

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 701**

51 Int. Cl.:

C12N 15/67

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2016 PCT/US2016/055582**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17062513**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2016 E 16782372 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3359670**

54 Título: **Procedimientos para la administración terapéutica de medicamentos de ácido ribonucleico mensajero**

30 Prioridad:

**05.10.2015 US 201562237462 P
01.04.2016 US 201662317268 P
01.04.2016 US 201662317271 P
01.04.2016 US 201662317366 P
18.05.2016 US 201662338388 P
18.05.2016 US 201662338385 P
18.05.2016 US 201662338386 P
14.06.2016 US 201662350149 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HOGUE, STEPHEN;
CHAKRABORTY, TIRTHA;
BESIN, GILLES y
JAIN, RUCHI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 810 701 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

Procedimientos para la administración terapéutica de medicamentos de ácido ribonucleico mensajero

5 Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que los productos biológicos, como los anticuerpos recombinantes, las citoquinas y los factores de crecimiento, son efectivos en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y la FDA ha aprobado una gran cantidad de dichos agentes para su uso en humanos (para una reseña, véase Kinch, M.S. (2015) Drug Discov. Today 20:393-398). La gran mayoría de los productos biológicos aprobados por la FDA son agentes a base de proteínas. Más recientemente, los agentes basados en ARN mensajero se están desarrollando como una realización terapéutica disruptiva. Hay varios ejemplos reportados de vacunas efectivas basadas en ARNm que incluyen tanto vacunas contra enfermedades infecciosas como vacunas contra tumores (para las reseñas respectivas, véase Maré M.A., y col. (2015) Expert Opin Drug Deliv. Sep 12:1-15 y Sahin, U., y col. (2014) Nature Reviews Drug Discovery 13:759-780). Más recientemente, se apunta al uso de agentes basados en ARNm con fines terapéuticos, por ejemplo, usando constructos de ARNm que codifican una proteína terapéutica de interés.

En consecuencia, se necesitan nuevas estrategias y procedimientos para el uso de agentes basados en ARNm en un sujeto, tales como agentes terapéuticos basados en ARNm, particularmente procedimientos que ofrecen propiedades ventajosas con respecto a la seguridad y/o la efectividad terapéutica del agente basado en ARNm en el sujeto.

Resumen de la Invención

La presente invención se define en las reivindicaciones y proporciona un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNm comprende:

- (i) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p;
- (ii) al menos un sitio de unión de miR-126; o
- (iii) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de miR-126, opcionalmente donde el ARNm comprende una o más nucleobases modificadas, para usar en un procedimiento para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpo antidrogas en un sujeto, el procedimiento comprende administrar el ARNm al sujeto de tal manera que una respuesta de anticuerpo antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

Otros aspectos de la invención también se definen en las reivindicaciones.

La descripción proporciona procedimientos para usar con agentes basados en ARNm para administrar a un sujeto, donde los procedimientos proporcionan características ventajosas para el uso de los agentes basados en ARNm *in vivo*. Ahora, se ha descubierto sorprendentemente que la administración a primates no humanos de agentes basados en ARNm que codifican una proteína de interés puede conducir al desarrollo de una respuesta inmune no deseada en animales, donde los anticuerpos contra la proteína codificada por el ARNm pueden detectarse en el animal. Este es un resultado inesperado, ya que al animal no se le administró una proteína terapéutica, sino más bien un constructo de ARNm, y no se esperaba que la producción local de la proteína de interés en los tejidos diana *in vivo* condujera a una respuesta contra el producto proteico codificado. La respuesta observada en primates no humanos también se ha estudiado en otros sistemas de modelos animales relevantes y es análoga a la respuesta de anticuerpos antidrogas (ADA) reconocida en la técnica vista tanto en los campos de tratamientos de proteínas recombinantes como en de tratamientos de moléculas pequeñas. Una distinción reconocible en la terminología es evidente para el experto en la materia en que una respuesta clásica de anticuerpo antidrogas (ADA) generalmente se entiende como respuesta a la administración sistémica de, por ejemplo, una proteína terapéutica recombinante, que puede generar anticuerpos directamente a dicha proteína terapéutica. En el campo del tratamiento con ARNm, las respuestas de anticuerpos observadas en los estudios en animales descritos en esta invención no corresponden al fármaco basado en ARNm *per se*. Por el contrario, las respuestas de anticuerpos son al producto proteico codificado por el fármaco de ARNm. El experto en la materia puede referirse a un fenómeno como el anticuerpo antiproteína (APA), pero debido a los efectos farmacológicamente análogos, la aplicación instantánea usará la terminología reconocida en la técnica del anticuerpo antidrogas (ADA).

Sorprendentemente, ahora también se ha descubierto que la inclusión en el constructo de ARNm de al menos un sitio de unión de microARN (miR) para un miR expresado en células inmunes convencionales o cualquier célula que exprese TLR7 y/o TLR8 y secrete quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, en células inmunes de

órganos linfoides periféricos y/o esplenocitos y/o células endoteliales) da como resultado una inhibición dramática de las respuestas de ADA *in vivo*. En consecuencia, la descripción proporciona procedimientos para reducir o inhibir las respuestas de anticuerpos antidrogas en las que una proteína de interés está codificada por un ARN mensajero (ARNm) que comprende al menos un sitio de unión de microARN (miR) para un miR expresado en células inmunes

5 convencionales o cualquier célula que expresa TLR7 y/o TLR8 y secreta quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos, como células de bazo, por ejemplo, células mieloides esplénicas, y/o células endoteliales). En aspectos ejemplares, la descripción proporciona procedimientos para reducir o inhibir las respuestas de anticuerpos antidrogas en las que una proteína de interés está codificada por un ARN mensajero (ARNm), por ejemplo, ARN mensajero modificado (ARNmm) que comprende una o más

10 nucleobases modificadas y el ARNm, por ejemplo, ARNmm, además comprende al menos un sitio de unión de microARN (miR) para un miR expresado en células inmunes convencionales o cualquier célula que expresa TLR7 y/o TLR8 y secreta quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos, como células de bazo, por ejemplo, células mieloides esplénicas, y/o células endoteliales). En los procedimientos de la descripción, a un sujeto se le administra el ARNm, por ejemplo, ARNmm, que codifica el

15 polipéptido de interés y que comprende el sitio de unión para el al menos un miR expresado en células inmunes de tal manera que una respuesta de anticuerpo antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto. En realizaciones ejemplares, el sitio de unión de miR es para un miR expresado abundante o preferentemente en células inmunes (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos y/o esplenocitos). En realizaciones ejemplares, el sitio de unión de miR está incluido en una región sin traducir (UTR) del ARNm, por ejemplo, ARNmm,

20 que codifica la proteína de interés (*por ejemplo*, la 3' UTR, la 5' UTR, o en ambas 3' y 5' UTR). Por consiguiente, en los procedimientos de la descripción, una respuesta de anticuerpos antidrogas se reduce o inhibe mediante la regulación postranscripcional del ARNm, con un posible componente de la represión traduccional, mediante la inclusión de al menos un sitio de unión de miR, sin la necesidad de alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés.

25 En una realización, el al menos un miR expresado en células inmunes es un sitio de unión de microARN de miR-142-3p. En otra realización, el al menos un miR expresado en células inmunes es un sitio de unión de microARN de miR-126, tal como un sitio de unión de miR-126-3p. En consecuencia, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antidrogas en un sujeto, lo que comprende administrar al sujeto

30 un ARN mensajero (ARNm), *por ejemplo*, un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm, comprende al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y/o al menos un sitio de unión de microARN de miR-126, y donde el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm, comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que se reduce o inhibe una respuesta de anticuerpos antidrogas al polipéptido de interés en el sujeto. En una realización, el sitio de unión de microARN de miR-142-3p comprende la

35 secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3. En una realización, el sitio de unión de miR-126 es un sitio de unión de miR-126-3p. En una realización, el sitio de unión de microARN de miR-126-3p comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 26.

En otras realizaciones, el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm, comprende al menos un sitio de unión de microARN para un

40 miR seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-142, miR-146, miR-155, miR-126, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27. Un miR al que se hace referencia en esta invención con un número puede referirse a cualquiera de los dos microARN maduros que se originan en brazos opuestos del mismo pre-miARN (por ejemplo, el microARN 3p o 5p). Todos los miR a los que se hace referencia con un número en esta invención pretenden incluir tanto los brazos/secuencias 3p como los 5p.

45 En otro ejemplo, el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm, comprende al menos dos sitios de unión de miR para los microARN expresados en células inmunes. En varias realizaciones, el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm comprende 1-4, uno, dos, tres o cuatro sitios de unión de miR para los microARN expresados en células inmunes. Estos sitios de unión de miR pueden ser para microARN seleccionados de entre el grupo que consiste en miR-142 (incluidos miR-142-3p y miR-142-5p), miR-146 (incluidos miR-146-3p y miR-146-5p), miR-155, miR-126 (incluidos miR-126-3p y miR-126-5p), miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27 y combinaciones de los mismos. En otra realización, el

50 ARNm, *por ejemplo*, el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión de miR, para microARN expresados en células inmunes, donde al menos uno de los sitios de unión de miR es para miR-142-3p. En diversas realizaciones, el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm, comprende sitios de unión para miR-142-3p y miR-155, miR-142-3p y miR-146, o

55 miR-142-3p y miR-126 (por ejemplo, miR-126-3p). En otra realización, el ARNm, *por ejemplo*, el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión de miR, para microARN expresados en células inmunes, donde al menos uno de los sitios de unión de miR es para miR-126 (por ejemplo, miR-126-3p). En varias realizaciones, el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm, comprende sitios de unión para miR-126 y miR-155, miR-126 y miR-146, o miR-126 y miR-142. En una realización, el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm, comprende un sitio de unión de miR-142-3p y un sitio de unión

60 de miR-126.

En una realización, el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm, comprende una 5' UTR, un marco de lectura abierto optimizada de codón que codifica el polipéptido de interés, una 3' UTR que comprende el al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes de y una región de cola 3' de nucleósidos enlazados. En 5 varias realizaciones, la 3' UTR comprende 1-4, al menos uno, dos, tres o cuatro sitios de unión de microARN para miR expresados en células inmunes, preferentemente expresados de abundante o preferencial en células inmunes (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos y/o esplenocitos). En otras realizaciones, la 3' UTR comprende al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p o al menos dos sitios de unión de miR para miR expresados en células inmunes, donde un sitio de unión de miR es para miR-142-3p. En otra realización, la 3' UTR 10 comprende al menos un sitio de unión de microARN de miR-126 o al menos dos sitios de unión de miR para miR expresados en células inmunes, donde un sitio de unión de miR es para miR-126. En una realización, el marco de lectura abierto optimizado de codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión de microARN (por ejemplo, un sitio de unión de miR-142-3p y/o un sitio de unión de miR-126) se encuentra dentro de la 3' UTR 1-100 nucleótidos después del codón de parada. En otra realización, el marco 15 de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión de microARN (por ejemplo, un sitio de unión de miR-142-3p y/o un sitio de unión de miR-126) se encuentra dentro de la 3' UTR 30-50 nucleótidos después del codón de parada. En otra realización, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión de microARN (por ejemplo, un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y/o un sitio de 20 unión de microARN de miR-126) se ubica dentro de la 3' UTR al menos 50 nucleótidos después del codón de parada.

En otra realización, el ARNm, *por ejemplo*, el ARNmm, comprende una 5' UTR y una 3' UTR que son heterólogas al marco de lectura abierto.

25 En otra realización, el ARNm modificado químicamente, *por ejemplo*, ARNmm, está completamente modificado. En otras realizaciones, el ARNm modificado químicamente, *por ejemplo*, ARNmm, comprende una o más nucleobases modificadas descritas adicionalmente en esta invención.

30 En algunas realizaciones, el ARNm comprende pseudouridina (ψ). En algunas realizaciones, el ARNm comprende pseudouridina (ψ) y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$) y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 2-tiouridina (s^2U). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 2-tiouridina y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 5-metoxi-uridina (mo^5U). En 35 algunas realizaciones, el ARNm comprende 5-metoxi-uridina (mo^5U) y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 2'-O-metil uridina. En algunas realizaciones, el ARNm comprende 2'-O-metil uridina y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende N6-metil-adenosina (m^6A). En algunas realizaciones, el ARNm comprende N6-metil-pseudouridina (m^6A) y 5-metil-citidina (m^5C).

40 En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNmm descrito en esta invención comprende pseudouridina (ψ), N1-metilpseudouridina ($m^1\psi$), 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina o 2'-O-metil uridina, o combinaciones de los mismos. En algunas 45 realizaciones, un ARNm de la descripción incluye una combinación de una o más de las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 5-metoxi-uridina (mo^5U), 5-metil-citidina (m^5C), pseudouridina (ψ), α -tio-guanosina o α -tio-adenosina. En algunas realizaciones, un ARNm de la 50 descripción incluye una combinación de una o más de las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

En una realización, el ARNm, *por ejemplo*, ARNmm, se administra de manera intravenosa, encapsulado en una nanopartícula lipídica. En una realización, el agente antiinflamatorio es un corticosteroide. En una realización, la 55 nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico y/o ionizables En una realización, el lípido catiónico y/o ionizable es DLin-KC2-DMA o DLin-MC3-DMA.

En una realización, el polipéptido de interés es una proteína terapéutica, una citoquina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o una proteína de fusión. Otros ejemplos de polipéptidos de interés se describen en esta invención.

En una realización, el ARNm, *por ejemplo*, ARNm_{mm}, se administra mediante una infusión una vez a la semana. En otra realización, la infusión se administra por vía intravenosa. En otra realización, el ARNm, *por ejemplo*, ARNm_{mm}, se administra mediante una infusión una vez a la semana durante al menos 4 semanas. En otra realización, el ARNm, *por ejemplo*, ARNm_{mm}, se administra por vía intratumoral. Los regímenes de dosificación adecuados se describen adicionalmente en esta invención.

En otra realización, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la respuesta de anticuerpos antidrogas después de la administración repetida de un polipéptido de interés a un sujeto, que comprende administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de un ARNm, *por ejemplo*, ARNm modificado (ARNm_{mm}), que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNm, *por ejemplo*, ARNm_{mm}, comprende al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y/o al menos un sitio de unión de microARN miR-126, y donde el ARNm, *por ejemplo*, ARNm_{mm}, comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis de ARNm, *por ejemplo*, ARNm_{mm}, encapsulado en una LNP, de modo tal que una respuesta de anticuerpo antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpo antidrogas después de la administración repetida de un polipéptido de interés a un sujeto, que comprende

- (i) administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de un ARNm, *por ejemplo*, ARNm modificado (ARNm_{mm}), que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNm, *por ejemplo*, ARNm_{mm}, comprende al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes (por ejemplo, un sitio de unión de microARN miR-142-3p y/o un sitio de unión de microARN miR-126), y donde el ARNm, *por ejemplo*, ARNm_{mm}, comprende una o más nucleobases modificadas;
 - (ii) detectar un nivel de anticuerpos antidrogas en una muestra de un sujeto; y
 - (iii) administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis de ARNm *por ejemplo*, ARNm_{mm}, encapsulado en una LNP cuando el nivel de anticuerpos antidrogas en la muestra disminuye, de modo tal que una respuesta de anticuerpo antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.
- En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la toxicidad relacionada con el fármaco en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un ARN mensajero (ARNm), *por ejemplo*, ARN mensajero modificado (ARNm_{mm}), que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNm *por ejemplo*, ARNm_{mm}, comprende al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes (por ejemplo, un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y/o un sitio de unión de microARN de miR-126) y donde el ARNm, *por ejemplo*, ARNm_{mm} comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que se reduce o inhibe la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés en el sujeto. En una realización, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés son los conteos sanguíneos reducidos (citopenia) en el sujeto. En una realización, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés es la autoinmunidad en el sujeto. En una realización, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés son los efectos mediados por el complemento en el sujeto. En una realización, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés es la hematopoyesis reducida en el sujeto. En otras realizaciones, la toxicidad relacionada con el fármaco puede ser, por ejemplo, toxicidad renal o hepática.

Además, ahora se ha descubierto adicionalmente que la inclusión de al menos un sitio de unión para un microARN (miR) expresado en células inmunes convencionales o en cualquier célula que exprese TLR7 y/o TLR8 y secrete quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos, como células de bazo, por ejemplo, células mieloides esplénicas, y/o células endoteliales), como un sitio de unión de miR-126 y/o de miR-142, en un ARNm reduce o inhibe la activación de células inmunes no deseadas (por ejemplo, la activación de células B, la secreción de citoquinas) en un sujeto al que se administra el ARNm. Se ha descubierto adicionalmente que la inclusión de este al menos uno o más sitios de unión de miR en un ARNm puede reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada (ABC) de un compuesto o composición que comprende lípidos donde se administra el ARNm. Además, la inclusión de esto al menos en los sitios de unión de miR en un ARNm puede reducir o inhibir la proliferación y/o activación de células dendríticas plasmacitoides (pDC) y/o reducir o inhibir la producción de IgM contra el compuesto o composición que comprende lípidos donde el ARNm es administrado por células B, como, por ejemplo, IgM contra componentes de fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolina) del compuesto o composición que comprende lípidos por células B.

En consecuencia, en un aspecto, la descripción proporciona procedimientos para reducir o inhibir la activación de células inmunes no deseadas en un sujeto al que se le administró un ARN, por ejemplo, ARNm, que codifica un polipéptido de interés, comprendiendo los procedimientos administrar al sujeto un ARN, por ejemplo, ARNm, por

ejemplo, un ARN mensajero modificado químicamente (ARNmm), que codifica un polipéptido de interés, que comprende al menos un sitio de unión para un microARN (miR) expresado en células inmunes convencionales o cualquier célula que exprese TLR7 y/o TLR8 y secrete quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos, como células de bazo, por ejemplo, células mieloides esplénicas, y/o células endoteliales), como un sitio de unión de microARN de miR-126 y/o de miR-142, de modo tal que la activación de células inmunes no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto. En otro aspecto, la descripción proporciona procedimientos para reducir o inhibir la producción de citoquinas no deseadas en un sujeto al que se le administró un ARN, por ejemplo, ARNm, que codifica un polipéptido de interés, comprendiendo los procedimientos administrar al sujeto un ARN, por ejemplo, ARNm, por ejemplo, un ARN mensajero modificado químicamente (ARNmm), que codifica un polipéptido de interés, que comprende al menos un sitio de unión para un microARN (miR) expresado en células inmunes convencionales o cualquier célula que exprese TLR7 y/o TLR8 y secrete quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos, como células de bazo, por ejemplo, células mieloides esplénicas, y/o células endoteliales), como un sitio de unión de microARN de miR-126 y/o de miR-142, de modo tal que la producción de citoquinas no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto. El ARN puede ser un ARNm, tal como un ARNm modificado químicamente (denominado en esta invención como ARNmm) que comprende una o más nucleobases modificadas. El ARNmm puede modificarse completamente (es decir, todos los nucleótidos o nucleobases de un tipo particular se modifican dentro del ARNmm), pueden modificarse parcialmente (es decir, una porción de nucleótidos o nucleobases de un tipo particular se modifican dentro del ARNm o pueden ser un ARNm quimérico que contiene tramos de nucleobases modificadas y no modificadas.

En una realización, la reducción o inhibición de la activación de las células inmunes no deseadas y/o la producción de citoquinas se determina en comparación con la administración de un ARN de control, por ejemplo, ARNm, por ejemplo, ARNmm, que carece del al menos un sitio de unión para un microARN (miR) expresado en células inmunes, como un miR-126 y/o un sitio de unión de microARN de miR-142. En una realización, la activación de las células inmunes disminuye al menos en un 10 %. En otra realización, la activación de las células inmunes disminuye al menos en un 25 %. En incluso otra realización, la activación de las células inmunes disminuye al menos en un 50 %. En incluso otra realización, la activación de las células inmunes disminuye sin una disminución correspondiente en la expresión de un polipéptido (por ejemplo, proteína terapéutica) de interés codificado por el ARNm.

En una realización, la activación de células inmunes es la activación de linfocitos. En una realización, la activación de linfocitos es la activación de células B. En una realización, la activación de células B se determina mediante la frecuencia de las células B CD19⁺ CD86⁺ CD69⁺. En otra realización, la activación de las células B se determina mediante la secreción de citoquinas, por ejemplo, en el suero o por las células esplénicas totales. En una realización, la activación de las células B se determina por la secreción de interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o el interferón- γ (IFN- γ), por ejemplo, en el suero o por las células esplénicas totales. En una realización, la activación de células B se determina mediante la secreción de IL-6, por ejemplo, en el suero o por las células esplénicas totales. En una realización, la reducción o inhibición de la producción de citoquinas se determina mediante la reducción o inhibición de la producción de interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interferón- γ (IFN- γ). En incluso otra realización, la reducción o inhibición de la producción de citoquinas se determina mediante la reducción o inhibición de la producción de interleucina-6 (IL-6).

En otra realización, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), lo que comprende administrar al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en

el sujeto.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la producción de moléculas de IgM que reconocen el PEG se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

En realizaciones adicionales, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la activación de las células B1a en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de células B1a se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la activación de las células dendríticas plasmacitoides en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

En realizaciones adicionales, la LNP no activa las células B y/o no induce la producción de moléculas de IgM capaces de unirse a la LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores. En algunas realizaciones, las moléculas de IgM reconocen el polietilenglicol (PEG).

En algunas realizaciones, la reducción o inhibición de la depuración sanguínea acelerada se determina en comparación con la administración de control de un ARNm modificado químicamente, que carece del al menos un sitio de unión de microARN encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP). En realizaciones adicionales, la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe sin una reducción o inhibición correspondiente en la expresión del polipéptido de interés codificado por el ARNm modificado químicamente.

En algunas realizaciones, el intervalo entre dos dosis consecutivas es de menos de 2 semanas. En otras realizaciones, el intervalo entre dos dosis consecutivas es de menos de 1 semana.

En una realización, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende una 5' UTR, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica un polipéptido de interés, una 3' UTR que comprende el al menos un sitio de unión para un microARN (miR) expresado en células inmunes, tal como un miR-126 (por ejemplo, miR-126-3p) o miR-142 (por ejemplo, miR-142-3p) un sitio de unión de microARN, y una 3' región de cola de nucleósidos enlazados. En una realización, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión para el microARN expresado en células inmunes (por ejemplo, un sitio de unión de miR-142-3p y/o un sitio de unión de miR-126-3p) se ubica dentro de la 3' UTR, de 1 a 100 nucleótidos después del codón de parada. En otra realización, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión para el microARN (miR) expresado en células inmunes, de modo tal que un sitio de unión de microARN miR-126 y/o miR-142 se ubica dentro de la 3' UTR, de 30 a 50 nucleótidos después del codón de parada. En otra realización, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión para el microARN expresado en células inmunes (por ejemplo, un sitio de unión de miR-142-3p y/o un sitio de unión de miR-126-3p) se ubica en cualquier parte en la 3'

UTR (por ejemplo, después de los primeros 100 nucleótidos después de un codón de parada). En otra realización, el ARNm, por ejemplo, el ARNmm, comprende una 5' UTR y una 3' UTR que son heterólogas al marco de lectura abierto.

- 5 En varias realizaciones, el ARNm, por ejemplo, el ARNmm comprende de 1 a 4, uno, dos, tres o cuatro sitios de unión de miR para microARN expresados en células inmunes, donde al menos uno de los sitios de unión de miR es un sitio de unión de miR-126. En una realización, el ARNm, por ejemplo, el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión de microARN, para microARN expresados en células inmunes, donde al menos uno de los sitios de unión de microARN es un sitio de unión de miR-126. En una realización, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende sitio de unión de miR-126 y un segundo sitio de unión de microARN para un miR seleccionado de entre el grupo que
10 consiste en miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146-3p, miR-146-5p, miR-155, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27. En otra realización, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende un sitio de unión de miR-126 (por ejemplo, miR-126-3p) y un sitio de unión de miR-142 (por ejemplo, miR-142-3p). En una realización, el ARNm, por ejemplo, el ARNmm comprende al menos tres sitios de unión de microARN, para microARN expresados en células inmunes, donde al menos uno de los sitios de unión de microARN es un sitio de unión de miR-126. En una realización, el
15 ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende un sitio de unión de miR-126, un sitio de unión de miR-142 (por ejemplo, miR-142-3p) y un tercer sitio de unión de microARN para un miR seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-146-3p, miR-146-5p, miR-155, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27. En otra realización, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende un sitio de unión de miR-126, un sitio de unión de miR-142 (por ejemplo, miR-142-3p)
20 y un sitio de unión de miR-155.

En otro ejemplo, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende al menos dos sitios de unión de microARN para los microARN expresados en células inmunes. En otra realización, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende un sitio de unión de miR-126, un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-142-5p y un sitio de unión de miR-
25 155. Un miR al que se hace referencia en esta invención con un número puede referirse a cualquiera de los dos microARN maduros que se originan en brazos opuestos del mismo pre-miARN (por ejemplo, el microARN 3p o 5p). Todos los miR a los que se hace referencia con un número en esta invención pretenden incluir tanto los brazos/secuencias 3p como los 5p.

- 30 En una realización, el sitio de unión de miR-126-3p comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 26.

En una realización, el sitio de unión de miR-142-3p comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3.

- 35 En una realización, el sitio de unión de miR-155 comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 35.

En algunas realizaciones, el sitio de unión de microARN se une a un microARN expresado en células mieloides. En otras realizaciones, el sitio de unión de microARN se une a un microARN expresado en células dendríticas plasmacitoides. En incluso otras realizaciones, el sitio de unión de microARN se une a un microARN expresado en macrófagos.

- 40 En otra realización, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, se modifica por completo para una modificación química particular. Los tipos de modificación química adecuada se describen adicionalmente en esta invención. En otras realizaciones, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende uno o más nucleótidos o nucleobases modificados, como se describen adicionalmente en esta invención.

45 En algunas realizaciones, el ARNm comprende pseudouridina (ψ). En algunas realizaciones, el ARNm comprende pseudouridina (ψ) y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$) y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 2-tiouridina (s^2U). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 2-tiouridina y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 5-metoxi-uridina (mo^5U). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 5-metoxi-uridina (mo^5U) y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende 2'-O-metil uridina. En algunas realizaciones, el ARNm comprende 2'-O-metil uridina y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNm comprende N6-metil-adenosina (m^6A). En algunas realizaciones, el ARNm comprende N6-metil-adenosina (m^6A) y 5-metil-citidina (m^5C).
50

55 En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es pseudouridina (ψ), N1-metilpseudouridina ($m^1\psi$), 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitiosina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina
60 o 2'-O-metil uridina. En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción incluye una combinación de una o más de

las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 5-metoxi-uridina (mo^5U), 5-metil-citidina (m^5C), pseudouridina (ψ), α -tio-guanosina o α -tio-adenosina. En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción incluye una combinación de una o más de las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

En una realización, el ARNm, por ejemplo, ARNm, se administra de manera intravenosa, encapsulado en una nanopartícula lipídica. En una realización, la nanopartícula lipídica es un liposoma. En una realización, la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico y/o ionizable. En una realización, el lípido catiónico y/o ionizable es DLin-KC2-DMA o DLin-MC3-DMA.

En una realización, el ARNm, por ejemplo, ARNm, codifica un polipéptido de interés. En varias realizaciones, el polipéptido de interés es una proteína terapéutica, una citoquina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o una proteína de fusión. Los ejemplos adicionales de polipéptidos de interés se describen en esta invención.

En una realización, el ARNm, por ejemplo, ARNm, se administra mediante una infusión una vez a la semana. En otra realización, la infusión se administra por vía intravenosa. En otra realización, el ARNm, por ejemplo, ARNm, se administra mediante una infusión una vez a la semana durante al menos 4 semanas. En otra realización, el ARNm, por ejemplo, ARNm, se administra por vía intratumoral. Los regímenes de dosis adecuados se describen adicionalmente en esta invención.

En otra realización, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir una activación de células inmunes no deseadas (por ejemplo, la activación de células B) y/o la producción de citoquinas no deseadas en un sujeto al que se le administra un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de ARNm, por ejemplo, ARNm modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNm, por ejemplo, ARNm, comprende al menos un sitio de unión para un microARN (miR) expresado en células inmunes, tal como un sitio de unión de microARN de miR-126 y/o al menos un sitio de unión de microARN de miR-142,

y donde el ARNm, por ejemplo, ARNm, comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis del ARNm, por ejemplo, ARNm, encapsulado en una LNP, de modo tal que la activación de células inmunes no deseadas y/o la producción de citoquinas no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la activación de células inmunes no deseadas (por ejemplo, la activación de células B) y/o la producción de citoquinas no deseadas en el sujeto después de la administración repetida de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés a un sujeto, que comprende

- (i) administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de ARNm, por ejemplo, ARNm modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, encapsulado en una LNP, donde el ARNm, por ejemplo, ARNm, comprende al menos un sitio de unión para un microARN (miR) expresado en células inmunes, tal como un sitio de unión de microARN de miR-126 y/o un sitio de unión de microARN de miR-142, y donde el ARNm, por ejemplo, ARNm, comprende una o más nucleobases modificadas;
- (ii) detectar un nivel de activación de células inmunes en una muestra de un sujeto; y
- (iii) administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis del ARNm, por ejemplo, ARNm, encapsulado en una LNP cuando el nivel de activación de células inmunes en la muestra se reduce, de modo tal que una activación de células inmunes no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto.

En incluso otro aspecto más, la descripción proporciona un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNm comprende al menos dos sitios de unión de microARN (miR) diferentes, donde el microARN se expresa en una célula inmune del linaje hematopoyético o una célula que expresa TLR7 y/o TLR8 y secreta quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias, y donde el ARNm comprende una o más nucleobases modificadas. En algunos aspectos, la célula inmune del linaje hematopoyético es una célula linfóide, como una célula T, una célula B o una célula NK. En algunos aspectos, la célula inmune del linaje hematopoyético es una célula mieloide, como monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, células dendríticas, megacariocitos o plaquetas. En algunos aspectos, la célula inmune del linaje hematopoyético es una célula progenitora hematopoyética. En algunos aspectos, la célula que expresa TLR7 y/o TLR8 y secreta quimiocinas y/o

citoquinas proinflamatorias es una célula endotelial.

