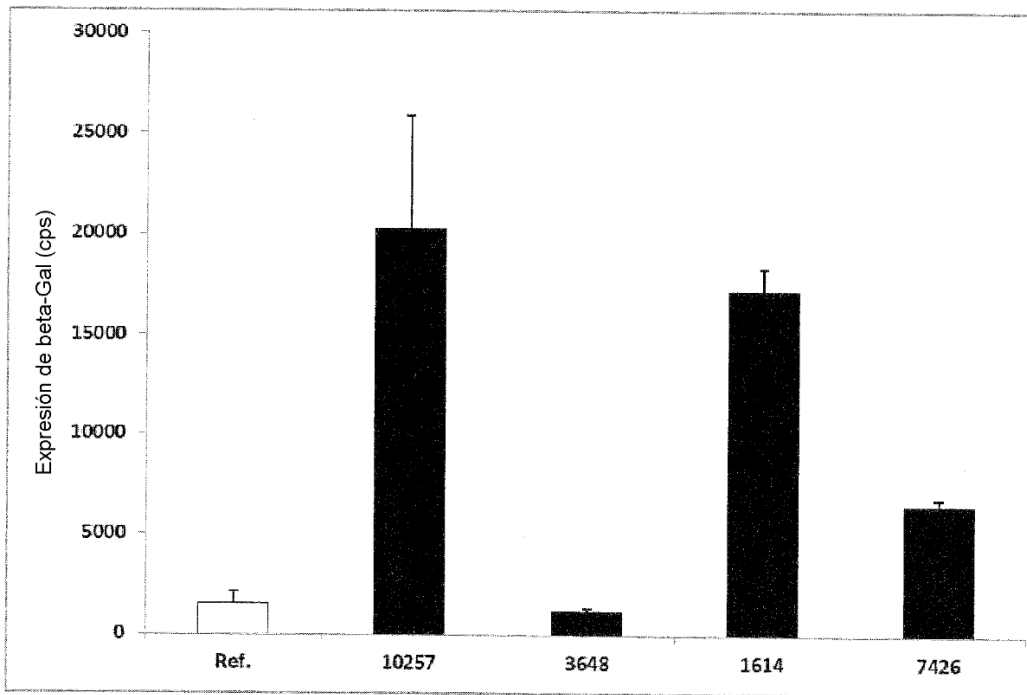


Figura 12

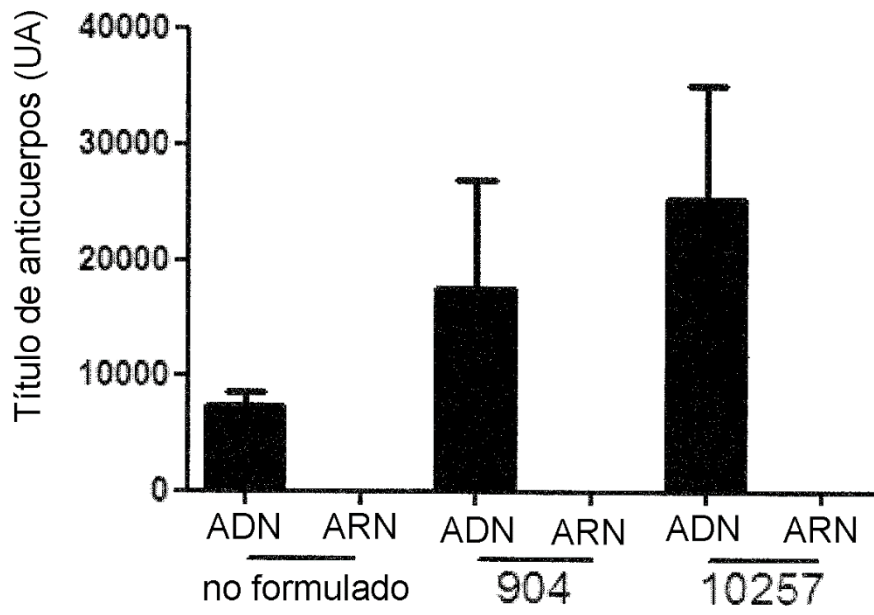


Figura 13