En algunos aspectos de la descripción, el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión de microARN diferentes, en los que el microARN es abundante en el mismo o diferente tipo de célula de interés. En algunos aspectos, el
5 microARN es abundante en múltiples tipos de células de interés.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un ARNmm que comprende al menos un primer sitio de unión a microARN de un microARN abundante en una célula inmune de linaje hematopoyético y al menos un segundo sitio de unión a microARN de un microARN abundante en células endoteliales, donde el ARNmm comprende una o más
10 nucleobases modificadas.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un ARNmm que comprende al menos un primer sitio de unión a microARN de un microARN abundante en células B y al menos un segundo sitio de unión de microARN de un microARN abundante en células endoteliales, donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas.
15

En algunos aspectos, la descripción proporciona un ARNmm que comprende al menos un primer sitio de unión a microARN de un microARN abundante en células dendríticas plasmacitoides y al menos un segundo sitio de unión de microARN de un microARN abundante en células endoteliales, donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas.
20

En algunos aspectos de la descripción, el ARNmm comprende múltiples copias (2, 3, 4 copias) de un primer sitio de unión de microARN y al menos una copia de un segundo sitio de unión de microARN. En algunos aspectos, el ARNmm comprende 2 copias de un primer sitio de unión de microARN y 1 copia de un segundo sitio de unión de microARN.
25

En algunos aspectos, la descripción proporciona un ARNmm que comprende un primero y un segundo sitio de unión de microARN del mismo microARN, tales como, por ejemplo, sitios de unión de microARN de los brazos 3p y 5p del mismo microARN.

Algunos aspectos de la descripción proporcionan un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión de microARN (miR) diferentes, donde el microARN se selecciona de entre el grupo que consiste en miR-126, miR-142, miR-144, miR-146, miR-150, miR-155, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27 y miR-26a, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas. En algunos aspectos, el microARN se selecciona de entre el grupo que consiste en
30 miR-126-3p, miR-142-3p, miR-142-5p y miR-155. En algunos aspectos, el al menos un sitio de unión de microARN es un sitio de unión de miR-126, tal como se establece en la SEQ ID NO: 26. En algunos aspectos, el al menos un sitio de unión de microARN es un sitio de unión de miR-142, tal como se establece en la SEQ ID NO: 3.

En incluso otros aspectos, la descripción proporciona un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión de microARN (miR) diferentes, donde un sitio de unión de microARN es un sitio de unión de miR-126 y el segundo sitio de unión de microARN es para un microARN seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146-3p, miR-146-5p, miR-155, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas.
40

En otros aspectos, la descripción proporciona un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm es un sitio de unión de miR-126-3p y un sitio de unión de miR-142-3p, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas. En algunos aspectos, el ARNmm comprende en la 5' o 3' UTR' un único sitio de unión de miR-126-3p como se establece en la SEQ ID NO: 26 y un único sitio de unión de miR-142-3p como se establece en la SEQ ID NO: 3. En algunos aspectos, el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de 142-5p, tal como se establece en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 51, respectivamente.
45

En incluso otros aspectos, la descripción proporciona un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos tres sitios de unión de microARN diferentes, donde al menos uno de los sitios de unión de microARN es un sitio de unión de miR-126, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas.
50

En algunos aspectos, la descripción proporciona un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos tres sitios de unión de microARN diferentes, donde al
60

menos uno de los sitios de unión de microARN es un sitio de unión de miR-142, y donde el ARNm comprende una o más nucleobases modificadas.

En incluso otros aspectos, la descripción proporciona un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNm comprende al menos un sitio de unión de miR-126-3p, al menos un miR-142-3p, y un tercer sitio de unión de microARN para un microARN seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-146-3p, miR-146-5p, miR-155, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27, y donde el ARNm comprende una o más nucleobases modificadas. En algunos aspectos, el ARNm comprende al menos un sitio de unión de miR-126-3p, al menos un sitio de unión de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de miR-155 (por ejemplo, un sitio de unión 155-5p como se establece en el Listado de secuencias). En algunos aspectos, el ARNm comprende al menos un sitio de unión de miR-126-3p, al menos un sitio de unión de miR-142-3p, al menos un sitio de unión de miR-142-5p y al menos un sitio de unión de miR-155.

En cualquiera de los aspectos anteriores y relacionados, la descripción proporciona un ARNm que comprende una 5' UTR, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés, una 3' UTR y una región de cola 3' de nucleósidos enlazados, donde los sitios de unión de microARN están ubicados en la 5' UTR, la 3' UTR, o tanto en la 5' UTR como en la 3' UTR del ARNm. En algunos aspectos, los sitios de unión de microARN se encuentran en la 3' UTR del ARNm. En algunos aspectos, los sitios de unión de microARN se encuentran en la 5' UTR del ARNm. En algunos aspectos, los sitios de unión de microARN se encuentran tanto en la 5' UTR como en la 3' UTR del ARNm. En algunos aspectos, el al menos un sitio de unión de microARN está ubicado en la 3' UTR inmediatamente adyacente al codón de parada de la región codificante del ARNm. En algunos aspectos, el al menos un sitio de unión de microARN está ubicado en las bases 70-80 de la 3' UTR hacia abajo del codón de parada de la región codificante del ARNm. En algunos aspectos, el al menos un sitio de unión de microARN está ubicado en la 5' UTR inmediatamente antes del al codón de inicio de la región codificante del ARNm. En algunos aspectos, el al menos un sitio de unión de microARN está ubicado en los nucleótidos 15-20 de la 5' UTR antes del al codón de inicio de la región codificante del ARNm. En algunos aspectos, el al menos un sitio de unión de microARN está ubicado en los nucleótidos 70-80 de la 5' UTR antes del al codón de inicio de la región codificante del ARNm.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un ARNm que comprende múltiples copias de los mismos o diferentes sitios de unión de microARN colocados inmediatamente adyacentes entre sí o con un espaciador de menos de 5, 5-10, 10-15 o 15-20 nucleótidos, en la 5' UTR, la 3' UTR o ambas. En algunos aspectos, el ARNm comprende múltiples copias del mismo sitio de unión de microARN ubicado en la 3' UTR, donde el primer sitio de unión de microARN se coloca inmediatamente adyacente al codón de parada y tanto el segundo como el tercer sitio de unión de microARN se colocan 30-40 bases aguas abajo del primer sitio de unión de microARN. En algunos aspectos, el ARNm comprende 2 copias de un primer sitio de unión de microARN y 1 copia de un segundo sitio de unión de microARN ubicado en la 3' UTR, donde la primera copia del primer sitio de unión de microARN se coloca inmediatamente adyacente al codón de parada, el segundo sitio de unión de microARN se coloca 30-40 bases aguas abajo de la primera copia del primer sitio de unión de microARN, y la segunda copia del primer sitio de unión de microARN se coloca 30-40 bases aguas abajo del segundo sitio de unión de microARN.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona un ARNm modificado donde el ARNm está completamente modificado.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona un ARNm que comprende pseudouridina (ψ), pseudouridina (ψ) y 5-metil-citidina (m^5C), 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$) y 5-metil-citidina (m^5C), 2-tiouridina (s^2U), 2-tiouridina y 5-metil-citidina (m^5C), 5-metoxi-uridina (mo^5U), 5-metoxi-uridina (mo^5U) y 5-metil-citidina (m^5C), 2'-O-metil uridina, 2'-O-metil uridina y 5-metil-citidina (m^5C), N6-metil-adenosina (m^6A) o N6-metil-adenosina (m^6A) y 5-metil-citidina (m^5C).

En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNm descrito en esta invención comprende pseudouridina (ψ), N1-metilpseudouridina ($m^1\psi$), 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitiosina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina o 2'-O-metil uridina, o combinaciones de los mismos.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona un ARNm que comprende 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 5-metoxi-uridina (mo^5U), 5-metil-citidina (m^5C), pseudouridina (ψ), α -tio-guanosina, o α -tio-adenosina, o combinaciones de los mismos.

60

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona un ARNm que codifica un polipéptido de interés, donde el polipéptido de interés es una proteína terapéutica, una citoquina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o una proteína de fusión.

5 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona una nanopartícula lipídica que comprende un ARNm modificado como se describe en esta invención. En algunos aspectos, la nanopartícula lipídica comprende un liposoma. En algunos aspectos, la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico y/o ionizable. En algunos aspectos, el lípido catiónico o ionizable es DLin-KC2-DMA o DLin-MC3-DMA.

10 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende el ARNm o la nanopartícula lipídica como se describe en esta invención, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona un ARNm, una nanopartícula lipídica o una composición farmacéutica como se describe en esta invención, para usar en la reducción o inhibición de una respuesta de anticuerpo antidrogas o la inhibición de la toxicidad relacionada con el fármaco en un sujeto que lo necesita.

20 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona un ARNm, una nanopartícula lipídica o una composición farmacéutica, como se describe en esta invención, para su uso en la reducción o inhibición de la activación de células inmunes no deseadas o la reducción o inhibición de la producción de citoquinas no deseadas en un sujeto que lo necesita.

25 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona un ARNm, una nanopartícula lipídica o una composición farmacéutica como se describe en esta invención para su uso en la reducción o inhibición de la depuración sanguínea acelerada en un sujeto que lo necesita.

30 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la descripción proporciona un ARNm, una nanopartícula lipídica o una composición farmacéutica como se describe en esta invención para su uso en la reducción o inhibición de la producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) en un sujeto que lo necesita.

Los detalles de varias realizaciones de la descripción se establecen en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la descripción resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

35 Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 es un gráfico de barras que muestra los niveles de proteína de eritropoyetina humana (hEPO) en macacos cinomólogos tratados con ARNm que codifica hEPO (pero que carece de cualquier sitio de unión de miR) en las dosis indicadas, o con la proteína de hEPO recombinante como control positivo, seis horas después de la infusión en los días indicados de tratamiento.

La FIGURA 2 es un diagrama esquemático de constructos de ARNm sin y con uno o más sitios de miR insertado(s) en la 3' UTR.

45 La FIGURA 3 es un gráfico que compara los niveles de anticuerpos anti-hEPO en macacos cinomólogos tratados con PBS o con 0,2 mg/kg de un ARNm que codifica hEPO, que carece o contiene un sitio de unión de miR-142-3p en la 3' UTR del constructo. Se indican los animales positivos para una respuesta de anticuerpo antidrogas (ADA).

Las FIGURAS 4A-C son gráficos que muestran los niveles de expresión de proteínas (Figura 4A), frecuencia de células B (Figura 4B) y frecuencia de células B activadas (Figura 4C) en ratones tratados con 0,05 mg/kg de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

50 Las FIGURAS 5A-B son gráficos que muestran los niveles de expresión de proteínas para ratones tratados con una única dosis de 0,2 mg/kg (Figura 5A) o 1 mg/kg (Figura 5B) de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

55 Las FIGURAS 6A-B son gráficos que muestran los niveles de expresión de proteínas para ratones tratados con dos dosis de 0,2 mg/kg (Figura 6A) o 1 mg/kg (Figura 6B) de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

60 La FIGURA 7 son gráficos que muestran la frecuencia de las células B de ratones tratados con una sola dosis

indicada (0,2 mg/kg o 1 mg/kg) de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

La FIGURA 8 son gráficos que muestran la frecuencia de las células B activadas de ratones tratados con una sola dosis indicada (0,2 mg/kg o 1 mg/kg) de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

La FIGURA 9 son gráficos que muestran la frecuencia de las células B de ratones tratados con dos dosis de la dosificación indicada (0,2 mg/kg o 1 mg/kg) de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

La FIGURA 10 son gráficos que muestran la frecuencia de las células B activadas de ratones tratados con dos dosis de la dosificación indicada (0,2 mg/kg o 1 mg/kg) de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

Las FIGURAS 11A-B son gráficos que muestran los niveles de IL-6 en ratones tratados con una única dosis de 0,2 mg/kg (Figura 11A) o 1 mg/kg (Figura 11B) de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

Las FIGURAS 12A-B son gráficos que muestran los niveles de IL-6 en ratones tratados con dos dosis de 0,2 mg/kg (Figura 12A) o 1 mg/kg (Figura 12B) de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

Las FIGURAS 13A-C son gráficos que muestran los niveles de IL-6 (Figura 13A), los niveles de TNF- α (Figura 13B) y los niveles de IFN- γ (Figura 13C) en ratones tratados con dos dosis de 0,2 mg/kg de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

Las FIGURAS 14A-C son gráficos que muestran los niveles de IL-6 (Figura 14A), los niveles de TNF- α (Figura 14B) y los niveles de IFN- γ (Figura 14C) en ratones tratados con dos dosis de 1 mg/kg de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

Las FIGURAS 15A-B son gráficos que muestran los niveles de expresión de Luciferasa (Luc), según se midieron mediante la luminiscencia corporal total en ratones tratados durante 1 semana (Figura 15A) o dos semanas (Figura 15B) con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica hEPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

La FIGURA 16 son gráficos que muestran la frecuencia total de las células B de ratones tratados con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica Luc que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

La FIGURA 17 son gráficos que muestran la frecuencia de las células B activadas de ratones tratados con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica Luc que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

Las FIGURAS 18A-C son gráficos que muestran los niveles de IL-6 secretada (Figura 18A), los niveles de TNF- α (Figura 18B) y los niveles de IFN- γ (Figura 18C) en ratones tratados con de 0,2 mg/kg de ARNm que codifica Luc, que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

Las FIGURAS 19A-B son gráficos que muestran los niveles de expresión de EPO en el suero de ratones tratados durante 1 semana (Figura 19A) o dos semanas (Figura 19B) con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica EPO y que carece o contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-142-5p, un sitio de unión de miR-155-5p o múltiples copias o combinaciones de los mismos.

La FIGURA 20 son gráficos que muestran la frecuencia total de las células B en ratones tratados durante 1 semana con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica EPO y que carece o contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-142-5p, un sitio de unión de miR-155-5p o múltiples copias o combinaciones de los mismos.

La FIGURA 21 son gráficos que muestran la frecuencia de las células B activadas en ratones tratados durante 1 semana con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica EPO y que carece o contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-142-5p, un sitio de unión de miR-155-5p o múltiples copias o combinaciones de los mismos.

La FIGURA 22 son gráficos que muestran la frecuencia total de las células B en ratones tratados durante dos semanas con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica EPO y que carece o contiene un sitio de unión de miR-142-3p,

un sitio de unión de miR-142-5p, un sitio de unión de miR-155-5p o múltiples copias o combinaciones de los mismos.

La FIGURA 23 son gráficos que muestran la frecuencia de las células B activadas en ratones tratados durante 2 semanas con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica EPO y que carece o contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-142-5p, un sitio de unión de miR-155-5p o múltiples copias o combinaciones de los mismos.

Las FIGURAS 24A-C son gráficos que muestran los niveles de IL-6 secretada (Figura 24A), los niveles de TNF- α (Figura 24B) y los niveles de IFN- γ (Figura 24C) en ratones tratados durante 2 semanas con de 0,2 mg/kg de ARNm que codifica EPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-142-5p, un sitio de unión de miR-155-5p o múltiples copias o combinaciones de los mismos.

Las FIGURAS 25A-B son gráficos que muestran el porcentaje de células B CD27⁺ CD19⁺ en las células B CD19⁺ esplénicas (Figura 25A) y el nivel de expresión de CD27 en las células B CD27⁺ CD19⁺ (Figura 25B) en ratones tratados con ARNm que codifica EPO y que carece o contiene un sitio de unión de miR-142, un sitio de unión de miR-126 o sitios de unión de miR-142 y miR-126.

Las FIGURAS 26A-B son gráficos que muestran la frecuencia total de las células CD11c⁺ en las células esplénicas (Figura 26A) y el porcentaje de células dendríticas activadas (células CD11c⁺ CD70⁺ CD86⁺) (Figura 26B) en ratones tratados con ARNm que codifica EPO y que carece o contiene un sitio de unión de miR-142, un sitio de unión de miR-126 o sitios de unión de miR-142 y miR-126.

La FIGURA 27 es un gráfico que muestra el nivel de proliferación de células B vírgenes en presencia de células dendríticas plasmacitoides (pDC) aisladas de ratones tratados con ARNm que codifica EPO y que carece o contiene un sitio de unión de miR-142, un sitio de unión de miR-126 o sitios de unión de miR-142 y miR-126.

Las FIGURAS 28A-C son gráficos que muestran el nivel de anticuerpos de IgM anti-PEG en suero en ratones tratados con dos dosis (Figura 28A), tres dosis (Figura 28B) o cuatro dosis (Figura 28C) de ARNm que codifica EPO y que carece o contiene un sitio de unión de miR-142, un sitio de unión de miR-126 o sitios de unión de miR-142 y miR-126.

La FIGURA 29 es un gráfico que muestra niveles de expresión de EPO en el suero de ratones tratados durante 6 semanas con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica EPO y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

La FIGURA 30 es un gráfico que muestra niveles de expresión de Luciferasa (Luc) en suero de ratones tratados durante 5 semanas con 0,2 mg/kg de ARNm que codifica Luc y que carece o que contiene un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión de miR-142-3p y miR-126, en la 3' UTR del constructo.

Las FIGURAS 31A-D son gráficos que muestran el nivel de expresión de eGFP en hepatocitos primarios transfectados con una mezcla equimolar de constructos de ARNm de Luc y eGFP en LNP, donde los constructos de ARNm contenían ya sea ningún sitio miR reconocible (control), sitios de unión de miR-122 1X o 3X o un supuesto ARNm con una secuencia similar a las secuencias de eGFP y Luc (control), en dosis de 7,5 ng (Fig. 31A), 15 ng (Fig. 31B), 50 ng (Fig. 31C) o 100 ng (Fig. 31D).

Las FIGURAS 32A-D son gráficos que muestran el porcentaje de confluencia de fase (como una medida de toxicidad mediada por caspasa) de hepatocitos primarios transfectados con constructos de ARNm de caspasa que, ya sea, no contienen sitios miR reconocibles (control), que contienen sitios de unión de miR-122 1X o 3X o contienen un supuesto ARNm con una secuencia similar a la caspasa (control) sin codón de inicio, en dosis de 7,5 ng (Fig. 32A), 15 ng (Fig. 32B), 50 ng (Fig. 32C) o 100 ng (Fig. 32D).

La FIGURA 33 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de hEPO en monos cinomólogos a los que se les administraron constructos de ARNm que contenían ya sea ningún sitio miR reconocible (control o sitios de unión de miR-142-3p 1X o 3X).

La FIGURA 34 es un gráfico de barras que muestra el nivel de expresión de eGFP en células RAW264.7 transfectadas con constructos de ARNm que no contienen sitios miR reconocibles (control), un sitio de unión de miR-142-3p en la 3' UTR (1X o 3X), un sitio de unión de miR-142-3p en la 5' UTR (insertado en la P1, P2 o P3) o un sitio de unión de miR-142-3p tanto en la 3' UTR como en la 5' UTR.

La FIGURA 35 es un gráfico de barras que muestra el nivel de expresión de hEPO en células de hepatocitos primarios transfectadas con constructos de ARNm que no contienen sitios miR reconocibles (control), un sitio de unión de miR-122 en la 3' UTR (1X o 3X), un sitio de unión de miR-122 en la 5' UTR (insertado en la P1, P2 o P3) o un sitio de unión de miR-122 tanto en la 3' UTR como en la 5' UTR.

55 Descripción detallada

Un desafío asociado con el uso clínico del tratamiento basado en proteínas es el desarrollo de una respuesta de anticuerpos antidrogas (ADA) no deseada, donde el sistema inmunológico del paciente genera anticuerpos contra el agente terapéutico (para reseñas, véase, por ejemplo, Subramanyam, M. (2006) J. Immunotoxicol. 3:151-156; De Groot, A.S. y Scott, D.W. (2007) Trends Immunol. 28:482-490; Nechansky, A. y Kircheis, R. (2010) Expert Opin.

Drug. Discov. 5:1067-1079). Se ha informado sobre el desarrollo de respuestas de ADA tanto para productos biológicos de anticuerpos recombinantes como para productos biológicos no de anticuerpos (véase, por ejemplo, Brickelmaier, M. y col. (1999) J. Immunol. Methods 227:121-135; Ruf, P. y col. (2010) Br. J. Clin. Pharmacol. 69:617-625; Lundkvist, M. y col. (2013) Mult. Scler. 19:757-764). La respuesta de ADA puede interferir o neutralizar el efecto del agente terapéutico, lo que afecta la farmacocinética y la eficacia del fármaco. Los anticuerpos neutralizantes (NAB) son generalmente más preocupantes que los anticuerpos de unión (BAB) que no son neutralizantes, pero ambos pueden tener consecuencias clínicas.

Además, las reacciones alérgicas, la activación del complemento y otros eventos adversos a menudo se asocian con el desarrollo de ADA, lo que afecta la seguridad de los medicamentos. Por consiguiente, el ADA es un factor significativo en la capacidad de usar productos biológicos para el tratamiento a largo plazo.

El uso de ARNm modificado, *por ejemplo*, los ARNm (ARNmm), como agentes terapéuticos ofrece una alternativa emocionante al tratamiento basado en proteínas. El tratamiento de ARNm ofrece varias ventajas sobre la técnica de tratamiento a base de proteínas, incluyendo, *por ejemplo*, la fidelidad de las características de la proteína codificada (porque la proteína es producida por el propio aparato de traducción del cuerpo), el perfil farmacocinético sensible y sintonizable (la expresión de la proteína puede ser transitoria, lo cual puede ser favorable para algunas estrategias terapéuticas para controlar mejor la farmacocinética y la dosificación), un excelente perfil de seguridad (como se revela en varios ensayos clínicos de vacunas), la funcionalidad en el citoplasma sin la necesidad de viajar al núcleo, lo que resulta en la traducción de proteínas casi inmediatamente después de la administración de ARNm, elimina cualquier riesgo de integración genómica, así como también la facilidad de fabricación, *por ejemplo*, los ARNm se producen fácilmente mediante diversos procedimientos genéricos *in vitro*, *por ejemplo*, reacciones de transcripción *in vitro*, sin la necesidad de organismos vivos. Además, el ARNm puede diseñarse para tener propiedades autoadyuvantes, *por ejemplo*, en aplicaciones de vacunas, o para evadir la activación inmunogénica, *por ejemplo*, en aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, ahora se ha descubierto que la administración de ARNm que codifica una proteína de interés, particularmente en los casos en que la administración de ARNm conduce directa o indirectamente a la expresión de la proteína codificada en las células inmunes, *por ejemplo*, el bazo, también puede conducir al desarrollo de una respuesta de anticuerpos antidrogas a la proteína codificada por el ARNm. Sin embargo, se ha demostrado sorprendentemente que la incorporación de al menos un sitio de unión de microARN (miARN) para un miR expresado en células inmunes (*por ejemplo*, en células inmunes de órganos linfoides periféricos y/o esplenocitos) en el ARNm (ARNm) que codifica la proteína de interés puede reducir la respuesta de anticuerpos antidrogas a la proteína de interés cuando el ARNm se administra al sujeto.

En consecuencia, la descripción proporciona procedimientos para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpo antidrogas (ADA) a una proteína de interés por medio de la regulación postranscripcional, en particular en el tejido del sistema inmune, tal como el bazo. La descripción también proporciona procedimientos para reducir la toxicidad relacionada con el fármaco en un sujeto mediante la incorporación de al menos un sitio de unión de microARN (miARN) para un miR expresado en células inmunes en un ARNm (*por ejemplo*, ARNmm) que codifica una proteína de interés. Los sitios de unión de microARN preferidos que se usan en los procedimientos de la descripción son aquellos que unen los miR expresados abundante o preferentemente en células inmunes (*por ejemplo*, en células inmunes de órganos linfoides periféricos y/o esplenocitos). Un sitio de unión de microARN particularmente preferido es para miR-142-3p. Otro sitio de unión de microARN particularmente preferido es para miR-126.

Como se describe en el Ejemplo 1, un estudio *in vivo* donde se administró, a macacos cinomólogos, un constructo de ARNmm que codifica la eritropoyetina humana (hEPO) condujo a las observaciones de que los niveles de hEPO disminuyeron con el tiempo en los animales. Además, también se observó reticulocitopenia y hematopoyesis reducida de la médula ósea. Estos resultados sugirieron la posibilidad de que se estuvieran generando anticuerpos antidrogas en los animales, lo que se confirmó mediante un análisis ELISA de suero. Aunque de ninguna manera está sujeto a la teoría, la experiencia previa con el sistema de administración de ARNm usado en el estudio (usado nanopartículas lipídicas, LNP) demostró que el ARNm se distribuía principalmente al hígado pero también al bazo y, *por consiguiente*, esta distribución podría conducir a inmunidad aumentada a la proteína que está siendo codificada por el ARNm. Una vez más, aunque no esté limitado por la teoría o el mecanismo, es posible que la expresión de la proteína codificada fabricada en el bazo (administrada en función de la distribución de LNP al bazo por suministro directo a través del flujo sanguíneo o indirectamente a través de células profesionales presentadoras de antígeno) pueda conducir a la producción de anticuerpos dependientes de células T mediante la presentación de epítopos adecuados (*es decir*, de la proteína de interés) a las células T.

Para abordar esto, como se describe en el Ejemplo 2, se diseñaron constructos de ARNm adicionales que incluían al menos un sitio de unión de microARN (miARN) para un miR expresado en células inmunes (*por ejemplo*, al menos un sitio de unión para miR-142-3p). La administración del constructo de ARNm que contiene miR *in vivo* condujo a

una reducción significativa en el desarrollo de respuestas de ADA en los animales receptores.

Otro desafío asociado con el uso clínico del tratamiento basado en proteínas en la técnica es el desarrollo de la activación de células inmunes no deseadas (por ejemplo, la activación de células B) contra la proteína terapéutica, lo que conduce a efectos secundarios mediados por el sistema inmunológico. Sin embargo, ahora se ha descubierto que la administración de ARNm que codifica una proteína de interés, particularmente en los casos en que la administración de ARNm, por ejemplo, conduce directa o indirectamente a la expresión de la proteína codificada en las células inmunes, por ejemplo, esplenocitos, también puede conducir al desarrollo de una activación de células inmunes no deseadas (por ejemplo, la activación de células B, incluyendo la producción de citoquinas). Sin embargo, sorprendentemente se ha demostrado que la incorporación de al menos un sitio de unión para un microARN (miARN) que se expresa en el tejido linfático periférico y/o las células endoteliales, en particular, al menos un miR-126 y/o El sitio de unión de miR-142 al ARNm (ARNm) puede reducir o inhibir la activación de células inmunes no deseadas cuando el ARNm se administra al sujeto. En consecuencia, la descripción proporciona composiciones y procedimientos para reducir o inhibir la activación de células inmunes no deseadas cuando se usan agentes terapéuticos basados en ARNm por medio de regulación postranscripcional, en particular, en el tejido del sistema inmune, tal como los órganos linfáticos periféricos o el bazo.

Los experimentos descritos en el Ejemplo 3 demostraron que la incorporación de un sitio de unión de miR-126 o miR-142 (por ejemplo, miR-142-3p), o los dos sitios en combinación, en constructos de ARNm que codifican una proteína de interés, condujo a una frecuencia reducida de células B activadas, así como también a niveles reducidos de producción de citoquinas (IL-6, TNF- α , IFN- γ), en animales a los que se administraron los constructos, en comparación con los animales tratados con constructos que carecían del sitio o los sitios de unión de miR. El efecto del sitio de unión de miR-126 solo fue más potente que el efecto del sitio de unión de miR-142 solo, observando los efectos más fuertes con los dos sitios usados en combinación. La frecuencia de activación de células B y la producción de citoquinas son indicadores tempranos de una respuesta inmune creciente *in vivo*, incluyendo las respuestas de anticuerpos. Por consiguiente, estos resultados indican que la inclusión de un sitio de unión de miR-126 en un constructo de ARNm (solo o en combinación con un sitio de unión de miR-142-3p) puede conducir a una reducción en el desarrollo de respuestas de ADA a la proteína codificada en el animal receptor.

Aunque de ninguna manera está sujeta a la teoría, la inclusión de un sitio de unión de miR-126 en un constructo de ARNm puede conducir a la reducción o inhibición de la activación de células inmunes por uno o más posibles mecanismos, en función del patrón de expresión de miR-126. Se sabe que el microARN-126 se expresa de manera alta y selectiva en las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y regula la maduración, la supervivencia y las funciones efectoras de estas células (Agudo, J. y col. (2014) Nat. Immunol. 15:54-62; Cella, M. y Trinchieri, G. (2014) Nat. Immunol. 15:8-9). Las células dendríticas plasmacitoides representan menos del 0,1 % de las células mononucleares de sangre periférica y del 0,4 al 0,6 % del total de células esplénicas puede diferenciarse en células dendríticas tras la activación, producir interferones y servir como un enlace entre la inmunidad innata y adaptativa, además de jugar un papel en la presentación de antígenos (para reseñas sobre pDC, véase, por ejemplo, Jegalian, A.G. y col. (2009) Adv. Anat. Pathol. 16:392-404; Reizis, B. y col. (2011) Annu. Rev. Immunol. 29:163-183; Tel, J. y col. (2012) Cancer Immunol. Immunotherap. 61:1279-1288). Además, las pDC también están implicadas en la promoción de la activación y diferenciación de las células B y en la estimulación de la producción de citoquinas (véase, por ejemplo, Douag, I. y col. (2009) J. Immunol. 182:1991-2001; Ding, C. y col. (2009) J. Immunol. 183:7140-7149; Gujer, C. y col. (2011) J. Leukoc. Biol. 89:811-821. Por consiguiente, la frecuencia reducida de la activación de células B y la producción reducida de citoquinas observada mediante la inclusión de un sitio de unión de miR-126 en un constructo de ARNm puede resultar, por ejemplo, de la inhibición de la función de presentación de antígeno de las pDC y/o de la incapacidad de las pDC para lanzar una respuesta efectiva contra los ácidos nucleicos extraños y/o de la inhibición de la maduración y supervivencia de las pDC, lo que conduce a una promoción reducida de la activación de las células B y una producción de citoquinas reducida, siendo el resultado general de estos efectos es una respuesta de ADA reducida *in vivo* contra la proteína codificada por el constructo de ARNm.

Además, se sabe que el miR-126 se expresa en células endoteliales (véase, por ejemplo, Fish, J.E. y col. (2008) Dev. Cell. 15:272-284; Wang, S. y col. (2008) Dev. Cell. 15:261-271). En consecuencia, el efecto de la inclusión de un sitio de unión de miR-126 en un constructo de ARNm puede estar relacionado con la abundancia de miR-126 en las células endoteliales. Por consiguiente, la inclusión de un sitio de unión de miR-126 en un constructo de ARNm puede conducir a una expresión reducida de la proteína codificada en las células endoteliales *in vivo*, lo que resulta en una presentación de antígeno reducida por las células endoteliales, lo cual conduce a una reducción concomitante en la frecuencia de activación de las células B y una producción de citoquinas reducida, resultando en respuestas de ADA reducidas contra la proteína codificada *in vivo*.

Como se demostró en el Ejemplo 6, la inclusión de un sitio de unión de miR-142 y/o de miR-126 en un constructo de

- ARNm conduce a una frecuencia total reducida de células dendríticas CD11c⁺, así como también una frecuencia reducida de células dendríticas activadas (CD11c⁺ CD70⁺ CD86⁺) dentro de la población de células esplénicas CD11c⁺. En contraste, la inclusión de un sitio de unión de miR-142 y/o de miR-126 en constructos de ARNm no afectó la frecuencia de las células B CD27⁺ CD19⁺ en las células B CD19⁺ esplénicas, ni tampoco afectó el nivel de expresión de CD27 en la población de células B CD27⁺ CD19⁺. Además, la proliferación de células B vírgenes se redujo cuando se incubó con pDC aisladas de ratones tratados con los sitios de unión de miR que contenían constructos, en comparación con el tratamiento con un constructo de ARNm que carecía de sitios de unión de miR. Por consiguiente, estos datos experimentales respaldan el mecanismo propuesto de que la inhibición de la activación de las células B y la inhibición de la producción de citoquinas en ratones tratados con constructos de ARNm modificado que incluyen un miR o una combinación de los mismos resulta de una frecuencia disminuida y/o una activación de pDC, lo que conduce así a una disminución de la estimulación de las células B, probablemente como resultado de una disminución de las interacciones de CD70-CD27 o una reducción de la secreción de citoquinas de las células dendríticas.
- 15 Existe un desafío separado con el uso de compuestos y composiciones que comprenden lípidos, tales como las nanopartículas lipídicas (LNP), para administrar agentes terapéuticos, por ejemplo, ARNm modificado, donde los agentes se eliminan rápidamente de la sangre tras una segunda y posteriores administraciones (es decir, la depuración sanguínea acelerada (ABC)). El mecanismo incluye el reconocimiento de compuestos o composiciones que comprenden lípidos (por ejemplo, LNP) por parte de las células B, en particular, por parte de las células B1a, a través del reconocimiento de CD36 y/o TLR de los componentes lipídicos, como la fosfatidilcolina. Las células B1a activadas secretan IgM, en particular, IgM natural, que puede contribuir a la ABC (*por ejemplo, a través de un mecanismo de tipo de respuesta de fase aguda*). El componente fosfolípido (*por ejemplo, DSPC*) de un compuesto o composición que comprende lípidos (por ejemplo, LNP) también puede activar plaquetas, por ejemplo, en circulación. Las plaquetas activadas pueden agregarse y unirse a los macrófagos, que posteriormente liberan citoquinas inflamatorias y migran al bazo. El secuestro de compuestos o composiciones que comprenden lípidos (por ejemplo, LNP) al bazo ocurre casi inmediatamente después de la administración.

- Se ha descubierto que la ABC está mediada, al menos en parte, por células B, específicamente células B1a. Estas células B normalmente son responsables de secretar anticuerpos IgM naturales, que son polirreactivos, lo que significa que pueden unirse a una variedad de antígenos, aunque con una afinidad relativamente baja por cada uno. Tras la administración de una primera dosis de un agente, las células B1a se unen al agente y se activan, secretando así la IgM natural que se une al agente, como la fosfatidilcolina. Una segunda o posterior dosis de un compuesto o composición que comprende lípidos se dirige, a continuación, mediante IgM circulante y se elimina rápidamente. Las células B convencionales, denominadas como células B2 o células B CD19(+) en esta invención, también están implicadas en la ABC. Específicamente, las células B convencionales pueden montar primero una respuesta de IgM seguida de una respuesta de IgG concomitante con una respuesta de memoria. Las células B convencionales reaccionan contra el agente administrado y el polietilenglicol (PEG) y contribuyen a la IgM (y eventualmente la IgG) que media la ABC. Las soluciones anteriores a este desafío se han centrado en suprimir la respuesta inmune en las composiciones de LNP administradas al sujeto. En particular, los regímenes de medicación conjunta (*por ejemplo, antihistamínicos, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), esteroides, corticosteroides y similares*) se han usado para suprimir el sistema inmunitario. Sin embargo, ahora se ha descubierto que la incorporación de al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes (por ejemplo, miR-126, miR-142, miR-155 y combinaciones de los mismos) en un constructo de ARNm modificado puede reducir o inhibir la ABC cuando el compuesto o composición que comprende lípidos, que comprende el ARNm modificado, se administra a un sujeto. Específicamente, se ha descubierto que la incorporación de al menos un sitio de unión de microARN en un ARNm modificado puede reducir o inhibir la proliferación y/o activación de células dendríticas plasmacitoides y/o reducir o inhibir la producción de IgM anti-PEG. Por ejemplo, como se demostró en el Ejemplo 7, la inclusión de al menos uno o más sitios de unión de miR en el constructo de ARNm conduce a niveles disminuidos de anticuerpos IgM anti-PEG en suero en ratones a los que se administró un compuesto o composición que comprende lípidos, que comprende los constructos de ARNm.

- Existen múltiples mecanismos posibles mediante los cuales la inclusión de al menos un sitio o sitios de unión de microARN, como se describe en esta invención, en un constructo de ARNm modificado que se administra mediante compuestos o composiciones que comprenden lípidos conduce a la reducción o inhibición de la ABC. En una realización, el mecanismo de acción del sitio o los sitios de unión de miARN es una "esponja" de microARN, donde el sitio o los sitios de unión de miARN en el constructo "absorbe(n)" los microARN que se unen al sitio o los sitios de unión. Esto puede conducir a la desregulación de dianas naturales del microARN específico, ya que este microARN se encuentra menos disponible o no está disponible para la regulación de las mismas. Este escenario imita los efectos de una desactivación/eliminación de microARN. En los ejemplos en los que es necesaria una regulación adecuada de las dianas naturales del microARN para que la capacidad de la célula actúe como una célula inmune

efectiva, este efecto de tipo esponja del microARN hace que la célula sea incapaz de producir una respuesta inmune. También es posible que la desregulación de una diana endógena del microARN interrumpa la homeostasis de la célula (por ejemplo, señalización de calcio), lo que lleva a una respuesta al estrés (por ejemplo, una respuesta de proteína desplegada). Alternativamente, es posible que la inclusión de la unión de microARN en el ARNm
5 suprima la expresión de este ARNm en el tipo de célula específica que alberga el microARN. También es posible que la inclusión del sitio de unión de microARN conduzca a la degradación del ARNm antes de que un sensor tipo TLR7 pueda reconocerlo. Se postula que los dos últimos mecanismos dependen de la escisión mediada por el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) de un ARNm que comprende uno o más sitios de unión para un microARN (miR) expresado en células inmunes. También es posible que estos mecanismos actúen en concierto,
10 ambos conduciendo a los efectos observados mediados por miR descritos en esta invención.

Independientemente de los mecanismos involucrados, el impacto resultante de la inclusión de al menos uno o más sitios de unión de microARN, como se describe en esta invención, en un constructo de ARNm es que las células inmunes que reconocen los compuestos o composiciones que comprenden lípidos (por ejemplo, pDC, células B
15 *por ejemplo*, células B circulantes, macrófagos) no se activan y, por lo tanto, no migran al bazo para activar las células B (*por ejemplo*, células B esplénicas). Además, la producción de citoquinas (por ejemplo, IL-6) se reduce o inhibe, lo que impide aún más la activación de las células inmunes. La reducción o inhibición de la activación de las células B da como resultado una reducción o inhibición de las IgM (*por ejemplo*, por las células B1a), IgM e IgG naturales. La producción de estas moléculas es esencial para la ABC y, por lo tanto, la reducción o inhibición de su producción
20 reduce o inhibe la ABC en general.

Por consiguiente, la descripción proporciona procedimientos para reducir o inhibir ABC cuando se usan compuestos que comprenden lípidos o composiciones que comprenden ARNm modificado que codifica un polipéptido de interés.

25 Varios aspectos de la descripción se describen adicionalmente en las subsecciones a continuación.

ARNm

La descripción proporciona ARN aislados, en particular ARNm, por ejemplo, ARNm modificados químicamente, que
30 codifican un polipéptido de interés y que incluyen al menos un sitio de unión a microARN (por ejemplo, sitios de unión de miR-126 y/o de miR-142). En otras realizaciones, la descripción proporciona ARN, por ejemplo, ARN modificados químicamente, que incluyen al menos un sitio de unión de microARN (por ejemplo, sitios de unión de miR-126 y/o de miR-142), pero que no necesariamente codifican un polipéptido de interés. Los últimos ARN también pueden carecer de otras características típicas de los ARNm (como las características del ARNm que se describen a
35 continuación), aunque incluyen el o los sitios de unión de miR-126 y/o de miR-142.

Un ARN puede ser un ARN de ocurrencia natural o no natural, por ejemplo, ARNm. Un ARNm puede incluir una o más nucleobases, nucleósidos o nucleótidos modificados, como se describe a continuación, en cuyo caso puede denominarse "ARNm modificado químicamente", también denominado en esta invención "ARNm modificado" o
40 "ARNmm". Tal como se describe en esta invención, "nucleósido" se define como un compuesto que contiene una molécula de azúcar (por ejemplo, una pentosa o ribosa) o un derivado de esta, en combinación con una base orgánica (por ejemplo, una purina o pirimidina) o un derivado de la misma (que también se denomina "nucleobase" en esta invención). Tal como se describe en esta invención, "nucleótido" se define como un nucleósido que incluye un grupo fosfato.

45 Un ARNm puede incluir una región 5' sin traducir (5' UTR), una región 3' sin traducir (3' UTR) y/o una región de codificación (por ejemplo, un marco de lectura abierto). Un ARNm puede incluir cualquier número adecuado de pares de bases, incluidos cientos (por ejemplo, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900) o miles (por ejemplo, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10.000) de pares de bases. Cualquier número (por ejemplo, todos, algunos o ninguno) de nucleobases, nucleósidos o nucleótidos puede ser un análogo de una especie canónica,
50 sustituida, modificada o de otro modo no natural. En ciertas realizaciones, se puede modificar todo un tipo particular de nucleótido o nucleobase.

En una realización, el ARNm comprende una primera región flanqueante ubicada en el terminal 5' de un marco de
55 lectura abierto (región de codificación) y una segunda región flanqueante ubicada en el terminal 3' del marco de lectura abierto (región de codificación), donde la primera región flanqueante comprende una región 5' 'sin traducir (5' UTR) y la segunda región flanqueante comprende una región 3' sin traducir (3' UTR). En una realización, la 5' UTR y la 3' UTR del ARNm no se derivan de la misma especie. En una realización, la 5' UTR y/o la 3' UTR del ARNm no se derivan de la betaglobina. En una realización, la región 5' sin traducir es heteróloga a la región codificante del
60 ARNm. En otra realización, la región 3' sin traducir es heteróloga a la región codificante del ARNm. En incluso otra

realización, la región 5' sin traducir y la región 3' sin traducir son heterólogas a la región codificante del ARNm. En incluso otra realización, el ARNm comprende al menos dos codones de parada.

La secuencia de un ejemplo no limitante de una 5' UTR adecuada para su uso en los constructos de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 53. La secuencia de un ejemplo no limitante de una 3' UTR adecuada para su uso en los constructos de ARNm se muestra en la SEQ ID NO: 30. Otros 5' y 3' UTR adecuadas para su uso en los constructos de ARNm son bien conocidos en la técnica.

Por ejemplo, las 5' UTR adecuadas incluyen las del gen de la β -globina (véase, por ejemplo, Kariko y col. (2008) Mol. Therap. 16:1833-40; US 8.278.063, US 9.012.219), el gen de la α -globina (véase, por ejemplo, US 9.012.219), el gen del polipéptido α del citocromo b-245 humano (CYBA) (véase, por ejemplo, Ferizi y col. (2015) Lab. Chip. 23:1456-1464), el gen de deshidrogenasa de hidroxisteroide (17- β) (HSD17B4) (véase, por ejemplo, Thess y col. (2015) Mol. Therap. 23:1456-1464; WO 2015/024667), el gen TOP (véase, por ejemplo, WO/2015101414, WO2015/101415, WO2015/062738, WO2015/024667, WO2015/024667), el gen de la proteína ribosomal Large 32 (L32) (véase, por ejemplo, WO2015/101414, WO2015/101415, WO2015/062738) y el gen ATP51 (véase, por ejemplo, WO2015/024667), así como también las 5' UTR virales, incluyendo aquellas del grabado del tabaco (TEV) (véase, por ejemplo, Katalin y col. (2012) Mol. Therap. 20:948-953; US 8,278,063, US 9,012,219), el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), (véase, por ejemplo, Andries y col. (2015) J. Control Release 217:337-344) y el gen del CMV temprano inmediato 1 (IE1) (véase, por ejemplo, US20140206753, WO2014/089486, WO2013/185069, WO2014/144196, WO2014/152659, WO2014/152940, WO2014/152774, WO2014/153052). Se han descrito 5' UTR sintéticas y también son adecuadas para su uso (véase, por ejemplo, Mandal y Rossi (2013) Nat. Protocol 5:68-82).

Adicionalmente, por ejemplo, las 3' UTR incluyen aquellas del gen β -globina (véase, por ejemplo, Kariko y col. (2008) Mol. Therap. 16:1833-40; US 8.278.063; US 9.012.219; WO2007/036366, US 2011/0065103, WO2011/015347, WO2012/072096, WO2013/143555, WO2014/071963), el gen α -globina (véase, por ejemplo, US 9.012.219; WO2015/101414, WO2015/101415, WO2015024667), el gen del polipéptido del citocromo α b-245 humano (CYBA) (véase, por ejemplo, Ferizi y col. (2015) Lab. Chip. 23:1456-1464), el gen de albúmina (véase, por ejemplo, Thess y col. (2015) Mol. Therap. 23:1456-1464), el gen del crecimiento humano (hGH) (véase, por ejemplo, US20140206753, WO2013/185069, WO2014/089486, WO2014/144196, WO2014/152659, WO2014/152940, WO2014/152774, WO2014/153052), el gen de la proteína rps9 ribosomal (véase, por ejemplo, WO2015/101414), el gen FIG4 (véase, por ejemplo, WO2015/101415), el gen de albúmina7 humana (véase, por ejemplo, WO2015/101415, WO2015/101414, WO2015/06273, WO2015/024667, WO2105/062737), así como también 3' UTR virales, incluyendo aquellas del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), (véase, por ejemplo, Andries y col. (2015) J. Control Release 217:337-344).

En algunas realizaciones, un ARNm como se describe en esta invención puede incluir una estructura de extremo 5', un nucleótido que termina la cadena, una secuencia Kozak (también conocida como secuencia consenso de Kozak), una horquilla, una secuencia poliA/y/o una señal de poliadenilación. En otras realizaciones, el ARNm carece de una secuencia de poli A y/o una señal de poliadenilación, sino que contiene una estructura alternativa para estabilizar el ARNm.

Una estructura de extremo 5' o especie de extremo es un compuesto que incluye dos restos de nucleósidos unidos por un conector y puede seleccionarse de entre un extremo de ocurrencia natural, un extremo no natural o uno análogo, o un análogo de extremo anti-inverso (ARCA). Una especie de extremo puede incluir uno o más nucleósidos modificados y/o fracciones enlazadoras. Por ejemplo, un extremo de ARNm natural puede incluir un nucleótido de guanina y un nucleótido de guanina (G) metilado en la posición 7, unido por un enlace trifosfato en sus posiciones 5', por ejemplo, $m^7G(5')ppp(5')G$, comúnmente escrito como m^7GpppG . Una especie de extremo también puede ser un análogo de extremo anti-inverso. Una lista no limitante de posibles especies de extremo incluye m^7GpppG , m^7Gpppm^7G , $m^73'dGpppG$, $m_2^{7,\circ 3'}GpppG$, $m_2^{7,\circ 3'}GppppG$, $m_2^{7,\circ 2'}GppppG$, m^7Gpppm^7G , $m^73'dGpppG$, $m_2^{7,\circ 3'}GpppG$, $m_2^{7,\circ 3'}GppppG$ y $m_2^{7,\circ 2'}GppppG$. En diversas realizaciones, el ARNm puede comprender un extremo terminal 5' seleccionado de entre el grupo que consiste en Cap0, Cap1, ARCA, inosina, N1-metil-guanosina, 2'fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina. En una realización, el extremo terminal 5' es Cap1.

Un ARNm puede incluir, en su lugar o adicionalmente, un nucleósido que termina la cadena. Por ejemplo, un nucleósido que termina la cadena puede incluir aquellos nucleósidos desoxigenados en las posiciones 2' y/o 3' de su grupo de azúcar. Dichas especies pueden incluir 3'-desoxiadenosina (cordicepina), 3'-desoxiuridina, 3'-desoxicitosina, 3'-desoxiguanosina, 3'-desoxitimina y 2',3'-didesoxinucleósidos, como 2',3'-didesoxiadenosina, 2',3'-didesoxiuridina, 2',3'-didesoxicitosina, 2',3'-didesoxiguanosina y 2',3'-didesoxitimina. En algunas realizaciones, la

incorporación de un nucleótido que termina la cadena en un ARNm, por ejemplo, en el extremo 3', puede dar como resultado la estabilización del ARNm, como se describe, por ejemplo, en la Publicación de Patente Internacional No. WO 2013/103659.

- 5 Un ARNm puede, en su lugar o adicionalmente, incluir una horquilla, como una horquilla de histona. Una horquilla puede incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más pares de bases de nucleótidos. Por ejemplo, una horquilla puede incluir 4, 5, 6, 7 u o 8 pares de bases de nucleótidos. Una horquilla puede estar ubicada en cualquier región de un ARNm. Por ejemplo, una horquilla puede ubicarse en, antes o después de una región sin traducir (una región 5' sin traducir o una región 3' sin traducir), una región codificante o una secuencia o cola poliA. En algunas realizaciones, una horquilla puede afectar una o más funciones de un ARNm, como el inicio de la traducción, la eficiencia de la traducción y/o la terminación transcripcional.

- Un ARNm puede, en su lugar o adicionalmente, incluir una secuencia de poliA y/o señal de poliadenilación. Una secuencia de poliA puede estar compuesta total o principalmente de nucleótidos de adenina o análogos o derivados de los mismos. Una secuencia de poliA puede ser una cola ubicada adyacente a una región 3' sin traducir de un ARNm. En algunas realizaciones, una secuencia de poliA puede afectar la exportación nuclear, la traducción y/o estabilidad de un ARNm.

- En algunas realizaciones, un ARNm es un ARNm bicistrónico que comprende una primera y una segunda región de codificación con una secuencia intermedia que comprende una secuencia de sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) que permite el inicio de la traducción interna entre la primera y la segunda región de codificación, o con una secuencia intermedia que codifica un péptido de auto escisión, tal como un péptido 2A. Las secuencias IRES y los péptidos 2A se usan típicamente para mejorar la expresión de múltiples proteínas del mismo vector. Una variedad de secuencias de IRES son conocidas y están disponibles en la técnica y pueden usarse, incluyendo, por ejemplo, la secuencia de IRES del virus de la encefalomiocarditis.

- En una realización, los polinucleótidos de la presente descripción pueden incluir una secuencia que codifica un péptido de auto escisión. El péptido de auto escisión puede ser, entre otros, un péptido 2A. Se conoce una variedad de péptidos 2A que están disponibles en la técnica y se pueden usar, incluyendo, por ejemplo, el péptido 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV), el péptido del virus A de la rinitis equina 2A, el péptido del virus 2A de *Thesea asigna* y el péptido 2A del teschovirus-1 porcino. Varios virus usan los péptidos 2A para generar dos proteínas a partir de una transcripción por omisión de ribosomas, de modo tal que un enlace peptídico normal se ve afectado en la secuencia del péptido 2A, lo que resulta en la producción de dos proteínas discontinuas a partir de un evento de traducción. Como un ejemplo no limitante, el péptido 2A puede tener la secuencia de proteína: GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 4), fragmentos o variantes de la misma. En una realización, el péptido 2A escinde entre la última glicina y la última prolina. Como otro ejemplo no limitante, los polinucleótidos de la presente descripción pueden incluir una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido 2A que tiene la secuencia de proteína GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 4) fragmentos o variantes de la misma. Un ejemplo de una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido 2A es: GGAAGCGGAGCTACTAAGCTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAG AACCTGGACCT (SEQ ID NO: 5). En una realización ilustrativa, un péptido 2A está codificado por la siguiente secuencia: 5'-TCCGGACTCAGATCCGGGGATCTCAAAATTGTCGCTCCTGTCAAACAACTCTTA ACTTTGATTTACTCAAAGTGGCTGGGGATGTAGAAAGCAATCCAGGTCCACTC-3' (SEQ ID NO: 6). La secuencia polinucleotídica del péptido 2A puede modificarse o optimizarse en el codón mediante los procedimientos descritos en esta invención. y/o procedimientos conocidos en la técnica.

- En una realización, esta secuencia puede usarse para separar las regiones codificantes de dos o más polipéptidos de interés. Como ejemplo no limitante, la secuencia que codifica el péptido 2A puede estar entre una primera región codificante A y una segunda región codificante B (A-2Apep-B). La presencia del péptido 2A da como resultado la escisión de una proteína larga en proteína A, proteína B y el péptido 2A. La proteína A y la proteína B pueden ser los mismos o diferentes péptidos o polipéptidos de interés.

ARNm modificados

- En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción comprende una o más nucleobases, nucleósidos o nucleótidos modificados (denominados "ARNm químicamente modificados", también denominados en esta invención como "ARNm modificados" o "ARNmm"). En algunas realizaciones, los ARNm modificados pueden tener propiedades útiles, que incluyen estabilidad mejorada, retención intracelular, traducción mejorada, y/o la falta de una inducción sustancial de la respuesta inmune innata de una célula en la que se introduce el ARNm, en comparación con un ARNm de referencia sin modificar. Por lo tanto, el uso de ARNm modificados puede mejorar la eficiencia de la

producción de proteínas, la retención intracelular de ácidos nucleicos, así como poseer una inmunogenicidad reducida.

En algunas realizaciones, un ARNm incluye una o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) diferentes nucleobases, nucleósidos o nucleótidos modificados. En algunas realizaciones, un ARNm incluye uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más) nucleobases, nucleósidos o nucleótidos modificados. En algunas realizaciones, el ARNm modificado puede tener una degradación reducida en una célula en la que se introduce el ARNm, en relación con un ARNm no modificado correspondiente.

10 En una realización, el ARNm comprende al menos una modificación de nucleósido (o nucleótido). En otra realización, el ARNm comprende al menos una modificación en comparación con la estructura química de un ribonucleósido A, G, U o C. En incluso otra realización, el ARNm es un polinucleótido aislado que comprende;

- (a) una primera región de nucleósidos enlazados, codificando dicha primera región un polipéptido de interés;
- 15 (b) una primera región flanqueante ubicada como 5' con respecto a dicha primera región que comprende una región 5' (5' UTR) sin traducir y al menos un extremo terminal 5';
- (c) una segunda región flanqueante ubicada como 3' con respecto a dicha primera región que comprende una región 3' (3' UTR) sin traducir y una secuencia de cola 3' de nucleósidos enlazados;

20 donde dicho polinucleótido comprende al menos un nucleósido modificado químicamente.

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es un uracilo modificado. Las nucleobases y nucleósidos de ejemplo que tienen un uracilo modificado incluyen pseudouridina (ψ), ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 6-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-uridina (s^2U), 4-tio-uridina (s^4U), 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxi-uridina (ho^5U), 5-aminoallil-uridina, 5-halo-uridina (por ejemplo, 5-iodo-uridina o 5-bromo-uridina), 3-metil-uridina (m^3U), 5-metoxi-uridina (mo^5U), ácido uridin 5-oxiacético (cmo^5U), éster metílico del ácido uridin 5-oxiacético ($mcmo^5U$), 5-carboximetil-uridina (cm^5U), 1-carboximetil-pseudouridina, 5-carboxihidroximetil-uridina (chm^5U), 5-carboxihidroximetil-uridina metil éster ($mchm^5U$), 5-metoxycarbonilmetil-uridina (mcm^5U), 5-metoxycarbonilmetil-2-tio-uridina (mcm^5s^2U), 5-aminometil-2-tio-uridina (nm^5s^2U), 5-metilaminometil-uridina (mnm^5U), 5-metilaminometil-2-tio-uridina (mnm^5s^2U), 5-metilaminometil-2-seleno-uridina (mnm^5se^2U), 5-carbamoylmetil-uridina (ncm^5U), 5-carboximetilaminometil-uridina ($cmnm^5U$), 5-carboximetilaminometil-2-tio-uridina ($cmnm^5s^2U$), 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometil-uridina (tm^5U), 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina (tm^5s^2U), 1-taurinometil-4-tio-pseudouridina, 5-metil-uridina (m^5U , es decir, que tiene la nucleobase desoxitimina), 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 5-metil-2-tio-uridina (m^5s^2U), 1-metil-4-tio-pseudouridina ($m^1s^4\psi$), 4-tio-1-metil-pseudouridina, 3-metil-pseudouridina ($m^3\psi$), 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidrouridina (D), dihidropseudouridina, 5,6-dihidrouridina, 5-metil-dihidrouridina (m^5D), 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxi-uridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, N1-metil-pseudouridina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina (acp^3U), 1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina ($acp^3\psi$), 5-(isopentenilaminometil)uridina (inm^5U), 5-(isopentenilaminometil)-2-tio-uridina (inm^5s^2U), α -tio-uridina, 2'-O-metil-uridina (Um), 5,2'-O-dimetil-uridina (m^5Um), 2'-O-metil-pseudouridina (ψm), 2-tio-2'-O-metil-uridina (s^2Um), 5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metil-uridina (mcm^5Um), 5-carbamoylmetil-2'-O-metil-uridina (ncm^5Um), 5-carboximetilaminometil-2'-O-metil-uridina ($cmnm^5Um$), 3,2'-O-dimetil-uridina (m^3Um), y 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metil-uridina (inm^5Um), 1-tio-uridina, deoxitimidina, 2'-F-ara-uridina, 2'-F-uridina, 2'-OH-ara-uridina, 5-(2-carbometoxivinil) uridina, y 5-[3-(1-E-propenilamino)]uridina.

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es una citosina modificada. Los ejemplos de nucleobases y nucleósidos que tienen una citosina modificada incluyen 5-aza-citidina, 6-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina (m^3C), N4-acetil-citidina (ac^4C), 5-formil-citidina (f^5C), N4-metil-citidina (m^4C), 5-metil-citidina (m^5C), 5-halo-citidina (por ejemplo, 5-yodo-citidina), 5-hidroximetil-citidina (hm^5C), 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina (s^2C), 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, 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina, lisidina (k_2C), α -tio-citidina, 2'-O-metil-citidina (Cm), 5,2'-O-dimetil-citidina (m^5Cm), N4-acetil-2'-O-metil-citidina (ac^4Cm), N4,2'-O-dimetil-citidina (m^4Cm), 5-formil-2'-O-metil-citidina (f^5Cm), N4,N4,2'-O-trimetil-citidina (m^4_2Cm), 1-tio-citidina, 2'-F-ara-citidina, 2'-F-citidina y 2'-OH-ara-citidina.

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es una adenina modificada. Los ejemplos de nucleobases y nucleósidos que tienen una adenina modificada incluyen 2-amino-purina, 2, 6-diaminopurina, 2-amino-6-halo-purina (por ejemplo, 2-amino-6-cloro-purina), 6-halo-purina (por ejemplo, 6-cloro-purina), 2-amino-6-metil-purina, 8-azido-adenosina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-amino-purina, 7-deaza-8-aza-2-amino-purina, 7-

deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metil-adenosina (m^1A), 2-metil-adenina (m^2A), N6-metil-adenosina (m^6A), 2-metiltio-N6-metil-adenosina (ms^2m^6A), N6-isopentenil-adenosina (i^6A), 2-metiltio-N6-isopentenil-adenosina (ms^2i^6A), N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina (io^6A), 2-metiltio-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina (ms^2io^6A), N6-glicinilcarbamoil-adenosina (g^6A), N6-treonilcarbamoil-adenosina (t^6A),
 5 N6-metil-N6-treonilcarbamoil-adenosina (m^6t^6A), 2-metiltio-N6-treonilcarbamoil-adenosina (ms^2g^6A), N6,N6-dimetil-adenosina (m^6_2A), N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenosina (hn^6A), 2-metiltio-N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenosina (ms^2hn^6A), N6-acetil-adenosina (ac^6A), 7-metil-adenina, 2-metiltio-adenina, 2-metoxi-adenina, α -tio-adenosina, 2'-O-metil-adenosina (Am), N6,2'-O-dimetil-adenosina (m^6Am), N6,N6,2'-O-trimetil-adenosina (m^6_2Am), 1,2'-O-dimetil-adenosina (m^1Am), 2'-O-ribosiladenosina (fosfato) ($Ar(p)$), 2-amino-N6-metil-purina, 1-tio-adenosina, 8-azido-
 10 adenosina, 2'-F-ara-adenosina, 2'-F-adenosina, 2'-OH-ara-adenosina-ara-adenosina y N6-(19-amino-pentaoxonadecil)-adenosina.

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es una adenina modificada. Las nucleobases y nucleósidos de ejemplo que tienen una guanina modificada incluyen inosina (I), 1-metil-inosina (m^1I), wiosina (imG), metilwiosina ($mimG$), 4-demetil-wiosina ($imG-14$), isowiosina ($imG2$), wibutosina (yW), peroxiwibutosina (o_2yW), hidroxiwibutosina ($OhyW$), hidroxiwibutosina insuficientemente modificada ($OhyW^*$), 7-deaza-guanosina, queuosina (Q), epoxiqueuosina (oQ), galactosil-queuosina ($galQ$), mannosil-queuosina ($manQ$), 7-ciano-7-deaza-guanosina ($preQ_0$), 7-aminometil-7-deaza-guanosina ($preQ_1$), arcaeosina (G^+), 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina (m^7G), 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metil-inosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metil-guanosina (m^1G), N2-metil-guanosina (m^2G), N2,N2-dimetil-guanosina (m^2_2G), N2,7-dimetil-guanosina ($m^{2,7}G$), N2, N2,7-dimetil-guanosina ($m^{2,2,7}G$), 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina, α -tio-guanosina, 2'-O-metil-guanosina (Gm), N2-metil-2'-O-metil-guanosina (m^2Gm), N2,N2-dimetil-2'-O-metil-guanosina (m^2_2Gm), 1-metil-2'-O-metil-guanosina (m^1Gm), N2,7-dimetil-2'-O-metil-guanosina ($m^{2,7}Gm$), 2'-O-metil-inosina (Im), 1,2'-O-dimetil-inosina (m^1Im), 2'-O-ribosilguanosina (fosfato) ($Gr(p)$), 1-tio-guanosina, O6-metil-guanosina, 2'-F-ara-guanosina y 2'-F-guanosina.

En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción incluye una combinación de una o más de las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es pseudouridina (ψ), N1-metilpseudouridina ($m^1\psi$), 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina o 2'-O-metil uridina. En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción incluye una combinación de una o más de las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es una citosina modificada. Las nucleobases y los nucleósidos ejemplares que tienen una citosina modificada incluyen N4-acetil-citidina (ac^4C), 5-metil-citidina (m^5C), 5-halo-citidina (por ejemplo, 5-yodo-citidina), 5-hidroximetil-citidina (hm^5C), 1-metil-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina (s^2C) y 2-tio-5-metil-citidina. En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción incluye una combinación de una o más de las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es una adenina modificada. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una adenina modificada incluyen 7-desaza-adenina, 1-metil-adenosina (m^1A), 2-metil-adenina (m^2A) y N6-metil-adenosina (m^6A). En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción incluye una combinación de una o más de las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es una guanina modificada. Las nucleobases y los nucleósidos ejemplares que tienen una guanina modificada incluyen inosina (I), 1-metil-inosina (m^1I), wiosina (imG), metilwiosine ($mimG$), 7-deaza-guanosina, 7-ciano-7-deaza-guanosina ($preQ_0$), 7-aminometil-7-deaza-guanosina ($preQ_1$), 7-metil-guanosina (m^7G), 1-metil-guanosina (m^1G), 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina. En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción incluye una combinación de una o más de las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

En algunas realizaciones, la nucleobase modificada es 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 5-metoxi-uridina (mo^5U), 5-

metil-citidina (m^5C), pseudouridina (ψ), α -tio-guanosina o α -tio-adenosina. En algunas realizaciones, un ARNmm de la descripción incluye una combinación de una o más de las nucleobases modificadas antes mencionadas (por ejemplo, una combinación de 2, 3 o 4 de las nucleobases modificadas antes mencionadas).

5 En algunas realizaciones, el ARNmm comprende pseudouridina (ψ). En algunas realizaciones, el ARNmm comprende pseudouridina (ψ) y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNmm comprende 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$). En algunas realizaciones, el ARNmm comprende 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$) y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNmm comprende 2-tiouridina (s^2U). En algunas realizaciones, el ARNmm comprende 2-tioudouridina y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNmm comprende 5-metoxi-
10 uridina (mo^5U). En algunas realizaciones, el ARN, por ejemplo, comprende 5-metoxi-uridina (mo^5U) y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNmm comprende 2'-O-metil uridina. En algunas realizaciones, el ARNmm comprende 2'-O-metil uridina y 5-metil-citidina (m^5C). En algunas realizaciones, el ARNmm comprende N6-metil-adenosina (m^6A). En algunas realizaciones, el ARNmm comprende N6-metil-adenosina (m^6A) y 5-metil-citidina (m^5C).

15 En ciertas realizaciones, un ARNmm de la descripción se modifica uniformemente (es decir, se modifica de manera total, a lo largo de toda la secuencia) para una modificación particular. Por ejemplo, un ARNmm puede modificarse uniformemente con 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$) o 5-metil-citidina (m^5C), lo que significa que todos los residuos de uridina o citosina en la secuencia de ARNmm se reemplazan con 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$) o con 5-metil-citidina
20 (m^5C), respectivamente. De manera similar, los ARNmm de la descripción se pueden modificar uniformemente para cualquier tipo de residuo nucleósido presente en la secuencia mediante el reemplazo con un residuo modificado tal como los establecidos anteriormente.

En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción puede modificarse en una región de codificación (por ejemplo, un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido). En otras realizaciones, un ARNm puede modificarse en otras regiones, además de una región de codificación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporcionan una 5' UTR y/o una 3' UTR, donde una o ambas pueden contener independientemente una o más modificaciones de nucleósidos diferentes. En tales realizaciones, las modificaciones de nucleósidos también pueden estar presentes en la región de codificación.

30 Los ejemplos de modificaciones de nucleósidos y combinaciones de los mismos que pueden estar presentes en los ARNmm de la presente descripción incluyen, entre otros, los descritos en las Publicaciones de la Solicitud de Patente PCT: WO2012045075, WO2014081507, WO2014093924, WO2014164253 y WO2014159813.

35 Los ARNmm de la descripción pueden incluir una combinación de modificaciones al azúcar, la nucleobase y/o el enlace entre nucleósidos. Estas combinaciones pueden incluir una o más modificaciones descritas en esta invención.

Los ejemplos de nucleósidos modificados y combinaciones de nucleósidos modificados se proporcionan a continuación en la Tabla 1 y la Tabla 2. Estas combinaciones de nucleótidos modificados se pueden usar para formar los ARNmm, de la descripción. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados pueden estar parcial o completamente sustituidos por los nucleótidos naturales de los ARNmm, de la descripción. Como ejemplo no limitante, el nucleótido natural uridina puede sustituirse con un nucleósido modificado descrito en esta invención. En otro ejemplo no limitante, el nucleósido natural uridina puede estar parcialmente sustituido (por ejemplo,
45 aproximadamente 0,1, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99,9 % de las uridinas naturales) con al menos uno de los nucleósidos modificados descritos en esta invención.

Tabla 1. Combinaciones de modificaciones de nucleósidos

Nucleótido modificado	Combinación de nucleótidos modificados
α -tio-citidina	α -tio-citidina/5-iodo-uridina
	α -tio-citidina/N1-metil-pseudouridina
	α -tio-citidina/ α -tio-uridina
	α -tio-citidina/5-metil-uridina
	α -tio-citidina/pseudo-uridina
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son α -tio-citidina

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>
pseudoisocitidina	pseudoisocitidina/5-iodo-uridina
	pseudoisocitidina/N 1-metil-pseudouridina
	pseudoisocitidina/ α -thio-uridina
	pseudoisocitidina/5-metil-uridina
	pseudoisocitidina/pseudouridina
	alrededor del 25 % de las citosinas son pseudoisocitidina
	pseudoisocitidina/aproximadamente el 50 % de las uridinas son N1-metil-pseudouridina y aproximadamente el 50 % de las uridinas son pseudouridina
	pseudoisocitidina/aproximadamente el 25 % de las uridinas son N1-metil-pseudouridina y aproximadamente el 25 % de las uridinas son pseudouridina
pirrolo-citidina	pirrolo-citidina/5-iodo-uridina
	pirrolo-citidina/N 1-metil-pseudouridina
	pirrolo-citidina/ α -tio-uridina
	pirrolo-citidina/5-metil-uridina
	pirrolo-citidina/pseudouridina
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son pirrolo-citidina
5-metil-citidina	5-metil-citidina/5-iodo-uridina
	5-metil-citidina/N1-metil-pseudouridina
	5-metil-citidina/ α -tio-uridina
	5-metil-citidina/5-metil-uridina
	5-metil-citidina/pseudouridina
	aproximadamente el 25 % de las citosinas son 5-metil-citidina
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son 5-metil-citidina
	5-metil-citidina/5-metoxi-uridina
	5-metil-citidina/5-bromo-uridina
	5-metil-citidina/2-tio-uridina
	5-metil-citidine/aproximadamente el 50 % de las uridinas son 2-tio-uridina
	aproximadamente el 50 % de las uridinas son 5-metil-citidina/ aproximadamente el 50 % de las uridinas son 2-tio-uridinas
N4-acetil-citidina	N4-acetil-citidina /5-iodo-uridina
	N4-acetil-citidina/N1-metil-pseudouridina
	N4-acetil-citidina// α -tio-uridina
	N4-acetil-citidina /5-metil-uridina
	N4-acetil-citidina/pseudouridina
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son N4-acetil-citidina
	aproximadamente el 25 % de las citosinas son N4-acetil-citidina
	N4-acetil-citidina/5-metoxi-uridina
	N4-acetil-citidina/5-bromo-uridina

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>
	N4-acetil-citidina/2-tio-uridina
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son N4-acetil-citidina/ aproximadamente el 50 % de las uridinas son 2-tio-uridinas

Tabla 2. Nucleósidos modificados y combinaciones de los mismos

1-(2,2,2-trifluoroetil)pseudo-UTP
1-etil-pseudo-UTP
1-metil-pseudo-U-alfa-tio-TP
1-metil-pseudouridina TP, ATP, GTP, CTP
1-metil-pseudo-UTP/5-metil-CTP/ATP/GTP
1-metil-pseudo-UTP/CTP/ATP/GTP
1-propil-pseudo-UTP
25 % 5-aminoalil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-aminoalil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-bromo-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-bromo-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-bromo-CTP + 75 % CTP/1-metil-pseudo-UTP
25 % 5-carboxi-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-carboxi-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-etil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-etil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-etinil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-etinil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-fluoro-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-fluoro-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-formil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-formil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-hidroximetil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-hidroximetil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-yodo-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-yodo-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-metoxi-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-metoxi-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-metil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % 1-metil-pseudo-UTP
25 % 5-metil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-metil-CTP + 75 % CTP/ 50 % 5-metoxi-UTP + 50 % 1-metil-pseudo-UTP
25 % 5-metil-CTP + 75 % CTP/ 50 % 5-metoxi-UTP + 50 % UTP

ES 2 810 701 T3

25 % 5-metil-CTP + 75 % CTP/5-metoxi-UTP
25 % 5-metil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % 1-metil-pseudo-UTP
25 % 5-metil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-fenil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-fenil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-trifluorometil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % 5-trifluorometil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-trifluorometil-CTP + 75 % CTP/1-metil-pseudo-UTP
25 % N4-Ac-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % N4-Ac-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % N4-Bz-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % N4-Bz-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % N4-metil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % N4-metil-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % pseudo-iso-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
25 % pseudo-iso-CTP + 75 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
25 % 5-bromo-CTP/75 % CTP/ pseudo-UTP
25 % 5-metoxi-UTP/25 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
25 % 5-metoxi-UTP/ 5-metil-CTP/ATP/GTP
25 % 5-metoxi-UTP/75 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
25 % 5-metoxi-UTP/CTP/ATP/GTP
25 % 5-metoxi-UTP/50 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
2-amino-ATP
2-tio-CTP
2-tio-pseudouridina TP, ATP, GTP, CTP
2-tio-pseudo-UTP
2- tio- UTP
3-metil-CTP
3-metil-pseudo-UTP
4-tio-UTP
50 % 5-bromo-CTP + 50 % CTP/1-metil-pseudo-UTP
50 % 5-hidroximetil-CTP + 50 % CTP/1-metil-pseudo-UTP
50 % 5-metoxi-UTP/ 5-metil-CTP/ATP/GTP
50 % 5-metil-CTP + 50 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % 1-metil-pseudo-UTP
50 % 5-metil-CTP + 50 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
50 % 5-metil-CTP + 50 % CTP/ 50 % 5-metoxi-UTP + 50 % 1-metil-pseudo-UTP
50 % 5-metil-CTP + 50 % CTP/ 50 % 5-metoxi-UTP + 50 % UTP

50 % 5-metil-CTP + 50 % CTP/5-metoxi-UTP
50 % 5-metil-CTP + 50 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % 1-metil-pseudo-UTP
50 % 5-metil-CTP + 50 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
50 % 5-trifluorometil-CTP + 50 % CTP/1-metil-pseudo-UTP
50 % 5-bromo-CTP/ 50 % CTP/ pseudo-UTP
50 % 5-metoxi-UTP/25 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
50 % 5-metoxi-UTP/50 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
50 % 5-metoxi-UTP/75 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
50 % 5-metoxi-UTP/CTP/ATP/GTP
5-aminoallil-CTP
5-aminoallil-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-aminoallil-UTP
5-bromo-CTP
5-fenil-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-bromo-CTP/1-metil-pseudo-UTP
5-bromo-CTP/pseudo- UTP
5-bromocitidina TP, ATP, GTP, UTP
5-bromo-UTP
5-carboxi-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-etil-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-etinil-CTP/5-metoxi- UTP
5-fluoro-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-formil-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-hidroxi-metil-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-hidroximetil-CTP
5-hidroximetil-CTP/1-metil-pseudo-UTP
5-hidroximetil-CTP/5-metoxi- UTP
5-hidroximetil-citidina TP, ATP, GTP, UTP
5-yodo-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-Me-CTP/5-metoxi- UTP
5-metoxicarbonil metil-UTP
5-metoxi-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-metoxi-uridina TP, ATP, GTP, UTP
5-metoxi-UTP
5-metoxi-UTP
5-metoxi-UTP/ N6-isopentenil-ATP
5-metoxi-UTP/25 % 5-metil-CTP/ATP/GTP

5-metoxi-UTP/5-metil-CTP/ATP/GTP
5-metoxi-UTP/75 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
5-metoxi-UTP/CTP/ATP/GTP
5-metil-2-tio-UTP
5-metilaminometil-UTP
5-metil-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-metil-CTP/ 5-metoxi-UTP(extremo 0)
5-metil-CTP/ 5-metoxi-UTP(sin extremo)
5-metil-CTP/25 % 5-metoxi-UTP + 75 % 1-metil-pseudo-UTP
5-metil-CTP/25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
5-metil-CTP/50 % 5-metoxi-UTP + 50 % 1-metil-pseudo-UTP
5-metil-CTP/50 % 5-metoxi-UTP + 50 % UTP
5-metil-CTP/5-metoxi-UTP/N6-Me-ATP
5-metil-CTP/75 % 5-metoxi-UTP + 25 % 1-metil-pseudo-UTP
5-metil-CTP/75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
5-fenil-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-trifluoro-metil-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-trifluorometil-CTP
5-trifluorometil-CTP/ 5-metoxi-UTP
5-trifluorometil-CTP/1-metil-pseudo-UTP
5-trifluorometil-CTP/pseudo- UTP
5-trifluorometil-UTP
5-trifluorometilcitosina TP, ATP, GTP, CTP
75 % 5-aminoalil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-aminoalil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-bromo-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-bromo-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-carboxi-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-carboxi-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-etil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-etil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-etinil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-etinil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-fluoro-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-fluoro-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-formil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-formil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP

ES 2 810 701 T3

75 % 5-idroksimetil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-idroksimetil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-jodo-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-jodo-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-metoksi-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-metoksi-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-metoksi-UTP/ 5-metil-CTP/ATP/GTP
75 % 5-metil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % 1-metil-pseudo-UTP
75 % 5-metil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-metil-CTP + 25 % CTP/ 50 % 5-metoksi-UTP + 50 % 1-metil-pseudo-UTP
75 % 5-metil-CTP + 25 % CTP/ 50 % 5-metoksi-UTP + 50 % UTP
75 % 5-metil-CTP + 25 % CTP/5-metoksi-UTP
75 % 5-metil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % 1-metil-pseudo-UTP
75 % 5-metil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-fenil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-fenil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-trifluorometil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % 5-trifluorometil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-trifluorometil-CTP + 25 % CTP/1-metil-pseudo-UTP
75 % N4-Ac-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % N4-Ac-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % N4-Bz-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % N4-Bz-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % N4-metil-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % N4-metil-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % pseudo-iso-CTP + 25 % CTP/ 25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP
75 % pseudo-iso-CTP + 25 % CTP/ 75 % 5-metoksi-UTP + 25 % UTP
75 % 5-bromo-CTP/25 % CTP/ 1-metil-pseudo-UTP
75 % 5-bromo-CTP/25 % CTP/ pseudo-UTP
75 % 5-metoksi-UTP/25 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
75 % 5-metoksi-UTP/50 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
75 % 5-metoksi-UTP/75 % 5-metil-CTP/ATP/GTP
75 % 5-metoksi-UTP/CTP/ATP/GTP
8-Aza-ATP
Alfa-tio-CTP
CTP/25 % 5-metoksi-UTP + 75 % 1-metil-pseudo-UTP
CTP/25 % 5-metoksi-UTP + 75 % UTP

CTP/50 % 5-metoxi-UTP + 50 % 1-metil-pseudo-UTP
CTP/50 % 5-metoxi-UTP + 50 % UTP
CTP/5-metoxi-UTP
CTP/5-metoxi-UTP (extremo 0)
CTP/5-metoxi-UTP(sin extremo)
CTP/75 % 5-metoxi-UTP + 25 % 1-metil-pseudo-UTP
CTP/75 % 5-metoxi-UTP + 25 % UTP
CTP/UTP(sin extremo)
N1-Me-GTP
N4-Ac-CTP
N4Ac-CTP/1-metil-pseudo-UTP
N4Ac-CTP/5- metoxi- UTP
N4-acetil-citidina TP, ATP, GTP, UTP
N4-Bz-CTP/ 5-metoxi-UTP
N4-metil CTP
N4-metil-CTP/ 5-metoxi-UTP
Pseudo-iso-CTP/ 5-metoxi-UTP
PseudoU-alfa-tio-TP
pseudouridina TP, ATP, GTP, CTP
pseudo-UTP/5-metil-CTP/ATP/GTP
Éster de Me de ácido UTP-5-oxiacético
Xantosina

Según la descripción, los polinucleótidos de la descripción pueden sintetizarse de modo tal que comprendan las combinaciones o modificaciones individuales de la Tabla 1 o la Tabla 2.

- 5 Cuando se enumera una única modificación, el nucleósido o nucleótido enumerado representa el 100 por ciento de ese nucleótido o nucleósido A, U, G o C que se ha modificado. Cuando se enumeran los porcentajes, estos representan el porcentaje de ese trifosfato de nucleobase A, U, G o C particular de la cantidad total de trifosfato A, U, G o C presente. Por ejemplo, la combinación: 25 % 5-aminoalil-CTP + 75 % CTP/ 25 % 5-metoxi-UTP + 75 %
- 10 UTP se refiere a un polinucleótido donde el 25 % de los trifosfatos de citosina son 5-aminoalil-CTP, mientras que el 75 % de las citosinas son CTP; mientras que el 25 % de los uracilos son 5-metoxi UTP, mientras que el 75 % de los uracilos son UTP. Donde no se enumera ningún UTP modificado, a continuación, se usa un ATP, UTP, GTP y/o CTP natural en el 100 % de los sitios de esos nucleótidos encontrados en el polinucleótido. En este ejemplo, todos los nucleótidos GTP y ATP se dejan sin modificar.
- 15 Los ARNm de la presente descripción, o las regiones del mismo, pueden ser de codones optimizados. Los procedimientos de optimización de codones son conocidos en la técnica y pueden ser útiles para una variedad de objetos: igualar frecuencias de codones en organismos hospedadores para garantizar el plegamiento adecuado, para alterar el contenido de GC para aumentar la estabilidad de ARNm o reducir estructuras secundarias, para
- 20 minimizar los codones de repetición en tándem o corridas de base que pueden impedir la expresión o construcción génica, para modificar las regiones de control de transcripción y traducción, para insertar o eliminar secuencias de tráfico de proteínas, para eliminar o agregar sitios de modificación postraduccional en proteínas codificadas (por ejemplo, sitios de glicosilación), para agregar, eliminar o mezclar dominios proteicos, para insertar o eliminar sitios de restricción, para modificar sitios de unión a ribosomas y sitios de degradación de ARNm, para ajustar las tasas de
- 25 traducción con el fin de permitir que los diversos dominios de la proteína se plieguen adecuadamente, o para reducir

o eliminar estructuras secundarias problemáticas dentro del polinucleótido. Las herramientas, algoritmos y servicios de optimización de codones son conocidos en la técnica; los ejemplos no taxativos incluyen los servicios de GeneArt (Life Technologies), DNA2.0 (Menlo Park, CA) y/o procedimientos de marca registrada. En una realización, la secuencia de ARNm se optimiza usando algoritmos de optimización, por ejemplo, para optimizar la expresión en células de mamífero o mejorar la estabilidad del ARNm.

En ciertas realizaciones, la presente descripción incluye polinucleótidos que tienen al menos el 80, al menos el 85, al menos el 90, al menos el 95, al menos el 98 o al menos 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de polinucleótidos descritas en esta invención.

10

Los ARNm, de la presente descripción, pueden producirse por los medios disponibles en la técnica, que incluyen, entre otros, transcripción *in vitro* (IVT) y procedimientos sintéticos. Se pueden usar procedimientos enzimáticos (IVT), en fase sólida, en fase líquida, sintéticos combinados, síntesis en pequeñas regiones y procedimientos de ligadura. En una realización, los ARNm se hacen usando procedimientos de síntesis enzimática IVT. Los procedimientos para hacer polinucleótidos por IVT son conocidos en la técnica y se describen en la Solicitud Internacional PCT/US2013/30062. En consecuencia, la presente descripción también incluye polinucleótidos, por ejemplo, ADN, constructos y vectores que pueden usarse para transcribir *in vitro* un ARNm descrito en esta invención.

15

Las nucleobases modificadas no naturales pueden introducirse en polinucleótidos, por ejemplo, ARNm, durante o después de la síntesis. Las modificaciones pueden encontrarse presentes en un enlace internucleótido, bases de purina o pirimidina, o azúcares. En realizaciones particulares, la modificación puede introducirse en el terminal de una cadena de polinucleótidos o en cualquier otro lugar de la cadena de polinucleótidos; con síntesis química o con una enzima polimerasa. Los ejemplos de ácidos nucleicos modificados y su síntesis se describen en la solicitud PCT No. PCT/US2012/058519. La síntesis de polinucleótidos modificados también se describe en Verma y Eckstein, Annual Review of Biochemistry, vol. 76, 99-134 (1998).

25

Se pueden usar procedimientos de ligadura enzimática o química para conjugar polinucleótidos o sus regiones con restos funcionales diferentes, tales como agentes de dirección o administración, marcadores fluorescentes, líquidos, nanopartículas, etc. Sobre los conjugados de polinucleótidos y polinucleótidos modificados, hay una reseña en Goodchild, Bioconjugate Química, vol. 1(3), 165-187 (1990).

30

Sitios de unión de microARN para miR expresados en células inmunes

Los microARN (o miARN) tienen ARN no codificantes de 19-25 nucleótidos de largo (comúnmente 19-23 nucleótidos de largo, más típicamente 22 nucleótidos de largo) que se unen a la 3' UTR de las moléculas de ácido nucleico y regulan hacia abajo la expresión génica después de la traducción, ya sea reduciendo la estabilidad de la molécula de ácido nucleico o inhibiendo la traducción. Los ARNm de la descripción pueden comprender una o más secuencias o sitios diana de microARN, secuencias o sitios de unión a microARN, una secuencia complementaria a secuencias de microARN o una secuencia complementaria a una región o secuencia semilla de microARN. Dichas secuencias pueden corresponder a cualquier microARN conocido, como los que se enseñan en la Publicación de los EE.UU. US2005/0261218 y la Publicación de los EE.UU. US2005/0059005. Una secuencia de microARN comprende una región o secuencia "semilla", es decir, una secuencia en la región de las posiciones 2-8 del microARN maduro, cuya secuencia tiene una complementariedad perfecta de Watson-Crick con la secuencia diana de miARN. Las bases de la región o secuencia de semillas de microARN tienen una complementariedad completa con la secuencia diana. Los microARN derivan enzimáticamente de regiones de transcripciones de ARN que se pliegan sobre sí mismas para formar estructuras cortas en forma de horquilla, a menudo denominadas pre-miARNm (precursor-miARN). El pre-miARN típicamente tiene un saliente de dos nucleótidos en su extremo 3', y tiene grupos 3' hidroxilo y 5' fosfato. Este precursor-ARNm se procesa en el núcleo y posteriormente se transporta al citoplasma, donde DICER (una enzima ARNasa III) lo procesa para formar un microARN maduro de aproximadamente 22 nucleótidos. El microARN maduro se incorpora, a continuación, en una partícula ribonuclear para formar el complejo silenciador inducido por ARN, RISC, que media el silenciamiento génico. La nomenclatura reconocida en la técnica para los miARN maduros típicamente designa el brazo del pre-miARN del cual deriva el miARN maduro; "5p" significa que el microARN es del brazo 5 principal de la horquilla pre-miARN y "3p" significa que el microARN es del extremo 3 de la horquilla pre-miARN. Un miR al que se hace referencia en esta invención con un número puede referirse a cualquiera de los dos microARN maduros que se originan en brazos opuestos del mismo pre-miARN (por ejemplo, el microARN 3p o 5p). Se pretende que todos los miR a los que se hace referencia en esta invención incluyan tanto las secuencias/brazos 3p como 5p, a menos que se haga una especificación particular mediante la designación de 3p y 5p.

60

En algunas realizaciones, un ARNm de la descripción puede incluir uno o más sitios de unión de microARN (miARN). Tal como se usa en esta invención, el término "sitio de unión de microARN (miARN)" se refiere a una secuencia dentro de un polinucleótido, por ejemplo, dentro de un transcrito de ADN o ARN, que tiene suficiente complementariedad con todo o una región de un miARN para interactuar, asociarse o unirse al miARN. En 5 realizaciones ejemplares, los sitios de unión de miARN se incluyen en el ARNm, por ejemplo, en la 5' UTR y/o la 3' UTR de un ARNm. Una secuencia de sitio de unión de miR que tiene suficiente complementariedad con miR se refiere a un grado de complementariedad suficiente para facilitar la regulación mediada por miR del ARNm, por ejemplo, la represión o degradación traducida por miR del ARNm. En aspectos ejemplares de la descripción, una 10 secuencia de sitio de unión de miR que tiene suficiente complementariedad con miR se refiere a un grado de complementariedad suficiente para facilitar la degradación mediada por miR del ARNm, por ejemplo, la escisión mediada por RISC y guiado por miR del ARNm. El sitio de unión de miR puede tener complementariedad con, por ejemplo, una secuencia de miR de 19-25 nucleótidos de longitud, con una secuencia de miR de 19-23 nucleótidos, más típicamente con una secuencia de miR de 22 nucleótidos de longitud. Un sitio de unión de miR puede ser complementario solo a una porción de un miR, por ejemplo, a una porción 1, 2, 3 o 4 nucleótidos más cortos que un 15 miR natural. Se prefiere la complementariedad total o completa (por ejemplo, total o completamente complementaria, sobre todo en una porción significativa de un miR natural) cuando la regulación deseada es la degradación de ARNm. En algunas realizaciones, un sitio de unión de miARN incluye una secuencia que tiene complementariedad (por ejemplo, complementariedad parcial o completa) con una secuencia semilla de miARN. En realizaciones particulares, el sitio de unión de miARN incluye una secuencia que tiene complementariedad completa con una 20 secuencia semilla de miARN. En algunas realizaciones, un sitio de unión de miARN incluye una secuencia que tiene complementariedad (por ejemplo, complementariedad parcial o completa) con una secuencia de miARN. En realizaciones particulares, el sitio de unión de miARN incluye una secuencia que tiene complementariedad completa con una secuencia de miARN. En algunas realizaciones, un sitio de unión de miARN tiene complementariedad completa con una secuencia de miARN, pero para 1, 2 o 3 sustituciones de nucleótidos, adiciones terminales y/o 25 truncamientos

Se pueden incorporar una o más secuencias de unión de miR en un ARNm de la descripción para uno o más de una variedad de propósitos diferentes. Por ejemplo, la incorporación de uno o más sitios de unión de miARN en un ARNm de la descripción puede apuntar a la molécula para degradación o traducción reducida, siempre que el 30 miARN en cuestión esté disponible (por ejemplo, expresado en una célula o tejido diana). En algunas realizaciones, La incorporación de uno o más sitios de unión de miARN en un ARNm de la descripción puede reducir el riesgo de efectos inespecíficos tras la administración de moléculas de ácido nucleico y/o permitir la regulación específica de tejido de la expresión de un polipéptido codificado por el ARNm. En otras realizaciones más, la incorporación de uno o más sitios de unión de miARN en un ARNm de la descripción puede modular las respuestas inmunes tras la 35 administración de ácido nucleico *in vivo*. En realizaciones adicionales, la incorporación de uno o más sitios de unión de miARN en un ARNm de la descripción puede modular la depuración sanguínea acelerada (ABC) de compuestos y composiciones que comprenden lípidos descritos en esta invención.

Se seleccionaron miARN representativos en función de la expresión y abundancia en células inmunes del linaje 40 hematopoyético, tales como células B, células T, macrófagos, células dendríticas y células que se sabe que expresan TLR7/TLR8 y/o que son capaces de secretar citoquinas, como las células endoteliales y las plaquetas. El conjunto de miARN, por consiguiente, incluía miR que pueden ser responsables en parte de la inmunogenicidad de estas células, y de tal manera que una incorporación correspondiente del sitio miR en el ARNm podría conducir a la desestabilización del ARNm y/o la supresión de la traducción de estos ARNm en el tipo de célula específico. Los 45 ejemplos representativos no limitantes incluyen miR-142, miR-144, miR-150, miR-155 y miR-223, que son específicos para muchas de las células hematopoyéticas; miR-142, miR150, miR-16 y miR-223, que se expresan en las células B; miR-223, miR-451, miR-26a, miR-16, que se expresan en células progenitoras hematopoyéticas; y miR-126, que se expresa en células dendríticas plasmacitoides, plaquetas y células endoteliales. Para un análisis más detallado sobre la expresión tisular de miR, véase, por ejemplo, Teruel-Montoya, R. y col. (2014) PLoS One 9:e102259; Landgraf, P. y col. (2007) Cell 129:1401-1414; Bissels, U. y col. (2009) RNA 15:2375-2384. Como se 50 evidencia, la incorporación de cualquier sitio miR en la 3' UTR y/o la 5' UTR puede mediar tales efectos en múltiples tipos de células de interés (por ejemplo, el miR-142 es abundante tanto en células B como en células dendríticas).

Es beneficioso apuntar al mismo tipo de célula con múltiples miR e incorporar sitios de unión a cada uno de los 55 brazos 3p y 5p si ambos son abundantes (por ejemplo, tanto miR-142-3p como miR142-5p son abundantes en células madre hematopoyéticas). Por consiguiente, por ejemplo, en ciertas realizaciones, un constructo de ARNm contiene dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más) sitios de unión de miR de: (i) el grupo que consiste en miR-142, miR-144, miR-150, miR-155 y miR-223 (que se expresan en muchas células hematopoyéticas); o (ii) el grupo que consiste en miR-142, miR150, miR-16 y miR-223 (que se expresan en células B); o el grupo que consiste 60 en miR-223, miR-451, miR-26a, miR-16 (que se expresan en células hematopoyéticas progenitoras).

- También es beneficioso combinar varios miR de manera que se seleccionen múltiples tipos de células de interés al mismo tiempo (por ejemplo, miR-142 y miR-126 para apuntar a muchas células del linaje hematopoyético y las células endoteliales). Por consiguiente, por ejemplo, en ciertas realizaciones, un constructo de ARNm contiene dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más) sitios de unión de miR, donde: (i) al menos una de las células de miR se dirige al linaje hematopoyético (por ejemplo, miR-142, miR-144, miR-150, miR-155 o miR-223) y al menos uno de los miR se dirige a las células dendríticas, plaquetas o células endoteliales plasmacitoides (por ejemplo, miR-126); o (ii) al menos uno de los miR se dirige a las células B (por ejemplo, miR-142, miR-150, miR-16 o miR-223) y al menos uno de los miR se dirige a las células dendríticas, plaquetas o células endoteliales plasmacitoides (por ejemplo, miR-126); o (iii) al menos uno de los miR se dirige a las células hematopoyéticas progenitoras (por ejemplo, miR-223, miR-451, miR-26a o miR-16) y al menos uno de los miR se dirige a las células dendríticas, plaquetas o células endoteliales plasmacitoides (por ejemplo, miR-126); o (iv) al menos una de las células diana de miR del linaje hematopoyético (por ejemplo, miR-142, miR-144, miR-150, miR-155 o miR-223), al menos una de las células B de miR (por ejemplo, miR-142, miR-150, miR-16 o miR-223) y al menos uno de los miR se dirige a las células dendríticas, plaquetas o células endoteliales plasmacitoides (por ejemplo, miR-126); o cualquier otra combinación posible de las cuatro clases anteriores de sitios de unión de miR (es decir, los que se dirigen al linaje hematopoyético, los que se dirigen a las células B, los que se dirigen a las células hematopoyéticas progenitoras y/o los que se dirigen a las células dendríticas/plaquetas/células endoteliales).
- En consecuencia, en un ejemplo, para modular las respuestas inmunes, un ARNm puede comprender una o más secuencias de unión de miR que se unen a uno o más miR que se expresan en células inmunes convencionales o en cualquier célula que exprese TLR7 y/o TLR8 y secrete quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos y/o esplenocitos y/o células endoteliales). Ahora se ha descubierto que la incorporación en un ARNm de uno o más miR que se expresan en células inmunes convencionales o en cualquier célula que exprese TLR7 y/o TLR8 y secrete quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos y/o esplenocitos y/o células endoteliales) reduce o inhibe la activación de las células inmunes (por ejemplo, la activación de las células B, medida por la frecuencia de las células B activadas) y/o la producción de citoquinas (por ejemplo, la producción de IL-6, IFN- γ y/o TNF α). Además, se ha descubierto que la incorporación en un ARNm de uno o más miR que se expresan en células inmunes convencionales o cualquier célula que exprese TLR7 y/o TLR8 y secrete quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, células inmunes de órganos linfoides periféricos y/o esplenocitos y/o células endoteliales) puede reducir o inhibir una respuesta de anticuerpo antidrogas (ADA) contra una proteína de interés codificada por el ARNm.
- En otro ejemplo, para modular la depuración sanguínea acelerada de un ARNm administrado en un compuesto o composición que comprende lípidos, el ARNm puede comprender una o más secuencias de unión de miR que se unen a uno o más miR que se expresan en células inmunes convencionales o en cualquier célula que exprese TLR7 y/o TLR8 y secrete quimiocinas y/o citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, en células inmunes de órganos linfoides periféricos y/o esplenocitos y/o células endoteliales). Ahora se ha descubierto que la incorporación en un ARNm de uno o más sitios de unión de miR reduce o inhibe la depuración sanguínea acelerada (ABC) del compuesto o composición que comprende lípidos para su uso en la administración del ARNm. Además, ahora se ha descubierto que la incorporación de uno o más sitios de unión de miR en un ARNm reduce los niveles séricos de anti-IgM anti-PEG (por ejemplo, reduce o inhibe la producción aguda de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) por las células B) y/o reduce o inhibe la proliferación y/o activación de células dendríticas plasmacitoides después de la administración de un compuesto o composición que comprende lípidos, que comprende el ARNm.

Dichas secuencias de miR pueden corresponder a cualquier microARN expresado en células inmunes, incluyendo, entre otros, aquellos que se enseñan en la Publicación de los EE.UU. US2005/0261218 y la Publicación de los EE.UU. US2005/0059005. Los ejemplos no limitantes de miR expresados en células inmunes incluyen aquellos expresados en células del bazo, células mieloides, células dendríticas, células dendríticas plasmacitoides, células B, células T y/o macrófagos. Por ejemplo, los sitios de unión de miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27 se expresan en células mieloides, el miR-155 se expresa en células dendríticas, B y T, el miR-146 se regula hacia arriba en macrófagos tras la estimulación con TLR y el miR-126 se expresa en células dendríticas plasmacitoides. En ciertas realizaciones, el o los miR se expresan abundante o preferentemente en células inmunes. Por ejemplo, los sitios de unión de miR-142 (miR-142-3p y/o miR-142-5p), miR-126 (miR-126-3p y/o miR-126-5p), miR-146 (miR-146-3p y/o miR-146-5p) y miR-155 (miR-155-3p y/o miR-155-5p) se expresan abundantemente en las células inmunes. Estas secuencias de microARN son conocidas en la técnica y, por consiguiente, un experto en la materia puede diseñar fácilmente secuencias de unión o secuencias diana a las que se unirán estos microARN en función de la complementariedad de Watson-Crick.

En consecuencia, en varios ejemplos, el ARNm comprende al menos un sitio de unión de microARN para un miR seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-142, miR-146, miR-155, miR-126, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27. En otro ejemplo, el ARNm comprende al menos dos sitios de unión de miR para los microARN expresados en células inmunes. En varias realizaciones, el ARNm comprende 1-4, uno, dos, tres o cuatro sitios de unión de miR para los microARN expresados en células inmunes. En otro ejemplo, el ARNm comprende tres sitios de unión de miR. Estos sitios de unión de miR pueden ser para microARN seleccionados de entre el grupo que consiste en miR-142, miR-146, miR-155, miR-126, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27 y combinaciones de los mismos. En un ejemplo, el ARNm comprende dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro) copias del mismo sitio de unión de miR expresado en células inmunes, por ejemplo, dos o más copias de un sitio de unión de miR seleccionado del grupo de miR que consiste en miR-142, miR-146, miR-155, miR-126, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27.

Por ejemplo, en una realización, el ARNm comprende tres copias del mismo sitio de unión de miR. Como se describe en el Ejemplo 8, en ciertas realizaciones, el uso de tres copias del mismo sitio de unión de miR puede mostrar propiedades beneficiosas en comparación con el uso de un único sitio de unión de miR. Los ejemplos no limitantes de secuencias para 3' UTR que contienen tres sitios de unión de miR se muestran en la SEQ ID NO: 38 (tres sitios de unión de miR-142-3p), la SEQ ID NO: 40 (tres sitios de unión de miR-142-5p) y la SEQ ID NO: 54 (tres sitios de unión de miR-122).

En otra realización, el ARNm comprende dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro) copias de al menos dos sitios de unión de miR diferentes expresados en células inmunes. Los ejemplos no limitantes de secuencias de 3' UTR que contienen dos o más sitios de unión de miR diferentes se muestran en la SEQ ID NO: 33 (un sitio de unión de miR-142-3p y un sitio de unión de miR-126-3p), la SEQ ID NO: 47 (un sitio de unión de miR-142-3p y un sitio de unión de miR-122-5p), la SEQ ID NO: 41 (dos sitios de unión de miR-142-5p y un sitio de unión de miR-142-3p) y la SEQ ID NO: 44 (dos sitios de unión de miR-155-5p y un sitio de unión de miR-142-3p).

En otra realización, el ARNm comprende al menos dos sitios de unión de miR para microARN expresados en células inmunes, donde al menos uno de los sitios de unión de miR es para miR-142-3p. En varias realizaciones, el ARNm comprende sitios de unión para miR-142-3p y miR-155 (miR-155-3p o miR-155-5p), miR-142-3p y miR-146 (miR-146-3 o miR-146-5p), o miR-142-3p y miR-126 (miR-126-3p o miR-126-5p).

En otra realización, el ARNm comprende al menos dos sitios de unión de miR para microARN expresados en células inmunes, donde al menos uno de los sitios de unión de miR es para miR-126-3p. En varias realizaciones, el ARNm comprende sitios de unión para miR-126-3p y miR-155 (miR-155-3p o miR-155-5p), miR-126-3p y miR-146 (miR-146-3p o miR-146-5p), o miR-126-3p y miR-142 (miR-142-3p o miR-142-5p).

En otro ejemplo, el ARNm comprende al menos dos sitios de unión de miR para microARN expresados en células inmunes, donde al menos uno de los sitios de unión de miR es para miR-142-5p. En varias realizaciones, el ARNm comprende sitios de unión para miR-142-5p y miR-155 (miR-155-3p o miR-155-5p), miR-142-5p y miR-146 (miR-146-3 o miR-146-5p), o miR-142-5p y miR-126 (miR-126-3p o miR-126-5p).

En incluso otro ejemplo, el ARNm comprende al menos dos sitios de unión de miR para microARN expresados en células inmunes, donde al menos uno de los sitios de unión de miR es para miR-155-5p. En varias realizaciones, el ARNm comprende sitios de unión para miR-155-5p y miR-142 (miR-142-3p o miR-142-5p), miR-155-5p y miR-146 (miR-146-3 o miR-146-5p), o miR-155-5p y miR-126 (miR-126-3p o miR-126-5p).

En realizaciones ejemplares, el uno o más sitios de unión de miR se colocan dentro de la 3' UTR, la 5' UTR, o tanto la 3' como la 5' UTR, de modo tal que el ARNm tenga las propiedades deseadas. El sitio de unión de miR se puede colocar dentro de la 3' UTR inmediatamente después del codón de parada de la región de codificación dentro del constructo de ARNm (o, si hay múltiples copias de un codón de parada, en el constructo, inmediatamente después del codón de parada final) o el o los sitios de unión de miR se pueden colocar más abajo del codón de parada, en cuyo caso hay bases de 3' UTR entre el codón de parada y el o los sitios de unión de miR. Por ejemplo, tres ejemplos no limitantes de posibles sitios de inserción para un miR en una 3' UTR se muestran en las SEQ ID NO: 48, 49 y 50, que muestran una secuencia de 3' UTR con un sitio de miR-142-3p insertado en uno de los tres posibles sitios de inserción diferentes, respectivamente, dentro de la 3' UTR. Además, uno o más sitios de unión de miR pueden colocarse dentro de la 5' UTR en uno o más sitios de inserción posibles. Por ejemplo, los tres ejemplos no limitantes de posibles sitios de inserción para un miR en una 5' UTR se describen adicionalmente en el Ejemplo 9 y se muestran en las SEQ ID NO: 55, 56 y 57, que muestran una secuencia de 5' UTR con un sitio de miR-142-3p insertado en uno de tres sitios de inserción posibles diferentes, respectivamente, dentro de la 5' UTR. Adicionalmente, las SEQ ID NO: 58, 59 y 60 muestran una secuencia de 5' UTR con un sitio de miR-122 insertado

en uno de tres sitios de inserción posibles diferentes, respectivamente, dentro de la 5' UTR.

En una realización, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica un polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión de microARN se ubica dentro de la 3' UTR de 1 a 100 nucleótidos después del codón de parada. En una realización, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes se encuentra dentro de la 3' UTR de 30 a 50 nucleótidos después del codón de parada. En otra realización, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes se encuentra dentro de la 3' UTR al menos 50 nucleótidos después del codón de parada. En otras realizaciones, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y el al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes se ubica dentro de la 3' UTR inmediatamente después del codón de parada, o dentro de la 3' UTR de 15 a 20 nucleótidos después del codón de parada o dentro de la 3' UTR de 70 a 80 nucleótidos después del codón de parada. En otras realizaciones, la 3' UTR comprende más de un sitio de unión de miR (por ejemplo, de 2 a 4 sitios de unión de miR), donde puede haber una región espaciadora (por ejemplo, de 10-100, 20-70 o 30-50 nucleótidos en longitud) entre cada sitio de unión de miR. En otra realización, la 3' UTR comprende una región espaciadora entre el extremo del sitio o los sitios de unión de miR y los nucleótidos de la cola poli A. Por ejemplo, una región espaciadora de 10-100, 20-70 o 30-50 nucleótidos de longitud puede situarse entre el extremo del sitio o los sitios de unión de miR y el comienzo de la cola poli A.

En una realización, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica un polipéptido de interés comprende un codón de inicio y el al menos un sitio de unión de microARN se ubica dentro de la 5' UTR de 1 a 100 nucleótidos antes (aguas arriba) del codón de inicio. En una realización, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de inicio y el al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes se encuentra dentro de la 5' UTR de 10 a 50 nucleótidos antes (aguas arriba) del codón de inicio. En otra realización, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de inicio y el al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes se encuentra dentro de la 5' UTR al menos 25 nucleótidos antes (aguas arriba) del codón de inicio. En otras realizaciones, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de inicio y el al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes se ubica dentro de la 5' UTR inmediatamente antes del codón de inicio, o dentro de la 5' UTR de 15 a 20 nucleótidos antes del codón de inicio o dentro de la 5' UTR de 70 a 80 nucleótidos antes del codón de inicio. En otras realizaciones, la 5' UTR comprende más de un sitio de unión de miR (por ejemplo, de 2 a 4 sitios de unión de miR), donde puede haber una región espaciadora (por ejemplo, de 10-100, 20-70 o 30-50 nucleótidos en longitud) entre cada sitio de unión de miR.

En una realización, la 3' UTR comprende más de un codón de parada, donde al menos un sitio de unión de miR está colocado aguas abajo de los codones de parada. Por ejemplo, una 3' UTR puede comprender 1, 2 o 3 codones de parada. Los ejemplos no limitantes de codones de triple parada que se pueden usar incluyen: UGAUAAUAG, UGAUAGUAA, UAAUGAUAG, UGAUAAUAA, UGAUAGUAG, UAAUGAUGA, UAAUAGUAG, UGAUGAUGA, UAAUAAUAA y UAGUAGUAG. Dentro de una 3' UTR, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 sitios de unión de miR, por ejemplo, sitios de unión de miR-142-3p, se pueden colocar inmediatamente adyacentes al o a los codones de parada o en cualquier número de nucleótidos aguas abajo del codón de parada final. Cuando la 3' UTR comprende múltiples sitios de unión de miR, estos sitios de unión se pueden colocar directamente uno al lado del otro en el constructo (es decir, uno después del otro) o, alternativamente, se pueden colocar nucleótidos espaciadores entre cada sitio de unión.

En una realización, la 3' UTR comprende tres codones de parada con un único sitio de unión de miR-142-3p ubicado aguas abajo del tercer codón de parada. Los ejemplos no limitantes de secuencias de 3' UTR que tienen tres codones de parada y un único sitio de unión de miR-142-3p ubicado en diferentes posiciones aguas abajo del codón de parada final se muestran en las SEQ ID NO: 31 y 48-50.

En una realización, el ARNm, comprende una 5' UTR, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés, una 3' UTR que comprende el al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes, y una región de cola 3' de nucleósidos enlazados. En varias realizaciones, la 3' UTR comprende de 1 a 4, al menos uno, dos, tres o cuatro sitios de unión de microARN para miR expresados en células inmunes, preferentemente expresados de manera abundante o preferencial en células inmunes.

En una realización, el al menos un miR expresado en células inmunes es un sitio de unión de microARN de miR-

142-3p. En una realización, el sitio de unión de microARN de miR-142-3p comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3. En una realización, la 3' UTR del ARNm que comprende el sitio de unión de microARN de miR-142-3p comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 2.

- 5 En una realización, el al menos un miR expresado en células inmunes es un sitio de unión de microARN de miR-126. En una realización, el sitio de unión de miR-126 es un sitio de unión de miR-126-3p. En una realización, el sitio de unión de microARN de miR-126-3p comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 26. En una realización, la 3' UTR del ARNm que comprende el sitio de unión de microARN de miR-126-3p comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 27.

10

- Las secuencias ejemplares no limitantes para miR a los que se pueden unir los sitios de unión de microARN de la descripción incluyen los siguientes: miR-142-3p (SEQ ID NO: 8), miR-142-5p (SEQ ID NO: 9), miR-146-3p (SEQ ID NO: 10), miR-146-5p (SEQ ID NO: 11), miR-155-3p (SEQ ID NO: 12), miR-155-5p (SEQ ID NO: 13), miR-126-3p (SEQ ID NO: 14), miR-126-5p (SEQ ID NO: 15), miR-16-3p (SEQ ID NO: 16), miR-16-5p (SEQ ID NO: 17), miR-21-3p (SEQ ID NO: 18), miR-21-5p (SEQ ID NO: 19), miR-223-3p (SEQ ID NO: 20), miR-223-5p (SEQ ID NO: 21), miR-24-3p (SEQ ID NO: 22), miR-24-5p (SEQ ID NO: 23), miR-27-3p (SEQ ID NO: 24) y miR-27-5p (SEQ ID NO: 25). Otras secuencias de miR adecuadas expresadas en células inmunes (por ejemplo, expresadas abundante o preferentemente en células inmunes) son conocidas y están disponibles en la técnica, por ejemplo, en la base de datos de microARN de la Universidad de Manchester, miRBase. Los sitios que se unen a cualquiera de los miR
- 15 20 mencionados anteriormente pueden diseñarse en base a la complementariedad de Watson-Crick con el miR, típicamente un 100 % de complementariedad con el miR, y pueden insertarse en un constructo de ARNm de la descripción, como se describe en esta invención.

- En incluso otras realizaciones más, la ventana terapéutica y/o la expresión diferencial (por ejemplo, la expresión específica de tejido) de un polipéptido de la descripción puede alterarse mediante la incorporación de un sitio de unión de miARN en un ARNm que codifica el polipéptido. Los ejemplos de tejidos en los que se sabe que el microARN regula el ARNm y, por lo tanto, la expresión de proteínas, incluyen, entre otros, hígado (por ejemplo, miR-122), músculos (por ejemplo, miR-133, miR-206 y miR-208), células endoteliales (por ejemplo, miR-17-92 y miR-126), células mieloides (por ejemplo, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27), tejido
- 25 30 adiposo (por ejemplo, let-7 y miR-30c), corazón (por ejemplo, miR-1d y miR-149), riñón (por ejemplo, miR-192, miR-194 y miR-204) y células epiteliales pulmonares (por ejemplo, let-7, miR-133 y miR-126). Por consiguiente, en diversas realizaciones, un ARNm puede comprender uno o más sitios de unión para cualquiera de los miR mencionados anteriormente, solos o en combinación, para regular así la expresión tisular de una proteína de interés codificada.

35

- Por ejemplo, un ARNm puede incluir uno o más sitios de unión de miARN que están unidos por miARN con una mayor expresión en un tipo de tejido, en comparación con otro. En otro ejemplo, un ARNm puede incluir uno o más sitios de unión de miARN que se unen mediante miARN con una expresión más baja en una célula de cáncer, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tejido de origen. Cuando está presente en una célula
- 40 cancerosa que expresa niveles bajos de dicho miARN, el polipéptido codificado por el ARNm típicamente mostrará una expresión aumentada. Si el polipéptido puede inducir apoptosis, esto puede dar como resultado la muerte celular preferencial de las células cancerosas en comparación con las células normales.

- Por ejemplo, las células de cáncer de hígado (por ejemplo, las células de carcinoma hepatocelular) típicamente expresan niveles bajos de miR-122 en comparación con las células de hígado normales. Por lo tanto, un ARNm que codifica un polipéptido que incluye al menos un sitio de unión de miR-122 (por ejemplo, en la 3' UTR del ARNm) típicamente expresará niveles comparativamente bajos del polipéptido en células hepáticas normales y niveles comparativamente altos del polipéptido en células de cáncer de hígado. Si el polipéptido es capaz de inducir una apoptosis, esto puede provocar la muerte preferencial de las células de cáncer de hígado (por ejemplo, las células de carcinoma hepatocelular), en comparación con las células hepáticas normales.
- 45 50

- En consecuencia, como un ejemplo no limitante de incorporación de un sitio o sitios de unión de miR en un ARNm para modular la expresión de tejido de una proteína de interés codificada, los ARNm de la descripción pueden incluir al menos un sitio de unión de miR-122. Por ejemplo, un ARNm de la descripción puede incluir un sitio de unión de
- 55 miR-122 que incluye una secuencia con complementariedad parcial o completa con una secuencia semilla de miR-122. En algunas realizaciones, una secuencia semilla de miR-122 puede corresponder a los nucleótidos 2-7 de un miR-122. En algunas realizaciones, una secuencia semilla de miR-122 puede ser 5'-GGAGUG-3'. En algunas realizaciones, una secuencia semilla de miR-122 puede ser la de los nucleótidos 2-8 de miR-122. En algunas realizaciones, una secuencia semilla de miR-122 puede ser 5'-GGAGUGU-3'. En algunas realizaciones, el sitio de
- 60 unión de miR-122 incluye una secuencia de nucleótidos de 5' - UAUUUAGUGUGAUAAUGGCGUU - 3' (SEQ ID NO:

45) o 5' - CAAACACCAUUGUCACACUCCA - 3' (SEQ ID NO: 46) o un complemento de la misma. En algunas realizaciones, la inclusión de al menos un sitio de unión de miR-122 en un ARNm puede amortiguar la expresión de un polipéptido codificado por el ARNm en una célula hepática normal en comparación con otros tipos de células que expresan niveles bajos de miR-122. En otras realizaciones, la inclusión de al menos un sitio de unión de miR-122 en un ARNm puede permitir el incremento de la expresión de un polipéptido codificado por el ARNm en una célula de cáncer de hígado (por ejemplo, una célula de carcinoma hepatocelular) en comparación con una célula hepática normal.

En incluso otra realización, el ARNm (por ejemplo, la 3' UTR del mismo) puede comprender al menos un sitio de unión de miR para un miR expresado en células inmunes, para reducir o inhibir así la activación inmunitaria (por ejemplo, la activación de células B, la producción de citoquinas, las respuestas de ADA) tras la administración de ácido nucleico *in vivo*, y puede comprender al menos un sitio de unión de miR para modular la expresión de tejido de una proteína de interés codificada. Por ejemplo, en una realización, el ARNm comprende un sitio de unión de miR-122, para permitir así una mayor expresión de un polipéptido codificado por el ARNm en una célula de cáncer de hígado (por ejemplo, una célula de carcinoma hepatocelular) en comparación con una célula de hígado normal, y también comprende uno o más sitios de unión de miR para un miR expresado en células inmunes, por ejemplo, seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-142, miR-146, miR-155, miR-126, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27.

En otra realización, el ARNm (por ejemplo, la 3' UTR del mismo) puede comprender al menos un sitio de unión de miR para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada, por ejemplo, reduciendo o inhibiendo la producción de IgM, por ejemplo contra PEG, mediante las células B y/o reduciendo o inhibiendo la proliferación y/o activación de pDC, y puede comprender al menos un sitio de unión de miR para modular la expresión de tejido de una proteína de interés codificada. Por ejemplo, en una realización, el ARNm comprende un sitio de unión de miR-122, para permitir así una mayor expresión de un polipéptido codificado por el ARNm en una célula de cáncer de hígado (por ejemplo, una célula de carcinoma hepatocelular) en comparación con una célula de hígado normal, y también comprende uno o más sitios de unión de miR, por ejemplo, seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-142, miR-146, miR-155, miR-126, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24, miR-27.

En una realización, el constructo de ARNm comprende un sitio de unión de miR-122 y un sitio de unión de miR-142-3p. En otras realizaciones, el ARNm comprende un sitio de unión de miR-122 y un sitio de unión de miR-142-5p. En algunas realizaciones, el constructo de ARNm comprende un sitio de unión de miR-122 y un sitio de unión de miR-126-3p. En otra realización, el ARNm comprende un sitio de unión de miR-122 y un sitio de unión de miR-155-5p. En algunas realizaciones, el constructo de ARNm comprende un sitio de unión de miR-122 y un sitio de unión de miR-126-3p. En otra realización, el ARNm comprende un sitio de unión de miR-122, un sitio de unión de miR-142 (miR-142-3p o 142-5p) y un sitio de unión de miR-126 (miR-126-3p o miR-126-5p). En otra realización, el ARNm comprende un sitio de unión de miR-122, un sitio de unión de miR-142 (miR-142-3p o 142-5p) y un sitio de unión de miR-155 (miR-155-3p o miR-155-5p). En otra realización, el ARNm comprende un sitio de unión de miR-122, un sitio de unión de miR-126 (miR-126-3p o 126-5p) y un sitio de unión de miR-155 (miR-155-3p o miR-155-5p). En incluso otra realización, el ARNm comprende un sitio de unión de miR-122, un sitio de unión de miR-142 (miR-142-3p o miR-142-5p), un sitio de unión de miR-126 (miR-126-3p o 126-5p) y un sitio de unión de miR-155 (miR-155-3p o miR-155-5p). En cualquiera de estas realizaciones, el sitio de unión de miR-122 puede ser un sitio de unión de miR-122-5p.

Un ejemplo no limitante de una secuencia de 3' UTR que comprende tanto un sitio de unión de miR-142-3p como un sitio de unión de miR-122-5p se muestra en la SEQ ID NO: 47. La estructura de la 3' UTR de la SEQ ID NO: 47 incluye tres codones de parada en su extremo 5', seguidos inmediatamente por un único sitio de unión de miR-142-3p, seguido aguas abajo por nucleótidos espaciadores y, a continuación, un solo sitio de unión de miR-122-5p. La distancia entre los sitios de unión de miR (por ejemplo, miR-142-3p y miR-122-5p) puede variar considerablemente; se han probado varios constructos diferentes con diferentes ubicaciones de los dos sitios de unión de miR y todos han sido funcionales. En ciertas realizaciones, se coloca un separador de nucleótidos entre los dos sitios de unión de miR de una longitud suficiente para permitir la unión de RISC a cada uno. En una realización, los dos sitios de unión de miR están posicionados aproximadamente a 40 bases de distancia entre sí y la longitud total de la 3' UTR es de aproximadamente 100-110 bases.

55 Proteínas de Interés

Los ARNm de la descripción pueden codificar una proteína de interés, típicamente una proteína que tiene propiedades terapéuticas para usar en un sujeto. La proteína de interés puede ser esencialmente cualquier proteína que pueda ser codificada por el ARNm. En particular, una proteína de interés puede ser una que estimula la activación de las células inmunes (por ejemplo, la activación de las células B), como provocar una respuesta de

anticuerpos antidrogas (ADA) en un sujeto y, por consiguiente, reducir o inhibir la activación de las células inmunes (por ejemplo, reducir la respuesta de ADA) en el sujeto es deseable. En varias realizaciones, la proteína de interés puede ser, por ejemplo, una proteína terapéutica, una citoquina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o una proteína de fusión. Los ejemplos no limitantes de proteínas terapéuticas incluyen, por ejemplo, factores sanguíneos (como el Factor VIII y el Factor VII), factores de complemento, el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y MUT1. Los ejemplos no limitantes de citoquinas incluyen, por ejemplo, interleucinas, interferones, quimiocinas, linfocinas y similares. Los ejemplos no limitantes de factores de crecimiento incluyen eritropoyetina, EGF, PDGF, FGF, TGF, IGF, TNF, CSF, MCSF, GMCSF y similares. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos incluyen, por ejemplo, adalimumab, infliximab, rituximab, ipilimumab, tocilizumab, canakinumab, itolizumab, tralokinumab. Los ejemplos no limitantes de proteínas de fusión incluyen, por ejemplo, etanercept, abatacept y belatacept.

En una realización, la proteína de interés es la eritropoyetina humana. En una realización, el ARNm codifica la eritropoyetina humana y comprende un sitio de unión de microARN que se une a miR-142-3p, tal como el ARNm que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. En otra realización, el ARNm codifica la eritropoyetina humana y comprende un sitio de unión de microARN que se une a miR-126, tal como el ARNm que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 28. En incluso otra realización, el ARNm codifica eritropoyetina humana y comprende un sitio de unión de microARN que une un miR-142-3p y un sitio de unión de microARN que une un miR-126 como el ARNm que tiene la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 29. En otra realización, la proteína de interés es LDLR (para su uso en la inhibición del colesterol). En otra realización, la proteína de interés es MUT1 (para su uso en el tratamiento de la acidemia metilmalónica (MMA)). En incluso otras realizaciones, la proteína de interés codificada por el ARNm es un anticuerpo terapéutico, que incluye, entre otros, los anticuerpos enumerados anteriormente.

Nanopartículas

Los ARNm de la descripción pueden formularse en nanopartículas u otros vehículos de administración, por ejemplo, para protegerlos de la degradación cuando se administran a un sujeto. Las nanopartículas ilustrativas se describen en Panyam, J. & Labhasetwar, V. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 329-347 y Peer, D. y col. (2007) Nature Nanotech. 2, 751-760. En ciertas realizaciones, un ARN, por ejemplo, ARNm, de la descripción se encapsula dentro de una nanopartícula. En realizaciones particulares, una nanopartícula es una partícula que tiene al menos una dimensión (por ejemplo, un diámetro) menor o igual a 1000 nM, menor o igual a 500 nM o menor o igual a 100 nM. En realizaciones particulares, una nanopartícula incluye un lípido. Las nanopartículas lipídicas incluyen, entre otras, liposomas y micelas. Puede estar presente cualquiera de varios lípidos, incluidos los catiónicos y/o ionizables, los aniónicos, los lípidos neutros, los lípidos anfipáticos, los PEGilados y/o los estructurales. Tales lípidos se pueden usar solos o en combinación. En realizaciones particulares, una nanopartícula lipídica comprende uno o más ARN, por ejemplo, ARNm, descritos en esta invención, por ejemplo, un ARNm que codifica un polipéptido de interés y que comprende al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes.

En algunas realizaciones, las formulaciones de nanopartículas lipídicas de los ARNm, descritos en esta invención, pueden incluir uno o más lípidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) catiónicos y/o ionizables. Dichos lípidos catiónicos incluyen, entre otros, 3-(didodecilamino)-N1,N1,4-tridodecil-1-piperazinaetanamina (KL10), N1-[2-(didodecilamino)etil]-N1,N4,N4-tridodecil-1,4-piperazinedietanamina (KL22), 14,25-ditridecil-15,18,21,24-tetraaazaoctatriacontano (KL25), 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLin-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (DLin-MC3-DMA), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), 2-({8-[(3 β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amina (Octil-CLinDMA), (2R)-2-({8-[(3 β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amina (Octil-CLinDMA (2R)), (2S)-2-({8-[(3 β)-colest-5-en-3-iloxi]octil}oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amina (Octil-CLinDMA (2S)), N,N-dioleil-N,N-cloruro de dimetilamonio ("DODAC"); N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N-cloruro de trietilamonio ("DOTMA"); N,N-distearil-N,N-bromuro de dimetilamonio ("DDAB"); N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N-cloruro de trimetilamonio ("DOTAP"); 1,2-Dioleiloxi-3-sal de cloruro de trimetilaminopropano ("DOTAP.Cl"); 3- β -(N'-(N',N'-dimetilamino)etano)-carbamoil)colesterol ("DC-Chol"), N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(esperminacarboxamido)etil)-N,N-dimetil-trifluoroacetato de amonio ("DOSPA"), dioctadecilamidoglicil carboxiespermina ("DOGS"), 1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano ("DODAP"), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina ("DODMA"), y N-(1,2-dimistiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-bromuro de hidroxietil amonio ("DMRIE"). Además, puede usarse una cantidad de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como, por ejemplo, LIPOFECTIN® (incluyendo DOTMA y DOPE, disponibles de GIBCO/BRL); y LIPOFECTAMINE® (incluyendo DOSPA y DOPE, disponible de GIBCO/BRL). KL10, KL22 y KL25 se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. No. 8.691.750. En realizaciones particulares, el lípido catiónico o ionizable es DLin-MC3-DMA o DLin-KC2-DMA.

Los lípidos aniónicos adecuados para su uso en nanopartículas lipídicas de la descripción incluyen, entre otros, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoil fosfatidiletanolamina, N-succinil fosfatidiletanolamina, N-glutarilfosfatidiletanolamina, lisilfosfatidilglicerol y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

5

Los lípidos neutros adecuados para su uso en las nanopartículas lipídicas de la descripción incluyen, entre otros, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, dihidrosfingomielina, cefalina y cerebrósidos. Los lípidos que tienen una variedad de grupos de cadena de acilo de longitud de cadena variable y grado de saturación están disponibles o pueden aislarse o sintetizarse mediante técnicas bien conocidas. Además, se pueden usar lípidos que tienen mezclas de cadenas de ácidos grasos saturados e insaturados. En algunas realizaciones, los lípidos neutros usados en la descripción son DOPE, DSPC, DPPC, POPC o cualquier fosfatidilcolina relacionada. En algunas realizaciones, el lípido neutro puede estar compuesto de esfingomielina, dihidrosfingomielina o fosfolípidos con otros grupos principales, tales como serina e inositol.

10

15 En algunas realizaciones, los lípidos anfipáticos se incluyen en nanopartículas de la descripción. Los ejemplos de lípidos anfipáticos adecuados para usar en nanopartículas de la descripción incluyen, entre otros, esfingolípidos, fosfolípidos y aminolípidos. En algunas realizaciones, se selecciona un fosfolípido de entre el grupo que consiste en 1,2-dilinoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DMPC), 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DPPC), 1,2-distearoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DSPC), 1,2-diundecanoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolina (POPC), 1,2-di-O-octadecenil-sn-glicerol-3-fosfolina (18:0 Diether PC), 1-oleoil-2-colesterolhemisuccinoyl-sn-glicerol-3-fosfolina (OChemsPC), 1-hexadecil-sn-glicerol-3-fosfolina (C16 Lyso PC), 1,2-dilinoil-sn-glicerol-3-fosfolina, 1,2-diaraquidonoil-sn-glicerol-3-fosfolina, 1,2-didocosahexanoil-sn-glicerol-3-fosfolina, 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-difitanoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (ME 16.0 PE), 1,2-distearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina, 1,2-dilinoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina, 1,2-diarachidonoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina, 1,2-didocosahexanoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sal de sodio (DOPG) y esfingomielina. Otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicosfingolípidos, diacilgliceroles, y β -aciloxiácidos, también se encuentran dentro del grupo de los lípidos anfipáticos. De manera adicional, dichos lípidos anfipáticos se pueden mezclar fácilmente con otros lípidos, los cuales incluyen triglicéridos y esteroides.

30

En algunas realizaciones, el componente lipídico de una nanopartícula de la descripción puede incluir uno o más lípidos PEGilados. Un lípido PEGilado (también conocido como un lípido PEG o un lípido modificado con PEG) es un lípido modificado con polietilenglicol. El componente lipídico puede incluir uno o más lípidos PEGilados. Se puede seleccionar un lípido PEGilado de entre el grupo no limitante que consiste en fosfatidiletanolaminas modificadas con PEG, ácidos fosfatídicos modificados con PEG, ceramidas modificadas con PEG, dialquilaminas modificadas con PEG, diacilgliceroles modificados con PEG y dialquilgliceroles modificados con PEG. Por ejemplo, un lípido PEGilado puede ser un lípido PEG-c-DOMG, PEG-DMG, PEG-DLPE, PEG-DMPE, PEG-DPPC o PEG-DSPE.

35

40 Una nanopartícula lipídica de la descripción puede incluir uno o más lípidos estructurales. Los ejemplos de lípidos estructurales no limitantes que pueden estar presentes en las nanopartículas lipídicas de la descripción incluyen colesterol, fecosterol, sitosterol, campesterol, estigmasterol, brasicasterol, ergosterol, tomatidina, tomatina, ácido ursólico o alfa-tocoferol).

40

45 En algunas realizaciones, uno o más ARNm de la descripción pueden formularse en una nanopartícula lipídica que tiene un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 900 nm, por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nm, aproximadamente 1 a aproximadamente 200 nm, aproximadamente 1 a aproximadamente 300 nm, aproximadamente 1 a aproximadamente 400 nm, aproximadamente 1 a aproximadamente 500 nm, aproximadamente 1 a aproximadamente 600 nm, aproximadamente 1 a aproximadamente 700 nm, aproximadamente 1 a 800 nm, aproximadamente 1 a aproximadamente 900 nm. En algunas realizaciones, la nanopartícula puede tener un diámetro de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 nm, aproximadamente 20 a aproximadamente 200 nm, aproximadamente 30 a aproximadamente 100 nm, o aproximadamente 40 a aproximadamente 80 nm. En algunas realizaciones, la nanopartícula puede tener un diámetro de aproximadamente 30 a aproximadamente 300 nm, aproximadamente 40 a aproximadamente 200 nm, aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nm, aproximadamente 70 a aproximadamente 110 nm, o aproximadamente 80 a aproximadamente 120 nm. En una realización, un ARNm puede formularse en una nanopartícula lipídica con un diámetro de alrededor de 10 a alrededor de 100 nm, incluyendo intervalos entre medio como, entre otros, de alrededor de 10 a alrededor de 20 nm, alrededor de 10 a alrededor de 30 nm, alrededor de 10 a alrededor de 40 nm, alrededor de 10 a alrededor de 50 nm, alrededor de 10 a alrededor de 60 nm, alrededor de 10 a alrededor de 70 nm, alrededor de 10 a alrededor de 80 nm, alrededor de 10 a alrededor de 90 nm, alrededor de 20

55

60

a alrededor de 30 nm, alrededor de 20 a alrededor de 40 nm, alrededor de 20 a alrededor de 50 nm, alrededor de 20 a alrededor de 60 nm, alrededor de 20 a alrededor de 70 nm, alrededor de 20 a alrededor de 80 nm, alrededor de 20 a alrededor de 90 nm, alrededor de 20 a alrededor de 100 nm, alrededor de 30 a alrededor de 40 nm, alrededor de 30 a alrededor de 50 nm, alrededor de 30 a alrededor de 60 nm, alrededor de 30 a alrededor de 70 nm, alrededor de 30 a alrededor de 80 nm, alrededor de 30 a alrededor de 90 nm, alrededor de 30 a alrededor de 100 nm, alrededor de 40 a alrededor de 50 nm, alrededor de 40 a alrededor de 60 nm, alrededor de 40 a alrededor de 70 nm, alrededor de 40 a alrededor de 80 nm, alrededor de 40 a alrededor de 90 nm, alrededor de 40 a alrededor de 100 nm, alrededor de 50 a alrededor de 60 nm, alrededor de 50 a alrededor de 70 nm, alrededor de 50 a alrededor de 80 nm, alrededor de 50 a alrededor de 90 nm, alrededor de 50 a alrededor de 100 nm, alrededor de 60 a alrededor de 70 nm, alrededor de 60 a alrededor de 80 nm, alrededor de 60 a alrededor de 90 nm, alrededor de 60 a alrededor de 100 nm, alrededor de 70 a alrededor de 80 nm, alrededor de 70 a alrededor de 90 nm, alrededor de 70 a alrededor de 100 nm, alrededor de 80 a alrededor de 90 nm, alrededor de 80 a alrededor de 100 nm y/o alrededor de 90 a alrededor de 100 nm. En una realización, un ARNm se puede formular en una nanopartícula lipídica con un diámetro de aproximadamente 30 a aproximadamente 300 nm, aproximadamente 40 a aproximadamente 200 nm, aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nm, aproximadamente 70 a aproximadamente 110 nm, o aproximadamente 80 a aproximadamente 120 nm, incluyendo intervalos entre medio.

En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica puede tener un diámetro mayor que 100 nm, mayor que 150 nm, mayor que 200 nm, mayor que 250 nm, mayor que 300 nm, mayor que 350 nm, mayor que 400 nm, mayor que 450 nm, mayor que 500 nm, mayor que 550 nm, mayor que 600 nm, mayor que 650 nm, mayor que 700 nm, mayor que 750 nm, mayor que 800 nm, mayor que 850 nm, mayor que 900 nm o mayor que 950 nm.

En algunas realizaciones, el tamaño de partícula de la nanopartícula lipídica puede aumentarse y/o disminuirse. El cambio en el tamaño de partícula puede ayudar a contrarrestar una reacción biológica tal como, entre otras, la inflamación, o puede aumentar el efecto biológico del ARNm, administrado a un paciente o sujeto.

En ciertas realizaciones, es deseable apuntar a una nanopartícula, por ejemplo, una nanopartícula lipídica, de la descripción usando una estructura diana que es específica para un tipo celular y/o tipo de tejido. En algunas realizaciones, una nanopartícula puede dirigirse a una célula particular, tejido, y/u órgano que usa una estructura diana. En realizaciones particulares, una nanopartícula comprende uno o más de los ARNm descritos en esta invención y una estructura diana. Las estructuras diana no limitantes ejemplares incluyen ligandos, receptores de la superficie celular, glicoproteínas, vitaminas (por ejemplo, riboflavina) y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), fragmentos Fab') o fragmentos F(ab')₂), anticuerpos de dominio único, anticuerpos de camélidos y sus fragmentos, anticuerpos humanos y sus fragmentos, anticuerpos monoclonales y anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos)). En algunas realizaciones, la estructura diana puede ser un polipéptido. La estructura diana puede incluir el polipéptido completo (por ejemplo, un péptido o proteína) o fragmentos del mismo. Una estructura diana se coloca típicamente en la superficie externa de la nanopartícula de tal manera que la estructura diana está disponible para la interacción con la diana, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Se conoce y está disponible en la técnica una variedad de restos y procedimientos de direccionamiento diferentes, incluidos los descritos, por ejemplo, en Sapra y col., Prog. Lipid Res. 42(5):439-62, 2003 y Abra y col., J. Liposome Res. 12:1-3, 2002.

En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica (por ejemplo, un liposoma) puede incluir un recubrimiento superficial de cadenas poliméricas hidrófilas, tales como cadenas de polietilenglicol (PEG) (véase, por ejemplo, Allen y col., Biochimica et Biophysica Acta 1237: 99-108, 1995; DeFrees y col., Journal of the American Chemistry Society 118: 6101-6104, 1996; Blume y col., Biochimica et Biophysica Acta 1149: 180-184, 1993; Klibanov y col., Journal of Liposome Research 2: 321-334, 1992; Patente de los EE.UU. No. 5.013.556 ; Zalipsky, Bioconjugate Chemistry 4: 296-299, 1993; Zalipsky, FEBS Letters 353: 71-74, 1994; Zalipsky, en Stealth Liposomes Capítulo 9 (Lasic y Martin, Ed.) CRC Press, Boca Raton Fla., 1995. En una estrategia, una estructura diana para dirigir la nanopartícula lipídica está vinculada al grupo de cabeza polar de lípidos que forma la nanopartícula. En otra estrategia, la estructura diana se une a los extremos distales de las cadenas de PEG que forman el recubrimiento de polímero hidrófilo (véase, por ejemplo, Klibanov y col., Journal of Liposome Research 2: 321-334, 1992; Kirpotin y col., FEBS Letters 388: 115-118, 1996).

Se pueden usar procedimientos estándares para acoplar la o las estructuras dianas. Por ejemplo, se puede usar fosfatidiletanolamina, que puede activarse para la unión de estructuras diana, o compuestos lipofílicos derivados, tales como bleomicina derivada de lípidos. Los liposomas dirigidos a anticuerpos pueden construirse usando, por ejemplo, liposomas que incorporan proteína A (véase, por ejemplo, Renneisen y col., J. Bio. Chem., 265:16337-16342, 1990 y Leonetti y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.), 87:2448-2451, 1990). Otros ejemplos de conjugación

de anticuerpos se describen en la Patente de los EE.UU. 6.027.726. Los ejemplos de estructuras diana también pueden incluir otros polipéptidos que son específicos de los componentes celulares, incluidos los antígenos asociados con neoplasmas o tumores. Los polipéptidos usados como estructuras diana pueden unirse a los liposomas mediante enlaces covalentes (véase, por ejemplo, Heath, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 5 149 Methods in Enzymology 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Otros procedimientos de direccionamiento incluyen el sistema biotina-avidina.

En algunas realizaciones, una nanopartícula lipídica de la descripción incluye un estructura diana que dirige la nanopartícula lipídica a una célula que incluye, entre otros, hepatocitos, células de colon, células epiteliales, células 10 hematopoyéticas, células epiteliales, endoteliales, células pulmonares, células óseas, células madre, células mesenquimales, células neurales, células cardíacas, adipocitos, células del músculo liso vascular, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células beta, células pituitarias, células del revestimiento sinovial, células ováricas, células testiculares, fibroblastos, células B, células T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos y células tumorales (incluidas las células tumorales primarias y las células tumorales metastásicas). En realizaciones particulares, la 15 estructura diana dirige la nanopartícula lipídica a un hepatocito. En otras realizaciones, la estructura diana dirige la nanopartícula lipídica a una célula del colon. En algunas realizaciones, la estructura diana dirige la nanopartícula lipídica a una célula de cáncer de hígado (por ejemplo, una célula de carcinoma hepatocelular) o una célula de cáncer colorrectal (por ejemplo, un tumor primario o una metástasis).

20 Composiciones farmacéuticas

La presente descripción incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un ARNm o una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) descrito(a) en esta invención, en combinación con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En realizaciones particulares, el ARNm está presente en 25 una nanopartícula, por ejemplo, una nanopartícula lipídica. En realizaciones particulares, el ARNm o la nanopartícula está presente en una composición farmacéutica. En varias realizaciones, el ARNm, presente en la composición farmacéutica, está encapsulado en una nanopartícula, por ejemplo, una nanopartícula lipídica.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir opcionalmente una o más sustancias activas adicionales, por 30 ejemplo, sustancias terapéuticamente y/o profilácticamente activas. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden ser estériles y/o estar libre de pirógenos. Es posible encontrar consideraciones generales de la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ra edición, Lippincott Williams & Wilkins, 2005. En realizaciones particulares, una composición farmacéutica comprende un ARNm y una nanopartícula lipídica, o complejos de los mismos.

35 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido o que se desarrolle posteriormente en la técnica de la farmacología. En general, tales procedimientos de preparación incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con un excipiente y/o uno o más ingredientes accesorios y, a continuación, si fuera necesario y/o deseable, dividir, formar y/o envasar del 40 producto en un conjunto de dosis única o de dosis múltiples deseado.

Las cantidades relativas del ingrediente activo, el excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica según la invención variarán conforme a la identidad, el tamaño y/o la condición del sujeto tratado y adicionalmente según la vía de administración de la composición. A modo de ejemplo, 45 la composición puede comprender entre el 0,1 y el 100 %, por ejemplo, entre el 0,5 y el 70 %, entre el 1 y el 30 %, entre el 5 y el 80 % o al menos el 80 % (p/p) de ingrediente activo. En algunas realizaciones, el agente activo es un ARNm que codifica una proteína de interés y al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes, tal como un sitio de unión de miR-142-3p.

50 Los ARNm de la descripción se pueden formular usando uno o más excipientes para: (1) aumentar la estabilidad, (2) aumentar la transfección de células; (3) permitir la liberación sostenida o demorada (por ejemplo, a partir de una formulación de depósito del mRNA); (4) alterar la biodistribución (por ejemplo, direccionar el ARNm a tejidos o tipos de células específicos); (5) aumentar la traducción de un polipéptido codificado por el ARNm *in vivo*; y/o (6) alterar el perfil de liberación de un polipéptido codificado por ARNm *in vivo*. Además de los excipientes tradicionales, tales 55 como cualquier solvente, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, los excipientes pueden incluir, entre otros, lipídeos, liposomas, nanopartículas lipídicas (por ejemplo, liposomas y micelas), polímeros, lipoplejos, nanopartículas de cápside, péptidos, proteínas, carbohidratos, células transfectadas con vacunas ARNm (por ejemplo, para su trasplante a un sujeto), hialuronidasa, miméticos de nanopartículas y 60 combinaciones de los mismos. En consecuencia, las formulaciones de la descripción pueden incluir uno o más

excipientes, cada uno en una cantidad que, en el conjunto, aumenta la estabilidad del ARNm, aumenta la transfección celular por el ARNm, aumenta la expresión de un polipéptido codificado por el ARNm y/o altera el perfil de liberación de un polipéptido codificado con ARNm. Además, los ARNm de la presente descripción pueden formularse usando nanopartículas de ácido nucleico autoensambladas.

5

En la técnica, se conocen varios excipientes para la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas para preparar la composición (véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ra edición, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006). Salvo en la medida que algún medio excipiente convencional no sea compatible con una sustancia o sus derivados, tal como en la producción de un efecto biológico no deseado o, de otro modo, en la interacción de forma nociva con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, se pretende que su uso se encuentre dentro del alcance de la presente invención. Los excipientes pueden incluir, por ejemplo: antiadherentes, antioxidantes, aglutinantes, recubrimientos, auxiliares de compresión, desintegrantes, colorantes (colores), emolientes, emulsionantes, rellenos (diluyentes), formadores de película o recubrimientos, deslizantes (potenciadores de flujo), lubricantes, conservantes, impresión, tintas, sorbentes, agentes de suspensión o dispersantes, edulcorantes y aguas de hidratación. Los excipientes ejemplares incluyen, entre otros: hidroxitolueno butilado (BHT), carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), estearato de calcio, croscarmelosa, polivinilpirrolidona reticulada, ácido cítrico, crospovidona, cisteína, etilcelulosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, lactosa, estearato de magnesio, maltitol, manitol, metionina, metilcelulosa, metilparabeno, celulosa microcristalina, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, povidona, almidón pregelatinizado, propilparabeno, palmitato de retinilo, goma laca, dióxido de silicio, carboximetilcelulosa sódica, citrato de sodio, glicolato de almidón de sodio, sorbitol, almidón (de maíz), ácido esteárico, sacarosa, talco, dióxido de titanio, vitamina A, vitamina E, vitamina C y xilitol.

En algunas realizaciones, las formulaciones descritas en esta invención pueden incluir al menos una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables que se pueden incluir en una formulación de la descripción incluyen, entre otros, sales de adición ácida, sales de metales alcalinotérreos, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales de adición ácida representativas incluyen sales de acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, benzenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroxibromuro, hidroxiclورو, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, sulfato de laurilo, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales representativas de metales alcalinos o alcalinotérreos incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como también cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos, incluyendo, entre otros, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares.

En algunas realizaciones, las formulaciones descritas en esta invención pueden contener al menos un tipo de polinucleótido. Como ejemplo no limitante, las formulaciones pueden contener 1, 2, 3, 4, 5 o más de 5 ARNm descritos en esta invención.

Las formas de dosificación líquida para administración parenteral incluyen, entre otras, emulsiones, microemulsiones, nanoemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los ingredientes activos, las formas de dosificación líquida pueden comprender diluyentes inertes que se usan comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurfurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y/o de suspensión. En determinadas realizaciones para administración parenteral, las composiciones se mezclan con agentes solubilizantes tales como CREMOPHOR®, alcoholes, aceites, aceites modificados, glicoles, polisorbatos, ciclodextrinas, polímeros y/o combinaciones de los mismos.

Es posible formular preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones estériles inyectables acuosas o suspensiones oleaginosas, según la técnica conocida, usando agentes de dispersión, agentes humectantes y/o agentes de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles pueden ser soluciones, suspensiones y/o emulsiones inyectables estériles en diluyentes y/o solventes parenteralmente aceptables no tóxicos, por ejemplo,

una solución en 1,3-butanodiol. Entre los solventes y vehículos aceptables que pueden ser empleados se encuentran agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como un solvente o medio de suspensión. A tales efectos, se puede emplear cualquier aceite no volátil insípido, inclusive mono o diglicéridos sintéticos. En la preparación de inyectables

- 5 también se pueden usar ácidos grasos como el ácido oleico. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias y/o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.
- 10 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que incluyen al menos un ARNm descrito en esta invención se administran a mamíferos (por ejemplo, humanos). Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta invención están dirigidas principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración a humanos, el experto en la materia entenderá que tales composiciones son generalmente adecuadas para la administración a cualquier otro animal, por ejemplo, a un mamífero no humano.
- 15 La modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a varios animales se entiende bien, y el farmacéutico veterinario normalmente capacitado puede diseñar y/o efectuar tal modificación con experimentación simplemente ordinaria, en su caso. Los sujetos para los cuales se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, entre otros, seres humanos y/o primates; mamíferos, incluyendo mamíferos pertinentes en
- 20 términos comerciales, tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos, perros, ratones y/o ratas; y/o aves, incluyendo aves pertinentes en términos comerciales, tales como aves de corral, pollos, patos, gansos y/o pavos. En realizaciones particulares, se proporcionan a un sujeto dos o más ARNm descritos en esta invención, por ejemplo, un primer ARNm que codifica un primer polipéptido de interés y que comprende al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes y un segundo ARNm que codifica un segundo polipéptido de
- 25 interés y que comprende al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes. En realizaciones particulares, el primero y el segundo ARNm se proporcionan al sujeto al mismo tiempo o en diferentes momentos, por ejemplo, secuencialmente. En realizaciones particulares, el primero y el segundo ARNm se proporcionan al sujeto en la misma composición o formulación farmacéutica, por ejemplo, para facilitar la absorción de ambos ARNm por las mismas células.

30

Inhibición de la activación de las células inmunes y la producción de citoquinas

Los procedimientos de la descripción permiten reducir o inhibir la activación de las células inmunes no deseadas y/o la producción de citoquinas no deseadas en un sujeto que está siendo tratado con un agente terapéutico basado en

35 ARNm, como la activación de células inmunes no deseadas y/o la producción de citoquinas que es estimulada por un polipéptido de interés (por ejemplo, un agente terapéutico) codificado por el agente terapéutico basado en ARNm, mediante la inclusión de al menos un miR-126 (por ejemplo, miR-126-3p) y/o un sitio de unión de miR-142 (por ejemplo, miR-142-3p) en el constructo de ARNm. En una realización, la activación de células inmunes es la activación de linfocitos. En una realización, la activación de células inmunes es la activación de células B. En otra

40 realización, la activación de células inmunes es la activación de células T. En incluso otras realizaciones más, la activación de células inmunes es la activación de macrófagos, la activación de células dendríticas, la activación de células NK, la activación de basófilos o la activación de eosinófilos.

- En una realización, la reducción o inhibición de la activación de células inmunes no deseadas se determina en
- 45 comparación con la administración de control de ARNm, que carece del al menos un sitio de unión de microARN miR-126 o miR-142. En diversas realizaciones, la activación de las células inmunes disminuye al menos en el 5, el 10, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 45, el 50, al menos aproximadamente el 60, el 70, el 80, del 5 al 50, del 10 al 50, del 15 al 50, del 20 al 50, del 25 al 50, de alrededor del 10 al 80, de alrededor del 10 al 70, de alrededor del 10 al 60, de alrededor del 20 al 80, de alrededor del 20 al 70, de alrededor del 20 al 60, de alrededor del 20 al 40 o
- 50 entre aproximadamente el 25 y el 75 %.

- El nivel de activación de las células inmunes puede evaluarse esencialmente mediante cualquier procedimiento establecido en la técnica para evaluar la activación de las células inmunes, como la frecuencia de una población de células inmunes activadas, típicamente evaluada mediante la detección de células que expresan marcadores de
- 55 activación de la superficie celular, o niveles de producción de una o más citoquinas indicativas de activación de células inmunes. En una realización, la activación de las células inmunes es la activación de las células B, donde el nivel de activación de las células B se determina midiendo la frecuencia de las células B activadas, como la frecuencia de las células B activadas entre la población de células B esplénicas. Los marcadores de superficie de células B indicativos de la activación de células B son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Maddalay,
- 60 R. y col. (2010) FEBS Letters 584:4883-4894). En una realización, la activación de células B se determina mediante

la frecuencia de las células B CD19⁺ CD86⁺ CD69⁺. En otra realización, la activación de las células inmunes es la activación de las células B, donde el nivel de activación de las células B se determina por la secreción de citoquinas, como por la secreción de interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o el interferón- γ (IFN- γ), por ejemplo, en el suero de sujetos tratados. En una realización, la activación de células B se determina mediante la secreción de IL-6, por ejemplo, en el suero de los sujetos tratados. En otras realizaciones, la producción de citoquinas no deseadas que se reduce o inhibe es la producción de interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o el interferón- γ (IFN- γ), por ejemplo, en el suero de sujetos tratados. En otra realización, la producción de citoquinas no deseadas que se reduce o inhibe es la producción de interleucina-6 (IL-6).

- 10 En una realización, la activación de las células inmunes es la activación de las células dendríticas plasmacitoides (pDC), donde el nivel de activación de pDC se determina midiendo la frecuencia de pDC activada, tal como la frecuencia de pDC activados entre la población de pDC esplénica. Los marcadores de superficie de pDC indicativos de activación son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Dzionek, A., y col., (2002) Hum Immunol. Vol. 63(12): 1133-48). En una realización, la activación de pDC se determina mediante la frecuencia de las células
- 15 CD11c⁺ CD70⁺ CD86⁺.

En una realización, la activación de células inmunes no deseadas y/o la producción de citoquinas no deseadas disminuye sin una disminución correspondiente en la expresión de un polipéptido de interés codificado por el ARNm. Por consiguiente, los procedimientos de la descripción permiten inhibir o reducir la activación de células

20 inmunes (por ejemplo, la activación de células B, la producción de citoquinas) en un sujeto tratado con un ARNm que codifica un polipéptido de interés que es un agente terapéutico sin afectar significativamente el nivel de expresión del agente terapéutico en el sujeto.

- Una métrica estándar que puede usarse en los procedimientos de la descripción es la medida de la proporción del nivel o la cantidad de polipéptido (proteína) codificado producido en una célula, tejido u organismo al nivel o cantidad de una o más (o un panel) de citoquinas cuya expresión se desencadena en la célula, tejido u organismo como resultado de la administración o contacto con el ARNm modificado químicamente. Dichas proporciones se denominan en esta invención como la relación Proteína: Citoquina o Relación "PC". Cuanto mayor sea la proporción de PC, más efectivo será el ARNm modificado químicamente (el polinucleótido que codifica la proteína medida). Las
- 25 proporciones de PC preferidas, por citoquina, de la presente descripción pueden ser mayores que 1, mayores que 10, mayores que 100, mayores que 1000, mayores que 10.000 o más. Se prefieren los ARNm modificados que tienen relaciones de PC más altas que un ARNm modificado de un constructo diferente o no modificado.

- La proporción de PC puede calificarse aún más por el porcentaje de modificación presente en el ARNm. Por ejemplo, con una normalización a un ARNm 100 % modificado, se puede determinar la producción de proteína como una función de la citoquina (o riesgo) o el perfil de citoquina.
- 30

- En una realización, la presente descripción proporciona un procedimiento para determinar, a través de análisis químicos, las citoquinas o el porcentaje de modificación, la eficacia relativa de cualquier ARNm modificado particular que comprende al menos un sitio de unión de miR-126 y/o un sitio de unión de miR-142 para la relación PC del ARNm modificado que incluye el sitio de unión de miR-126 y/o el sitio de unión de miR-142 para la relación de PC del mismo constructo sin el sitio de unión de miR-126 y/o el sitio de unión de miR-142.
- 40

- En una realización, el nivel de expresión de un polipéptido de interés codificado por el ARNm en el suero de un mamífero (por ejemplo, humano) puede ser de al menos 50 pg/ml como mínimo dos horas después de la administración. En otra realización, el nivel de expresión de un polipéptido de interés codificado por el ARNm en el suero de un mamífero (por ejemplo, humano) puede permanecer por encima de 50 pg/ml durante al menos 72 horas después de la administración. En otra realización, el nivel de expresión de un polipéptido de interés codificado por el ARNm en el suero de un mamífero (por ejemplo, humano) puede permanecer por encima de 60 pg/ml durante al menos 72 horas después de la administración.
- 45
- 50

Inhibición de células B1a/Inhibición de la depuración sanguínea acelerada

- El bazo se ha implicado previamente en la ABC, aunque antes no se habían entendido los mecanismos precisos responsables de la ABC. El bazo está compuesto de pulpa roja (rica en glóbulos rojos), pulpa blanca (rica en linfocitos) y la zona marginal (ubicada entre la pulpa roja y blanca y fuera del seno marginal). Los antígenos que ingresan al bazo se retienen en la zona marginal, donde se reduce el flujo sanguíneo para permitir la interacción entre los antígenos y las células efectoras inmunes (por ejemplo, las células B) (Harms y col., Infect. Immuno Vol. 64: 4220-4225, 1996). Se cree que el papel del bazo en la depuración sanguínea acelerada es significativo. Los datos de biodistribución demuestran que los compuestos o composiciones que comprenden lípidos (*por ejemplo*, la LNP)
- 55
- 60

son absorbidos por el bazo (datos no mostrados). La evaluación histológica muestra la absorción de LNP en la zona marginal rápidamente después de la dosificación (*por ejemplo*, dosificación IV). Dentro del bazo, las LNP pueden interactuar con las células B esplénicas, contribuyendo a varios elementos de la respuesta inmune a las LNP. Por ejemplo, ciertos componentes de las LNP (*por ejemplo*, los componentes de PEG) pueden interactuar con las

- 5 células B CD19 + en el bazo, lo que resulta en la unión, la internalización, la fusión de membrana y/o la activación de tales células, lo que resulta en la producción de moléculas de IgG y/o IgM específicas para los componentes de las LNP, que conducen a una depuración sanguínea acelerada, por ejemplo, en una segunda o posterior dosificación con las LNP.
- 10 Sorprendentemente, también se ha demostrado en esta invención que algunas células particulares del sistema inmune, a saber, las pDC, también contribuyen al fenómeno ABC. Se ha demostrado en esta invención que la inclusión de sitios de unión de miR (*por ejemplo*, sitios de unión de miR-126) puede conducir a la reducción de respuestas inmunes no deseadas (*por ejemplo*, ADA) contra proteínas codificadas por los ARNm encapsulados en LNP, por ejemplo, los ARNm modificados. Ahora también se ha demostrado sorprendentemente que la inclusión de
- 15 sitios de unión de miR, en particular, sitios de unión de miR-126, puede conducir a la reducción de respuestas inmunes no deseadas adicionales contra las LNP que encapsulan los ARNm. El miR-126 (*por ejemplo*, el miR-126-3p) está altamente expresado en las pDC y, de hecho, se regula hacia arriba durante la activación de las pDC. Las pDC aumentan sinérgicamente la activación de las células B en respuesta a los ácidos nucleicos y otras formas de activación *través de* la secreción de citoquinas y la activación de las células plasmáticas. Además, las pDC del "miR-
- 20 126-3p bajo" (*por ejemplo*, las pDC en las que el miR-126 ha sido desactivado o eliminado) están deterioradas en cuanto a la activación (*por ejemplo*, no pueden lanzar una respuesta inmune efectiva a los ácidos nucleicos, secretan IFN- α/β , secretan IL-6, etc.), tienen la incapacidad de migrar al bazo tras la activación y similares). Como se demuestra en esta invención, la inclusión de sitios de unión de miR-126 en ARNm da como resultado una baja activación de células B y una baja IL-6 en suero durante varias semanas de dosificación repetida de ARNm encapsulado con LNP. La expresión de proteínas se mantiene a lo largo de programas de dosificación similares. Sorprendentemente, las respuestas de IgM anti-PEG disminuyen drásticamente durante las semanas de dosis repetidas. Por consiguiente, un beneficio inesperado de la inclusión de sitios de unión de miR-126 en el ARNm, en particular, en el ARNm encapsulado en LNP, es la reducción de la ABC.
- 30 En el bazo, por ejemplo, en la zona marginal del bazo, algunas de estas células inmunes clave pueden interactuar directa o indirectamente, *por ejemplo*, como resultado de la producción de citoquinas (por ejemplo, IL-6).

Sin desear limitarse a la teoría, esta descripción proporciona evidencia de que los miR expresados en las células inmunes presentes en la zona marginal participan en la depuración sanguínea acelerada. Cuando un ARNm de la

35 descripción incluye uno o más sitios de unión de miR que se unen a uno o más miR expresados en células inmunes, el miR de interés se regula hacia abajo (por ejemplo, es antagonizado y/o degradado). La inclusión de al menos un sitio de unión de miR que se une a al menos un miR expresado en células inmunes da como resultado una producción disminuida de moléculas de IgM capaces de unir componentes lipídicos (por ejemplo, lípidos de PEG), en comparación con el ARNm sin el al menos un sitio de unión de miR. Dado el papel conocido de las moléculas de

40 IgM en la depuración sanguínea acelerada, la capacidad de un sitio de unión de miR que se une a un miR expresado en las células inmunes para inhibir o reducir la producción de moléculas de IgM, indica un papel importante de los miR expresados en las células inmunes, específicamente en el zona marginal del bazo, en la depuración sanguínea acelerada.

- 45 Los procedimientos de la descripción permiten reducir o inhibir el depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN
- 50 expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

- En otras realizaciones, la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar
- 60 al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una

LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto.

En algunas realizaciones, la depuración sanguínea acelerada se reduce o se inhibe en un sujeto al que se le han administrado dosis múltiples de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.

En otras realizaciones, la depuración sanguínea acelerada se reduce o se inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior de ARNm.

En realizaciones adicionales, la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, y donde la LNP no activa las células B y/o no induce la producción de moléculas IgM capaces de unirse a la LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

En realizaciones adicionales, la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, donde la LNP no activa las células B y/o no induce la producción de moléculas de IgM capaces de unir la LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto.

En otras realizaciones, la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en un sujeto al que se le han administrado dosis múltiples de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, y donde la LNP no activa las células B y/o no induce la producción de moléculas IgM capaces de unirse a la LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.

En algunas realizaciones, la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, y donde la LNP no activa las células B y/o no induce la producción de moléculas IgM capaces de unirse a la LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior de ARNm.

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica

(LNP), mediante la administración al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la producción de moléculas de IgM que reconocen el PEG se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

En algunas realizaciones, la producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) se reduce o inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, de modo tal que la producción de moléculas de IgM que reconocen el PEG se reduce o inhibe en el sujeto.

En algunas realizaciones, a producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) se reduce o inhibe en un sujeto al que se le han administrado múltiples dosis de un ARN mensajero (ARNm) que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la producción de moléculas de IgM que reconocen el PEG se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.

En otras realizaciones, a producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) se reduce o inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la producción de moléculas de IgM que reconocen el PEG se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior del ARNm.

En realizaciones adicionales, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la activación de las células B1a en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de células B1a se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

En algunas realizaciones, la activación de las células B1a se reduce o inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, de modo tal que la activación de las células B1a se reduce o inhibe en el sujeto.

En otras realizaciones, la activación de las células B1a se reduce o se inhibe en un sujeto al que se le han administrado dosis múltiples de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de las células B1a se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.

En algunas realizaciones, la activación de células B1a se reduce o se inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de células B1a se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior del ARNm.

- 10 En realizaciones adicionales, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la activación de las células dendríticas plasmacitoides en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

- 20 En algunas realizaciones, la activación de las células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, de modo tal que la activación de las células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en el sujeto.

- 30 En algunas realizaciones, la activación de las células dendríticas plasmacitoides se reduce o se inhibe en un sujeto al que se le han administrado dosis múltiples de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de las células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.

- 40 En algunas realizaciones, la activación de células dendríticas plasmacitoides se reduce o se inhibe en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), mediante la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior del ARNm.

- 45 En realizaciones adicionales, el ARNm que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP) no activa las células B y/o no incluye la producción de moléculas de IgM capaces de unirse a la LNP. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP) no activa las células B. En otras realizaciones, el ARNm que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP) no incluye la producción de moléculas de IgM capaces de unirse a la LNP.

- 55 En algunas realizaciones, la reducción o inhibición de la depuración sanguínea acelerada se determina en comparación con la administración de control de un ARNm modificado químicamente, que carece del al menos un sitio de unión de microARN encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP). En otras realizaciones, la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe sin una reducción o inhibición correspondiente en la expresión del polipéptido de interés codificado por el ARNm modificado químicamente.

En realizaciones adicionales, donde el intervalo entre dos dosis consecutivas es de menos de 2 semanas. En algunas realizaciones, el intervalo entre dos dosis consecutivas es de menos de 1 semana.

En algunas realizaciones, las moléculas de IgM reconocen el polietilenglicol (PEG).

Procedimientos de la invención

5 En un aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antitumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de microARN para un miR expresado en células inmunes (por ejemplo, miR-142-3p y/o miR-126-3p), y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que se reduce o inhibe una respuesta de anticuerpos antitumorales al polipéptido de interés en el sujeto. Como se describió anteriormente, en varias realizaciones, el ARNmm puede comprender, por ejemplo, dos o más, 1-4, uno, dos, tres o cuatro sitios de unión para uno o más miR expresados en células inmunes. En ciertas realizaciones, el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión para al menos dos miR diferentes expresados en células inmunes. Por ejemplo, el ARNmm puede comprender un primer sitio de unión para miR-142-3p y un segundo sitio de unión para un miR diferente expresado en una célula inmune, tal como miR-155, miR-146 (miR-146-3p y/o miR-146-5p) o miR-126. De manera alternativa, el ARNmm puede comprender un primer sitio de unión para miR-126 (por ejemplo, miR-126-3p) y un segundo sitio de unión para un miR diferente expresado en una célula inmune, tal como miR-142 (miR-142-3p y/o miR-142-5p), miR-155 o miR-146 (miR-146-3p y/o miR-146-5p). En una realización, el ARNmm comprende un primer sitio de unión para miR-142-3p y un segundo sitio de unión para miR-126.

20 En realizaciones relacionadas, el sujeto recibe o se le administra una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) que comprende el ARNmm. En realizaciones relacionadas adicionales, el sujeto recibe o se le administra una composición farmacéutica de la descripción. En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende un ARNmm que codifica un polipéptido de interés y que comprende al menos un sitio de unión de miR como se describe en esta invención, o comprende una nanopartícula que comprende el ARNmm. En realizaciones particulares, el ARNmm está presente en una nanopartícula, por ejemplo, una nanopartícula lipídica. En realizaciones particulares, el ARNmm o la nanopartícula está presente en una composición farmacéutica.

30 En una realización, el ARNmm se administra de manera intravenosa, encapsulado en una nanopartícula lipídica. En una realización, el ARNmm se administra mediante infusión una vez por semana (por ejemplo, mediante infusión intravenosa, tal como a través de una bomba). En una realización, el ARNmm se administra mediante una infusión una vez a la semana durante al menos 4 semanas.

40 En otra realización, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antitumorales después de la administración repetida de un polipéptido de interés a un sujeto, lo que comprende administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión para un miR expresado en células inmunes (por ejemplo, un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y/o un sitio de unión de microARN de miR-126),

y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis del ARNmm encapsulado en una LNP, de modo tal que la respuesta de anticuerpos antitumorales al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

45 En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antitumorales después de la administración repetida de un polipéptido de interés a un sujeto, que comprende

- (i) administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de ARNm modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, encapsulado en una LNP, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de microARN miR expresado en células inmunes (por ejemplo, un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y/o un sitio de unión de microARN de miR-126) y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas;
- (ii) detectar un nivel de anticuerpos antitumorales en una muestra de un sujeto; y
- (iii) administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis de ARNmm encapsulado en una LNP cuando el nivel de anticuerpos antitumorales en la muestra disminuye, de modo tal que una respuesta de anticuerpo antitumorales al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

Dada la capacidad de los procedimientos de la descripción para reducir o inhibir la expresión de la proteína de interés codificada por el ARNmm en el bazo del sujeto al que se administra el ARNmm, la descripción proporciona además procedimientos para reducir la toxicidad de los tratamientos basados en ARNmm. En consecuencia, en otro

aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la toxicidad relacionada con el fármaco en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión para un miR expresado en células inmunes (por ejemplo, un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y/o miR-126 microARN) y donde el ARNmm
5 comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que se reduce o inhibe la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés en el sujeto. En una realización, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés son los conteos sanguíneos reducidos (citopenia) en el sujeto. En una realización, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés es la autoinmunidad en el sujeto. En una
10 realización, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés son los efectos mediados por el complemento en el sujeto. En una realización, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés es la hematopoyesis reducida en el sujeto. En otras realizaciones, la toxicidad relacionada con el fármaco puede ser, por ejemplo, toxicidad renal o hepática.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para reducir o inhibir la activación de las células
15 inmunes no deseadas en un sujeto al que se le administró un ARN, por ejemplo, un ARN mensajero (ARNm), que comprende administrar al sujeto un ARN, por ejemplo, un ARNm (por ejemplo, un ARNm modificado químicamente o ARNmm), donde el ARNm, por ejemplo, ARN modificado químicamente o ARNmm, comprende al menos un sitio de unión de de miR-126 y/o de microARN miR-142, y donde el ARNm, por ejemplo, ARNm modificado químicamente o
20 ARNmm, comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de las células inmunes no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto. En otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para reducir o inhibir la producción de citoquinas no deseadas en un sujeto al que se le administró un ARN, por ejemplo, un ARN mensajero (ARNm), comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto un ARN, por ejemplo, un ARNm (por
ejemplo, un ARNm modificado químicamente o ARNmm), donde el ARNm, por ejemplo, ARNm modificado químicamente o ARNmm, comprende al menos un sitio de unión de de miR-126 y/o de microARN miR-142, y donde
25 el ARNm, por ejemplo, ARNmm modificado químicamente, comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la producción de citoquinas no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto.

Como se describió anteriormente, en varias realizaciones, el ARNm modificado químicamente (al que se hace referencia como ARNmm) puede comprender, por ejemplo, dos o más, de 1 a 4, uno, dos, tres o cuatro sitios de
30 unión para uno o más miR expresados en células inmunes. En ciertas realizaciones, el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión para al menos dos miR diferentes expresados en células inmunes. Por ejemplo, el ARNmm puede comprender un primer sitio de unión para miR-126 y un segundo sitio de unión para un miR diferente expresado en una célula inmune, tal como miR-142 (miR-142-3p y/o miR-142-5p), miR-155 o miR-146 (miR-146-3p
y/o miR-146-5p). De manera alternativa, el ARNmm puede comprender un primer sitio de unión para miR-142 (miR-
35 142-3p y/o miR-142-5p) y un segundo sitio de unión para un miR diferente expresado en una célula inmune, tal como miR-126, miR-155 o miR-146 (miR-146-3p y/o miR-146-5p). En una realización, el ARNmm comprende un primer sitio de unión para miR-142-3p y un segundo sitio de unión para miR-126.

En ciertas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un agente terapéutico), donde se
40 produce la activación de las células inmunes no deseadas en respuesta al polipéptido de interés.

En realizaciones relacionadas, el sujeto recibe o se le administra una nanopartícula (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) que comprende el ARNm, por ejemplo, ARNmm. En realizaciones relacionadas adicionales, el sujeto recibe o se le administra una composición farmacéutica de la descripción. En realizaciones particulares, la composición
45 farmacéutica comprende un ARNmm que codifica un polipéptido de interés y que comprende al menos un sitio de unión de miR como se describe en esta invención, o comprende una nanopartícula que comprende el ARNmm. En realizaciones particulares, el ARNmm está presente en una nanopartícula, por ejemplo, una nanopartícula lipídica. En realizaciones particulares, el ARNmm o la nanopartícula está presente en una composición farmacéutica.

50 En una realización, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, se administra de manera intravenosa, encapsulado en una nanopartícula lipídica. En una realización, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, se administra mediante infusión una vez por semana (por ejemplo, mediante infusión intravenosa, tal como a través de una bomba). En una realización, el ARNm, por ejemplo, ARNmm, se administra mediante una infusión una vez a la semana durante al menos 4
semanas.

55 En otra realización, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir una activación de células inmunes no deseadas (por ejemplo, la activación de células B) y/o la producción de citoquinas no deseadas en un sujeto al que se le administra un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de ARNm, por ejemplo, ARNm modificado
60 (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNm, por ejemplo, ARNmm,

comprende al menos un sitio de unión para un expresado en células inmunes, tal como un sitio de unión de de miR-126 y/o al menos un sitio de unión de microARN de miR-142,

y donde el ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto por
5 vía intravenosa una segunda dosis del ARNm, por ejemplo, ARNmm, encapsulado en una LNP, de modo tal que la activación de células inmunes no deseadas y/o la producción de citoquinas no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto.

En ciertas realizaciones, el ARNm codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un agente terapéutico), donde la
10 activación de células inmunes no deseadas y/o la producción de citoquinas no deseadas se produce en respuesta al polipéptido de interés.

En otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para reducir o inhibir la activación de células inmunes no deseadas (por ejemplo, la activación de linfocitos, la activación de células B) o la producción de citoquinas no
15 deseadas en un sujeto tras la administración repetida de un ARN mensajero (ARNm) al sujeto, comprendiendo el procedimiento:

(i) administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de un ARNm, por ejemplo, ARNm modificado químicamente (ARNmm) encapsulado en una LNP, donde el ARNm, por ejemplo, ARNmm, que comprende al
20 menos un sitio de unión de microARN miR-126 y/o miR-142, y donde el ARNm, por ejemplo, ARNmm, comprende una o más nucleobases modificadas;

(ii) detectar un nivel de activación de las células inmunes en una muestra de un sujeto; y

(iii) administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis del ARNm, por ejemplo, ARNmm, modificado químicamente encapsulado en una LNP cuando el nivel de activación de células inmunes en la muestra se
25 reduce,, de modo tal que una activación de células inmunes no deseadas o la producción de citoquinas no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto.

En ciertas realizaciones, el ARNm, por ejemplo, ARNmm codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un agente terapéutico), donde la activación de células inmunes no deseadas o la producción de citoquinas no deseadas se
30 produce en respuesta al polipéptido de interés.

Ensayos de ADA

Los ensayos de ADA (bioensayos) se pueden usar para analizar anticuerpos de unión neutralizantes (NAB) y no
35 neutralizantes (BAB). Los ensayos de NAB pueden incluir tanto ensayos basados en células, por ejemplo, ensayos de proliferación celular, ensayos de biomarcadores, ensayos de expresión génica, ensayos de informes génicos, ensayos de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y similares, así como también ensayos no basados en células, por ejemplo, ensayos competitivos de unión a ligando (CLBA), resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayo de
40 inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), electroquimioluminiscencia (ECL), por ejemplo, electroinmunoensayo de quimioluminiscencia (ECLIA), inmunoensayo fluorescente de lantánido potenciado por disociación (DELFIA®), inmunoensayos de anticuerpos antidrogas Gyros® (ADA), inmunoensayo de enzimas fluorescentes (FEIA), agregación plaquetaria inducida por ristocetina (RIPA) y similares.

En aspectos ejemplares, el régimen terapéutico puede incluir efectuar uno o más ensayos de ADA antes o durante
45 un régimen terapéutico. En realizaciones ejemplares, el ensayo ADA es un ensayo NAB. En tales casos, el bioensayo debe estar relacionado con el mecanismo de acción del producto, de lo contrario el ensayo no será informativo sobre el efecto de NAB en la farmacología clínica. En realizaciones preferidas, los NAB basados en células se presentan en el régimen terapéutico de la descripción. Si los ensayos a base de células neutralizantes no
50 son factibles o no están disponibles, los ensayos o alternativas de unión de ligandos competitivos podrían resultar adecuados. Sin embargo, cuando se usan estos, se demuestra preferentemente que los ensayos reflejan la capacidad/potencial de neutralización de una manera adecuada.

Además de medir directamente la respuesta de ADA, el nivel de activación de las células inmunes también se puede
55 evaluar como una medida de una respuesta de anticuerpos en desarrollo. El nivel de activación de las células inmunes puede evaluarse esencialmente mediante cualquier procedimiento establecido en la técnica para evaluar la activación de las células inmunes, como la frecuencia de una población de células inmunes activadas, típicamente evaluada mediante la detección de células que expresan marcadores de activación de la superficie celular, o niveles de producción de una o más citoquinas indicativas de activación de células inmunes. En una realización, la
60 activación de las células inmunes es la activación de las células B, donde el nivel de activación de las células B se

determina midiendo la frecuencia de las células B activadas, como la frecuencia de las células B activadas entre la población de células B esplénicas. Los marcadores de superficie de células B indicativos de la activación de células B son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Maddalay, R. y col. (2010) FEBS Letters 584:4883-4894).

En una realización, la activación de las células B se determina mediante la frecuencia de las células B CD19⁺ CD86⁺

- 5 CD69⁺. En otra realización, la activación de las células inmunes es la activación de las células B, donde el nivel de activación de las células B se determina por la secreción de citoquinas, como por la secreción de interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o el interferón- γ (IFN- γ), *por ejemplo*, en el suero de sujetos tratados. En una realización, la activación de células B se determina mediante la secreción de IL-6, *por ejemplo*, en el suero de los sujetos tratados. En otras realizaciones, la producción de citoquinas no deseadas que se reduce o inhibe es la
- 10 producción de interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o el interferón- γ (IFN- γ), *por ejemplo*, en el suero de sujetos tratados. En otra realización, la producción de citoquinas no deseadas que se reduce o inhibe es la producción de interleucina-6 (IL-6).

Administración de composiciones farmacéuticas

- 15 Una composición farmacéutica que incluye uno o más ARN, por ejemplo, ARNm, de la descripción puede administrarse a un sujeto por cualquier vía adecuada. En algunas realizaciones, las composiciones de la descripción se administran por una o más de una variedad de vías, que incluyen inyección parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial,
- 20 intraesternal, intratecal, intralesional o intracraneal, así como cualquier técnica de infusión adecuada), oral, trans o intradérmica, interdérmica, rectal, intravaginal, tópica (por ejemplo, en polvo, ungüentos, cremas, geles, lociones, y/o gotas), mucosas, nasales, bucales, enterales, vítreas, intratumorales, sublinguales, intranasales; por instilación intratraqueal, instilación bronquial, y/o inhalación; como un atomizador oral y/o polvo, aerosol nasal, y/o aerosol, y/o a través de un catéter de vena porta. En algunas realizaciones, una composición puede administrarse por vía
- 25 intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraarterial, intratumoral, subcutánea o por inhalación. Sin embargo, la presente descripción abarca el suministro de composiciones de la descripción por cualquier vía adecuada, teniendo en cuenta los posibles avances en las ciencias de la administración de fármacos. En general, la ruta de administración más adecuada dependerá de una variedad de factores que incluyen la naturaleza de la composición farmacéutica que incluye uno o más ARNm (por ejemplo, su estabilidad en diversos entornos corporales, como el
- 30 torrente sanguíneo y el tracto gastrointestinal), y la condición del paciente (por ejemplo, si el paciente puede tolerar vías particulares de administración). En una realización, la composición se administra parenteralmente. En otra realización, la composición se administra por vía intravenosa. En otra realización, la composición se administra intratumoralmente.

- 35 En ciertas realizaciones, las composiciones de la descripción pueden administrarse a niveles de dosificación suficientes para administrar desde aproximadamente 0,0001 a unos 10 mg/kg, desde aproximadamente 0,001 a unos 10 mg/kg, desde aproximadamente 0,005 a unos 10 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 a unos 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a unos 10 mg/kg, de aproximadamente 1 a unos 10 mg/kg, de aproximadamente 2 a unos 10 mg/kg, de aproximadamente 5 a unos 10 mg/kg, desde aproximadamente 0,0001 a unos 5 mg/kg, desde
- 40 aproximadamente 0,001 a unos 5 mg/kg, desde aproximadamente 0,005 a unos 5 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 a unos 5 mg/kg, de aproximadamente 0,1 a unos 10 mg/kg, de aproximadamente 1 a unos 5 mg/kg, de aproximadamente 2 a unos 5 mg/kg, desde aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 mg/kg, desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 mg/kg, desde aproximadamente 0,005 a aproximadamente 1 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/kg
- 45 en una dosis dada, donde una dosis de 1 mg/kg proporciona 1 mg de ARNm o nanopartícula por 1 kg de peso corporal del sujeto. En realizaciones particulares, puede administrarse una dosis de aproximadamente 0,005 mg/kg a unos 5 mg/kg de ARNm o nanopartícula de la descripción. En realizaciones particulares, puede administrarse una dosis de aproximadamente 0,002 mg/kg a unos 2 mg/kg de ARNm o nanopartícula de la descripción. En realizaciones particulares, puede administrarse una dosis de aproximadamente 0,02 mg/kg a unos 0,2 mg/kg de
- 50 ARNm o nanopartícula de la descripción.

Se puede administrar una dosis una o más veces al día, en la misma cantidad o en una cantidad diferente, para obtener un nivel deseado de ARNm, la expresión y/o el efecto (por ejemplo, un efecto terapéutico). Es posible administrar la dosis deseada tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, día por medio, cada tres días, una

55 vez a la semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. En determinadas realizaciones, es posible administrar la dosis deseada en administraciones múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones). En algunas realizaciones, se puede administrar una dosis única, por ejemplo, antes o después de un procedimiento quirúrgico o en el caso de una enfermedad, trastorno o condición aguda.

60

El nivel de dosis específico que es terapéutica o, profilácticamente efectivo o adecuado en términos de imagenología para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno en tratamiento y la gravedad del mismo; la actividad del compuesto específico que se ha empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o en forma coincidente con el compuesto específico empleado y factores similares conocidos en el campo de la medicina.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la descripción puede administrarse en combinación con otro agente, por ejemplo, otro agente terapéutico, un agente profiláctico y/o un agente de diagnóstico. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deben administrarse al mismo tiempo y/o que deben formularse para su administración conjunta, aunque estos procedimientos de administración están dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, es posible administrar en combinación una o más composiciones que incluyen uno o más ARNm diferentes. Las composiciones se pueden administrar simultáneamente con, antes o después de, uno o más de otros procedimientos terapéuticos o médicos deseados. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o en un horario determinado para ese agente. En algunas realizaciones, la presente descripción abarca el suministro de composiciones de la descripción, o las imágenes, el diagnóstico o las composiciones profilácticas de la misma en combinación con agentes que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción y/o modifican su distribución dentro del cuerpo.

Los agentes terapéuticos ejemplares que se pueden administrar en combinación con las composiciones de la descripción incluyen, entre otros, agentes citotóxicos, quimioterapéuticos y otros agentes terapéuticos. Los agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, maitansinoides, rachelmicina y análogos de los mismos. Los iones radioactivos también pueden usarse como agentes terapéuticos y pueden incluir, por ejemplo, yodo radioactivo, estroncio, fósforo, paladio, cesio, iridio, cobalto, itrio, samario y praseodimio. Otros agentes terapéuticos pueden incluir, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina y 5-fluorouracilo y decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, rachelmicina, melfalan, carmustina, lomustina, ciclofosfamida, busulfano, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) y cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina, mitramicina y antramicina) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides).

La combinación particular de terapias (productos o procedimientos terapéuticos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que se pretende alcanzar. También se apreciará que las terapias empleadas pueden alcanzar un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de la invención se puede administrar simultáneamente con otro agente antiinflamatorio), o pueden alcanzar distintos efectos (por ejemplo, el control de cualquier efecto adverso).

Otras realizaciones

Esta descripción se refiere a las siguientes realizaciones:

En algunos aspectos, la descripción se refiere a los procedimientos para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antidrogas en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un ARNm mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de miR-142-3p microARN, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que se reduce o inhibe una respuesta de anticuerpos antidrogas al polipéptido de interés en el sujeto.

En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la respuesta de anticuerpos antidrogas después de la administración repetida de un polipéptido de interés a un sujeto, que comprende administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis de ARNmm encapsulado en una LNP, de modo tal que una respuesta de anticuerpo antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

En incluso otros aspectos, la descripción se refiere a los procedimientos para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antidrogas después de la administración repetida de un polipéptido de interés a un sujeto, que comprende

- 5 (i) administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de microARN miR-142-3p
y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas;
- 10 (ii) detectar un nivel de anticuerpos antidrogas en una muestra de un sujeto; y
- (iii) administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis de ARNmm encapsulado en una LNP cuando el nivel de anticuerpos antidrogas en la muestra disminuye, de modo tal que una respuesta de anticuerpo antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

- 15 En algunos aspectos, la descripción se refiere a los procedimientos para reducir o inhibir la toxicidad relacionada con el fármaco en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de miR-142-3p microARN, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que se reduce o inhibe la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés en el sujeto.

- 20 En otros aspectos, la descripción se refiere a los procedimientos para reducir o inhibir la toxicidad relacionada con el fármaco en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de miR-126 microARN, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que se reduce o inhibe la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés en el sujeto.

- 25 En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés son los conteos sanguíneos reducidos (citopenia) en el sujeto. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés es la autoinmunidad en el sujeto. En realizaciones adicionales de los aspectos anteriores, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de
- 30 interés son los efectos mediados por el complemento en el sujeto. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la toxicidad relacionada con el fármaco para el polipéptido de interés es la hematopoyesis reducida en el sujeto. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, la toxicidad relacionada con el fármaco es la toxicidad renal o hepática.

- 35 En algunos aspectos, la descripción se refiere a los procedimientos para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antidrogas en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto un ARN mensajero modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de microARN de miR-126, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que se reduce o inhibe una respuesta de anticuerpos antidrogas al polipéptido de interés en el sujeto.

- 40 En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la respuesta de anticuerpos antidrogas después de la administración repetida de un polipéptido de interés a un sujeto, que comprende administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de
- 45 microARN de miR-126, y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis de ARNmm encapsulado en una LNP, de modo tal que una respuesta de anticuerpo antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

- 50 En incluso otros aspectos, la descripción se refiere a los procedimientos para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antidrogas después de la administración repetida de un polipéptido de interés a un sujeto, que comprende

- (i) administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado (ARNmm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNmm comprende al menos un sitio de unión de
- 55 microARN miR-126
y donde el ARNmm comprende una o más nucleobases modificadas;
- (ii) detectar un nivel de anticuerpos antidrogas en una muestra de un sujeto; y
- (iii) administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis de ARNmm encapsulado en una LNP cuando el nivel de anticuerpos antidrogas en la muestra disminuye, de modo tal que una respuesta de anticuerpo
- 60 antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de células inmunes en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente

5 que codifica el polipéptido de interés, donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de células inmunes se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

10 En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la reducción o inhibición de la activación de células inmunes no deseadas se determina en comparación con la administración de control de un ARNm modificado químicamente, que carece del al menos un sitio de unión de microARN. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, la reducción o inhibición de la activación de células inmunes no deseadas es la reducción o inhibición de la activación de linfocitos.

15 En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la reducción o inhibición de la activación de linfocitos es la reducción o inhibición de la activación de células B. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, la reducción o inhibición de la activación de células B se determina mediante la frecuencia de las células B CD19⁺ CD86⁺ CD69⁺.

20 En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la reducción o inhibición de la activación de células inmunes no deseadas provoca la reducción o inhibición de la producción de citoquinas. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la activación de las células inmunes disminuye al menos en un 10 %. En realizaciones adicionales de los aspectos anteriores, la activación de las células inmunes disminuye al menos en un 25 %. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la activación de las células inmunes disminuye al menos en un 50 %. En algunas

25 realizaciones de los aspectos anteriores, la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe sin una reducción o inhibición correspondiente en la expresión del polipéptido de interés codificado por el ARNm modificado químicamente.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de células inmunes en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés, lo que comprende administrar al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera

35 intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, de modo tal que la activación de células inmunes no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto.

En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de células inmunes no deseadas en un sujeto después de la administración repetida de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés al sujeto, que comprende

(i) administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes,

45 y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas;

(ii) detectar un nivel de activación de las células inmunes en una muestra de un sujeto; y

(iii) administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis del ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP cuando el nivel de activación de células inmunes en la muestra se reduce, de modo tal que una activación de células inmunes no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto.

50 En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la reducción o inhibición de la activación de células inmunes no deseadas es la reducción o inhibición de la activación de células B. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la reducción o inhibición de la activación de células inmunes no deseadas provoca la reducción o inhibición de la producción de citoquinas.

55 En alguno aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la producción de citoquinas en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés, el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica, donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos

60 un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado

químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la producción de citoquinas no deseadas se reduce o inhibe en el sujeto.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la reducción o inhibición de la producción de citoquinas no deseadas se determina en comparación con la administración de ARNm modificado químicamente que carece del al menos un sitio de unión de microARN para el microARN expresado en células inmunes. En otras realizaciones de los aspectos anteriores, la producción reducida o inhibida de citoquinas es la producción reducida o inhibida de interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interferón- γ (IFN- γ). En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la producción reducida o inhibida de citoquinas es la producción reducida o inhibida de interleucina-6 (IL-6).

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la activación de citoquinas disminuye al menos en un 10 %. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la producción de citoquinas disminuye al menos en un 25 %. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la producción de citoquinas disminuye al menos en un 50 %. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la producción de citoquinas se reduce o inhibe sin una reducción correspondiente en la expresión del polipéptido de interés codificado por el ARNm modificado químicamente.

En incluso otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), lo que comprende administrar al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto.

En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le han administrado dosis múltiples de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.

En incluso otros aspectos adicionales, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior del ARNm.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más

nucleobases modificadas, y donde la LNP no activa las células B y/o no induce la producción de moléculas IgM capaces de unirse a la LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

5 En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), lo que comprende administrar al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un
10 microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, donde la LNP no activa las células B y/o no induce la producción de moléculas de IgM capaces de unir la LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto.

15 En incluso otros aspectos adicionales, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le han administrado dosis múltiples de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una
20 nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, y donde la LNP no activa las células B y/o no induce la producción de moléculas IgM capaces de unirse a la LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.

25 En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la depuración sanguínea acelerada en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP),
30 donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, y donde la LNP no activa las células B y/o no induce la producción de moléculas IgM capaces de unirse a la LNP, de modo tal que la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior del ARNm.

35 En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de
40 interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la producción de moléculas de IgM que reconocen el PEG se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

45 En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), lo que comprende administrar al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de
50 unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, de modo tal que la producción de moléculas de IgM que reconocen el PEG se reduce o inhibe en el sujeto.

55 En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) en un sujeto al que se le han administrado múltiples dosis de un ARN mensajero (ARNm) que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al
60 menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm

modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la producción de moléculas de IgM que reconocen el PEG se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.

- 5 En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la producción de moléculas de IgM que reconocen el polietilenglicol (PEG) en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de
- 10 microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la producción de moléculas de IgM que reconocen el PEG se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior del ARNm.

- En incluso otros aspectos adicionales, la descripción se refiere procedimiento para reducir o inhibir la activación de las células B1a en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de
- 15 microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de células B1a se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.
- 20

- En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de las células B1a en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), lo que comprende administrar al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado
- 25 en una LNP, de modo tal que la activación de las células B1a se reduce o inhibe en el sujeto.
- 30

- En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de las células B1a en un sujeto al que se le han administrado dosis múltiples de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de las células B1a se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.
- 35

- 40 En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de las células B1a en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de las células B1a se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior del ARNm.
- 45

- 50 En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de las células dendríticas plasmacitoides en un sujeto al que se le ha administrado de manera repetida un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), el procedimiento comprende administrar al sujeto un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de
- 55 microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración repetida.

- En incluso otros aspectos adicionales, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de las células dendríticas plasmacitoides en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que
- 60

codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), lo que comprende administrar al sujeto de manera intravenosa una primera dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm modificado químicamente
 5 comprende una o más nucleobases modificadas; y administrar al sujeto de manera intravenosa una segunda dosis de un ARNm modificado químicamente encapsulado en una LNP, de modo tal que la activación de las células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en el sujeto.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de las células
 10 dendríticas plasmacitoides en un sujeto al que se le han administrado dosis múltiples de un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm
 15 modificado químicamente comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de las células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una o más dosis posteriores.

En otros aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la activación de las células
 20 dendríticas plasmacitoides en un sujeto al que se le ha administrado un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de un ARNm modificado químicamente que codifica el polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP), donde el ARNm modificado químicamente comprende al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes, y donde el ARNm
 25 comprende una o más nucleobases modificadas, de modo tal que la activación de las células dendríticas plasmacitoides se reduce o inhibe en el sujeto tras la administración de una dosis posterior del ARNm.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, el ARNm que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP) no activa las células B y/o no incluye la producción de moléculas de IgM capaces
 30 de unirse a la LNP. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, el ARNm que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP) no activa las células B. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, el ARNm que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP) no incluye la producción de moléculas de IgM capaces de unirse a la LNP.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la reducción o inhibición de la depuración sanguínea acelerada se determina en comparación con la administración de control de un ARNm modificado químicamente, que carece
 35 del al menos un sitio de unión de microARN encapsulado en una nanopartícula lipídica (LNP). En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, la depuración sanguínea acelerada se reduce o inhibe sin una reducción o inhibición correspondiente en la expresión del polipéptido de interés codificado por el ARNm modificado
 40 químicamente. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, el intervalo entre dos dosis consecutivas es de menos de 2 semanas. En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, el intervalo entre dos dosis consecutivas es de menos de 1 semana.

En algunas realizaciones de los aspectos anteriores, las moléculas de IgM reconocen el polietilenglicol (PEG).
 45

En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNm descrito en esta invención se administra por vía intravenosa encapsulado en una nanopartícula lipídica. En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNm descrito en esta invención se administra mediante una infusión semanal.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNm descrito en esta invención comprende una 5' UTR, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés, una 3' UTR que comprende el al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y una región de cola 3' de nucleósidos enlazados. En algunas realizaciones, el ARNm descrito en esta invención comprende una 5' UTR y una 3' UTR que son heterólogas a la estructura de codificación. En algunas realizaciones, el ARNm descrito en esta invención se modifica por completo.
 50 En algunas realizaciones, el ARNm descrito en esta invención se modifica por completo para una modificación química particular.
 55

En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNm descrito en esta invención comprende pseudouridina (ψ), pseudouridina (ψ) y 5-metil-citidina (m^5C), 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$) y 5-metil-citidina
 60 (m^5C), 2-tiouridina (s^2U), 2-tiouridina y 5-metil-citidina (m^5C), 5-metoxi-uridina (mo^5U), 5-metoxi-uridina (mo^5U) y 5-

metil-citidina (m^5C), 2'-O-metil uridina, 2'-O-metil uridina y 5-metil-citidina (m^5C), N6-metil-adenosina (m^6A) o N6-metil-adenosina (m^6A) y 5-metil-citidina (m^5C).

En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNmm descrito en esta invención comprende pseudouridina (ψ), N1-metilpseudouridina ($m^1\psi$), 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metilpseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina o 2'-O-metil uridina, o combinaciones de los mismos.

10 En algunas realizaciones, el ARNmm descrito en esta invención comprende 1-metil-pseudouridina ($m^1\psi$), 5-metoxi-uridina (m^5U), 5-metil-citidina (m^5C), pseudouridina (ψ), α -tio-guanosina o α -tio-adenosina, o combinaciones de los mismos.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el polipéptido de interés es una proteína terapéutica, una citoquina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o una proteína de fusión.

En cualquiera de los aspectos anteriores, la nanopartícula lipídica es un liposoma. En algunas realizaciones, la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico y/o ionizable. En algunas realizaciones, el lípido catiónico o ionizable es DLin-KC2-DMA o DLin-MC3-DMA.

20 En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión de microARN, donde al menos uno de los sitios de unión de microARN es un sitio de unión de microARN de miR-142-3p. En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNmm comprende sitio de unión de miR-142-3p y un segundo sitio de unión de microARN para un miR seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-142-5p, miR-146-3p, miR-146-5p, miR-155, miR-126, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNm modificado químicamente comprende una 5' UTR, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés, una 3' UTR que comprende el al menos un sitio de unión de microARN de y una región de cola 3' de nucleósidos enlazados.

30 En cualquiera de los aspectos anteriores, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y donde el al menos un sitio de unión de microARN se ubica dentro de la 3' UTR de 1 a 100 nucleótidos después del codón de parada. En algunas realizaciones, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y donde el al menos un sitio de unión de microARN se ubica dentro de la 3' UTR al menos 50 nucleótidos después del codón de parada.

40 En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNm modificado químicamente comprende una 5' UTR, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés, una 3' UTR que comprende el al menos un sitio de unión de microARN para un microARN expresado en células inmunes de y una región de cola 3' de nucleósidos enlazados.

45 En cualquiera de los aspectos anteriores, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y donde el al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p se ubica dentro de la 3' UTR de 30 a 50 nucleótidos después del codón de parada. En algunas realizaciones, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y donde el al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p se ubica dentro de la 3' UTR al menos 50 nucleótidos después del codón de parada.

50 En cualquiera de los aspectos anteriores, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y donde el al menos un sitio de unión de microARN de miR-126 se ubica dentro de la 3' UTR de 30 a 50 nucleótidos después del codón de parada. En algunas realizaciones, el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y donde el al menos un sitio de unión de microARN de miR-126 se ubica dentro de la 3' UTR al menos 50 nucleótidos después del codón de parada.

60 En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNmm descrito en esta invención comprende una 5' UTR, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés, una 3' UTR que comprende el al menos un sitio de unión de microARN de miR-126 y una región de cola 3' de nucleósidos enlazados.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión de microARN. En algunas realizaciones, el ARNmm comprende al menos dos sitios de unión de microARN, donde al menos uno de los sitios de unión de microARN es un sitio de unión de microARN de miR-126. En algunas realizaciones, el ARNmm comprende un sitio de unión de miR-126 y un segundo sitio de unión de microARN para un miR seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146-3p, miR-146-5p, miR-155, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27. En algunas realizaciones, el ARNm modificado químicamente comprende un sitio de unión de miR-126 y un sitio de unión de miR-142. En algunas realizaciones, el constructo de ARNmm comprende un sitio de unión de miR-126 y un sitio de unión de miR-142-3p.

- 10 En cualquiera de los aspectos anteriores, el sitio de unión de microARN es un sitio de unión de miR-142-3p. En algunas realizaciones, el sitio de unión de miR-142-3p comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el sitio de unión de microARN es un sitio de unión de microARN de miR-126. En algunas realizaciones, el sitio de unión de miR-126 comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 26.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el sitio de unión de microARN es un sitio de unión de microARN de miR-155. En algunas realizaciones, el sitio de unión de miR-155 comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 35.

20 En cualquiera de los aspectos anteriores, el sitio de unión de microARN se une al microARN expresado en células mieloides. En cualquiera de los aspectos anteriores, el sitio de unión de microARN se une a un microARN expresado en células dendríticas plasmacitoides. En cualquiera de los aspectos anteriores, el sitio de unión de microARN se une a un microARN expresado en macrófagos.

25 Definiciones

Depuración sanguínea acelerada (ABC): Tal como se usa en esta invención, la "depuración sanguínea acelerada" o "ABC" se refiere a un fenómeno donde ciertos agentes administrados exógenamente se eliminan rápidamente de la sangre en segundas y posteriores administraciones.

Administración: Tal como se usa en esta invención, "administración" se refiere a un procedimiento para administrar una composición a un sujeto o paciente. Se puede seleccionar un procedimiento de administración para dirigir la administración (por ejemplo, para administrar específicamente) a una región o sistema específico de un cuerpo. Por ejemplo, una administración puede ser parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional o intracraneal, así como cualquier técnica de infusión adecuada), oral, trans o intradérmica, interdérmica, rectal, intravaginal, tópica (por ejemplo, en polvo, ungüentos, cremas, geles, lociones, y/o gotas), mucosas, nasales, bucales, enterales, vítreas, intratumorales, sublinguales, intranasales; por instilación intratraqueal, instilación bronquial, y/o inhalación; como un atomizador oral y/o polvo, aerosol nasal, y/o aerosol, y/o a través de un catéter de vena porta.

Anticuerpo antidrogas: Tal como se usa en esta invención, el término "anticuerpo antidrogas", o "ADA", se refiere a anticuerpos generados en un sujeto contra una proteína terapéutica presente en el sujeto. Una respuesta clásica de anticuerpo antidrogas (ADA) se entiende en la técnica como resultado de la administración sistémica de una proteína terapéutica recombinante al sujeto. Además, como se usa en esta invención con respecto al tratamiento de ARNm, una respuesta de ADA está destinada a abarcar las respuestas de anticuerpos observadas en los estudios en animales descritos en esta invención, en los que se generaron anticuerpos que se unen a la proteína terapéutica codificada por el ARNm terapéutico (es decir, anticuerpos generados contra la proteína codificada por el fármaco ARNm). Dichas respuestas de anticuerpos a la proteína terapéutica codificada por el fármaco de ARNm también se denominan respuestas de anticuerpos anti-proteína (APA), cuya terminología puede usarse indistintamente en esta invención con respuestas de ADA.

Apoptosis: Tal como se usa en esta invención, "apoptosis" se refiere a una forma de muerte celular en la que una secuencia programada de eventos conduce a la muerte de una célula. Las características distintivas de la apoptosis incluyen cambios morfológicos, contracción celular, activación de caspasa, condensación nuclear y citoplasmática, y alteraciones en la topología de la membrana plasmática. En términos de bioquímica, las células apoptóticas se caracterizan por una mayor concentración de calcio intracelular, fragmentación del ADN cromosómico y expresión de nuevos componentes de la superficie celular. En realizaciones particulares, una célula que experimenta apoptosis puede sufrir permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP).

Aproximadamente, alrededor: Tal como se usa en esta invención, la expresión "aproximadamente" o "alrededor", según se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En determinadas realizaciones, la expresión "aproximadamente" o "alrededor" se refiere a un intervalo de valores que se encuentra dentro del 25, el 20, el 19, el 18, el 17, el 16, el 15, el 14, el 13, el 12, el 11, el 10, el 9, el 8, el 7, el 6, el 5, el 4, el 3, el 2, el 1 % o menos en cualquier dirección (mayor o menor) del valor de referencia indicado, a menos que se indique lo contrario, o resulte evidente lo contrario a partir del contexto (salvo que dicho número supere el 100 % de un valor posible).

10 *Anticuerpo de unión (BAB):* Tal como se usa en esta invención, un "anticuerpo de unión" o "BAB" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse, es decir, interactuar con un antígeno diana, como una proteína terapéutica. El término anticuerpo de unión está destinado a abarcar anticuerpos neutralizantes (es decir, anticuerpos que se unen al antígeno diana e inhiben la actividad funcional del antígeno) y anticuerpos no neutralizantes (es decir, anticuerpos que se unen al antígeno diana pero que no inhiben la actividad funcional del antígeno).

15 *Cáncer:* Tal como se usa en esta invención, "cáncer" es una condición que involucra un crecimiento celular anormal y/o no regulado. El término cáncer abarca los cánceres benignos y malignos. Los ejemplos de cánceres no limitantes incluyen cáncer cortical suprarrenal, cáncer avanzado, cáncer anal, anemia aplásica, cáncer de bilis, cáncer de vejiga, cáncer óseo, metástasis ósea, tumores cerebrales, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer infantil, cáncer de origen primario desconocido, enfermedad de Castleman, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, cáncer de ojo, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, tumores del estroma gastrointestinal, enfermedad trofoblástica gestacional, enfermedad de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células renales, cáncer laríngeo e hipofaríngeo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mielomonocítica crónica, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, tumor carcinóide de pulmón, linfoma de piel, mesotelioma maligno, mieloma múltiple, síndrome de mielodisplasia, cáncer de cavidad nasal y de seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pene, tumores pituitarios, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándula salival, sarcoma en tejido blando adulto, cáncer basal y cutáneo de células escamosas, melanoma, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de garganta, cáncer de timo, cáncer de tiroides, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms y cánceres secundarios causados por el tratamiento del cáncer. En realizaciones particulares, el cáncer es cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular) o cáncer colorrectal. En otras realizaciones, el cáncer es un cáncer a base de sangre o un cáncer hematopoyético.

40 *Conjugado:* Tal como se usa en esta invención, el término "conjugado", cuando se usa con respecto a dos o más restos, significa que los restos están físicamente asociados o conectados entre sí, ya sea directamente o mediante uno o más restos adicionales que sirven como agente de enlace, para formar una estructura que sea suficientemente estable para que los restos permanezcan físicamente asociados en las condiciones en que se usa la estructura, por ejemplo, condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, dos o más restos se pueden conjugar por enlace químico covalente directo. En otras realizaciones, dos o más restos se pueden conjugar por enlace iónico o enlace de hidrógeno.

45 *Contacto:* Tal como se usa en esta descripción, el término "contacto" significa establecer una conexión física entre dos o más entidades. Por ejemplo, poner en contacto una célula con un ARNm o una composición de nanopartículas lipídicas significa que se hace que la célula y el ARNm o la nanopartícula lipídica compartan una conexión física. Los procedimientos para poner en contacto las células con entidades externas tanto *in vivo* e *in vitro*, como *ex vivo* son bien conocidos en las técnicas biológicas. En realizaciones ejemplares de la descripción, la etapa de poner en contacto una célula de mamífero con una composición (por ejemplo, un ARNm aislado, nanopartícula o composición farmacéutica de la descripción) se efectúa *in vivo*. Por ejemplo, el contacto de una composición de nanopartículas lipídicas y una célula (por ejemplo, una célula de mamífero) que puede disponerse dentro de un organismo (por ejemplo, un mamífero) puede efectuarse por cualquier vía de administración adecuada (por ejemplo, administración parenteral al organismo, incluyendo la administración intravenosa, intramuscular, intradérmica y subcutánea). Para una célula presente *in vitro*, se pueden poner en contacto una composición (por ejemplo, una nanopartícula lipídica o un ARNm aislado) y una célula, por ejemplo, agregando la composición al medio de cultivo de la célula, lo que puede involucrar o resultar en una transfección. Además, mediante una composición de nanopartículas se puede hacer contacto con más de una célula.

60 *Toxicidad relacionada con el fármaco:* Tal como se usa en esta invención, el término "toxicidad relacionada con el

fármaco", o simplemente "toxicidad", se refiere a los efectos indeseables *in vivo* que pueden resultar de la expresión en un sujeto de una proteína terapéutica codificada por un ARNm, por ejemplo, como resultado de una respuesta inmune estimulada contra la proteína terapéutica codificada, como la generación de anticuerpos que se unen a (y potencialmente neutralizan) la proteína terapéutica codificada. Por consiguiente, el término "toxicidad relacionada con el fármaco" pretende abarcar los efectos adversos *in vivo* resultantes de una respuesta inmune no deseada contra la proteína terapéutica codificada, incluyendo, entre otros, efectos hematológicos (por ejemplo, la hematoxicidad), renales, autoinmunes, hepáticos y similares.

Encapsular: Tal como se usa en esta invención, el término "encapsular" significa envolver, encerrar o rodear. En algunas realizaciones, un compuesto, un polinucleótido (por ejemplo, un ARNm) u otra composición, puede estar completamente encapsulado, parcialmente encapsulado o sustancialmente encapsulado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un ARNm de la descripción puede encapsularse en una nanopartícula lipídica, por ejemplo, un liposoma.

Cantidad efectiva: Tal como se usa en esta invención, el término "cantidad efectiva" de un agente es la cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, por ejemplo, resultados clínicos y, como tal, una "cantidad efectiva" depende del contexto donde se aplica. Por ejemplo, en el contexto de la administración de un agente que trata el cáncer, una cantidad efectiva de un agente es, por ejemplo, una cantidad suficiente para lograr el tratamiento, como se define en esta invención, del cáncer, en comparación con la respuesta obtenida sin la administración del agente. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad de un agente a administrar (por ejemplo, un ácido nucleico, un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o un agente profiláctico) que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible a una infección, enfermedad, trastorno y/o condición, para tratar, mejorar los síntomas de, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de la infección, enfermedad, trastorno y/o condición.

Expresión: Tal como se usa en esta invención, la "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a uno o más de los eventos siguientes: (1) producción de una plantilla de ARN a partir de una secuencia de ADN (por ejemplo, mediante transcripción); (2) procesamiento de una transcripción de ARN (por ejemplo, mediante corte, edición, formación de extremo 5' y/o procesamiento de extremo 3'); (3) traducción de un ARN a un polipéptido o proteína; y (4) modificación postraducciona de un polipéptido o proteína.

Identidad: Tal como se usa en esta invención, el término "identidad" se refiere al vínculo general entre moléculas poliméricas, por ejemplo, entre moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo del porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido de polinucleótidos se puede efectuar, por ejemplo, alineando las dos secuencias para una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de ácido nucleico para una alineación óptima, y se pueden ignorar las secuencias no idénticas a los efectos de la comparación). En ciertas realizaciones, la extensión de una secuencia alineada a efectos comparativos es de al menos el 30, al menos el 40, al menos el 50, al menos el 60, al menos el 70, al menos el 80, al menos el 90, al menos el 95 o sustancialmente el 100 % de la extensión de la secuencia de referencia. A continuación, se comparan los nucleótidos en posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que en la posición correspondiente en la segunda secuencia, a continuación, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas que comparten las secuencias, teniendo en cuenta la cantidad de espacios y la longitud de cada espacio, que es necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede obtener usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando procedimientos tales como los que se describen en el documento Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., Ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., Ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., Ed., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., Ed., M Stockton Press, Nueva York, 1991. Por ejemplo, es posible determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), el cual se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) mediante el uso de una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse, de manera alternativa, usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP. Los procedimientos comúnmente empleados para determinar el porcentaje de identidad entre secuencias incluyen, entre otros, aquellos descritos en Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988). Las técnicas para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles

al público. Los ejemplos de software informático para determinar la homología entre dos secuencias incluyen, entre otros, el paquete de programa GCG, Devereux y col, Nucleic Acids Research, 12(1): 387, 1984, BLASTP, BLASTN, y FASTA, Altschul, S. F. y col., J. Molec. Biol., 215, 403, 1990.

- 5 *Fragmento*: Un "fragmento", como se usa en esta invención, se refiere a una porción. Por ejemplo, los fragmentos de proteínas pueden incluir polipéptidos obtenidos al digerir proteínas de longitud completa aisladas de células cultivadas u obtenidas mediante técnicas de ADN recombinante.

- Hematotoxicidad*: Tal como se usa en esta invención, el término "hematotoxicidad" se refiere a eventos toxicológicos (por ejemplo, los resultantes de la toxicidad relacionada con el fármaco) que ocurren en el sistema hematopoyético, incluyendo, entre otras, las citopenias (por ejemplo, la reticulocitopenia, la trombocitopenia, la neutropenia), la disminución de la hematopoyesis y la anemia. Aunque no se pretende que esté limitada por un mecanismo, la hematotoxicidad en un sujeto puede resultar del desarrollo de una respuesta inmune contra una proteína terapéutica codificada por un ARNm administrado al sujeto, por ejemplo, como resultado de la generación de anticuerpos contra la proteína terapéutica, y, por consiguiente, la hematotoxicidad puede ser un subconjunto de toxicidades relacionadas con fármacos.

- Heterólogo*: Tal como se usa en esta invención, "heterólogo" indica que una secuencia (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos o el polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos) normalmente no está presente en un polipéptido o polinucleótido dado. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que corresponde a un dominio o motivo de una proteína puede ser heteróloga a una segunda proteína.

- Aminoácido hidrófobo*: Tal como se usa en esta invención, un "aminoácido hidrófobo" es un aminoácido que tiene una cadena lateral no polar no cargada. Los ejemplos de aminoácidos hidrofóbicos naturales son alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), prolina (Pro), fenilalanina (Phe), metionina (Met) y triptófano (Trp).

- Aislado*: Tal como se usa en esta invención, el término "aislado" hace referencia a una sustancia o entidad que ha sido separada de al menos algunos de los componentes con los cuales estuvo asociada (ya sea naturalmente o en condiciones experimentales). Las sustancias aisladas pueden tener niveles variables de pureza en referencia a las sustancias desde las cuales han sido asociadas. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de al menos alrededor del 10, alrededor del 20, alrededor del 30, alrededor del 40, alrededor del 50, alrededor del 60, alrededor del 70, alrededor del 80, alrededor del 90 % o más de otros componentes a los cuales estuvieron inicialmente asociadas. En algunas realizaciones, los agentes aislados son más de alrededor del 80, alrededor del 85, alrededor del 90, alrededor del 91, alrededor del 92, alrededor del 93, alrededor del 94, alrededor del 95, alrededor del 96, alrededor del 97, alrededor del 98, alrededor del 99 % o más de alrededor del 99 % puros. Tal como se usa en esta invención, una sustancia es "pura" si se encuentra sustancialmente libre de otros componentes.

- Liposoma*: Tal como se usa en esta invención, por "liposoma" se entiende una estructura que incluye una membrana que contiene lípidos que encierra un interior acuoso. Los liposomas pueden tener una o más membranas lipídicas. Los liposomas incluyen liposomas de una sola capa (también conocidos en la técnica como liposomas unilamelares) y liposomas de varias capas (también conocidos en la técnica como liposomas multilamelares).

- Metástasis*: Tal como se usa en esta invención, el término "metástasis" significa el procedimiento por el cual el cáncer se propaga desde el lugar donde surgió por primera vez como un tumor primario a lugares distantes en el cuerpo. Un tumor secundario que surgió como resultado de este procedimiento puede denominarse "metástasis".

- ARNm*: Tal como se usa en esta invención, un "ARNm" se refiere a un ácido ribonucleico mensajero. Un ARNm puede ser de ocurrencia natural o no. Por ejemplo, un ARNm puede incluir componentes modificados y/o de ocurrencia natural, tales como una o más nucleobases, nucleósidos, nucleótidos o enlazadores. Un ARNm puede incluir una estructura de tapa, un nucleósido que termina la cadena, una horquilla, una secuencia poliA y/o una señal de poliadenilación. Un ARNm puede tener una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido. La traducción de un ARNm, por ejemplo, la traducción *in vivo* de un ARNm dentro de una célula de mamífero, puede producir un polipéptido. Tradicionalmente, los componentes básicos de una molécula de ARNm incluyen al menos una región de codificación, una región 5' sin traducir (5' UTR), una 3' UTR, un 5' extremo y una secuencia poliA.

- MicroARN (miARN)*: Tal como se usa en esta invención, un "microARN (miARN)" es una pequeña molécula de ARN no codificante que puede funcionar en la regulación postranscripcional de la expresión génica (por ejemplo, mediante silenciamiento de ARN, como por escisión del ARNm, desestabilización del ARNm acortando su cola poliA, y/o interfiriendo con la eficiencia de la traducción del ARNm en un polipéptido mediante un ribosoma). Un miARN maduro es típicamente de aproximadamente 22-23 nucleótidos de largo.

Sitio de unión de microARN (miARN) (miR): Tal como se usa en esta invención, un "sitio de unión de microARN (miARN) (miR)" se refiere a un sitio diana de miARN (miR) o un sitio de reconocimiento de miARN (miR), o cualquier secuencia de nucleótidos a la que un miARN (miR) se une o asocia. En algunas realizaciones, un sitio de unión de miARN (miR) representa una ubicación o región de nucleótidos de un polinucleótido (por ejemplo, un ARNm) al que se une al menos la región "semilla" de un miARN (miR). Debe entenderse que la "unión" puede seguir las reglas tradicionales de hibridación de Watson-Crick o puede reflejar cualquier asociación estable del miARN con la secuencia diana en o de manera adyacente al sitio de microARN. Cuando se hace referencia a un sitio de unión de miARN (miR), debe entenderse que una secuencia de miARN (miR) tiene complementariedad (por ejemplo, complementariedad parcial, sustancial o completa (o total)) con el miARN que se une al sitio de unión de miARN. Un sitio de unión de miARN (miR) puede ser parcialmente complementario a un miARN (miR), por ejemplo, a un miARN endógeno (miR), como es el caso cuando el miARN (miR) puede ejercer control de traducción y/o control de estabilidad de la transcripción de su ARNm correspondiente. De manera alternativa, un sitio de unión de miARN (miR) puede ser totalmente complementario (complementariedad completa) a un miARN (miR), por ejemplo, a un miARN endógeno (miR), como es el caso cuando el miARN (miR) puede ejercer control de traducción y/o control de estabilidad de la transcripción de su ARNm correspondiente. En aspectos preferidos de la descripción, un sitio de unión de miARN (miR) es totalmente complementario a un miARN (miR), por ejemplo, a un miARN endógeno (miR), y puede causar la escisión del ARNm que comprende dicho miARN (miR) en las células y/o tejidos *in vivo*, donde se expresa el miR correspondiente, por ejemplo, expresado endógenamente.

Semilla de miARN: Tal como se usa en esta invención, una región "semilla" de un miARN se refiere a una secuencia en la región de las posiciones 2-8 de un miARN maduro, que típicamente tiene una complementariedad perfecta de Watson-Crick con el sitio de unión de miARN. Una semilla de miARN puede incluir las posiciones 2-8 o 2-7 de un miARN maduro. En algunas realizaciones, una semilla de miARN puede comprender 7 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 2-8 de un miARN maduro), donde el sitio complementario de semilla en el sitio de unión de miARN correspondiente está flanqueado por una adenina (A) opuesta a la posición 1 de miARN. En algunas realizaciones, una semilla de miARN puede comprender 6 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 2-7 de un miARN maduro), donde el sitio complementario de semilla en el sitio de unión de miARN correspondiente está flanqueado por una adenina (A) opuesta a la posición 1 de miARN. Cuando se hace referencia a un sitio de unión de miARN, debe entenderse que una secuencia de semillas de miARN tiene complementariedad (por ejemplo, complementariedad parcial, sustancial o completa (o total)) con la secuencia de semillas del miARN que se une al sitio de unión de miARN.

Modificado: Tal como se usa en esta invención, "modificado" se refiere a un estado o estructura cambiada de una molécula de la descripción. Las moléculas pueden modificarse de muchas maneras, incluso química, estructural y funcionalmente. En una realización, las moléculas de ARNm de la presente descripción se modifican mediante la introducción de nucleósidos no naturales. y/o nucleótidos, por ejemplo, en lo que se refiere a los ribonucleótidos naturales A, U, G y C. Los nucleótidos no canónicos, como las estructuras de extremo, no se consideran "modificados", aunque difieren de la estructura química de los ribonucleótidos A, C, G, U.

Nanopartícula: Tal como se usa en esta invención, "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene cualquier característica estructural en una escala de menos de aproximadamente 1000 nm que muestra nuevas propiedades en comparación con una muestra a granel del mismo material. Rutinariamente, las nanopartículas tienen cualquier característica estructural en una escala de menos de aproximadamente 500 nm, menos de aproximadamente 200 nm o aproximadamente 100 nm. También de forma rutinaria, las nanopartículas tienen cualquier característica estructural en una escala de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 nm o de aproximadamente 70 a aproximadamente 120 nm. En realizaciones ejemplares, una nanopartícula es una partícula que tiene una o más dimensiones del orden de aproximadamente 1 a 1000 nm. En otras realizaciones ejemplares, una nanopartícula es una partícula que tiene una o más dimensiones del orden de aproximadamente 10 a 500 nm. En otras realizaciones ejemplares, una nanopartícula es una partícula que tiene una o más dimensiones del orden de aproximadamente 50 a 200 nm. Una nanopartícula esférica tendría un diámetro, por ejemplo, de entre aproximadamente 50 a 100 o 70 a 120 nanómetros. Una nanopartícula con mayor frecuencia se comporta como un conjunto en términos de su transporte y propiedades. Se observa que las propiedades novedosas que diferencian las nanopartículas del material a granel correspondiente generalmente se desarrollan a una escala de tamaño inferior a 1000 nm, o a un tamaño de aproximadamente 100 nm, pero las nanopartículas pueden ser de mayor tamaño, por ejemplo, para partículas que son oblongas, tubulares y similares. Aunque el tamaño de la mayoría de las moléculas encajaría en el esquema anterior, a las moléculas individuales generalmente no se hace referencia como nanopartículas.

Anticuerpo neutralizante (NAB): Tal como se usa en esta invención, un "anticuerpo neutralizante" o "NAB" hace referencia a cualquiera anticuerpo que es capaz de unirse a (es decir, interactuar con) un antígeno diana, (tal como

una proteína terapéutica) e inhibir al menos una actividad funcional del antígeno. La unión de un anticuerpo neutralizante a su antígeno diana puede causar una inhibición parcial de al menos una actividad funcional del antígeno o una inhibición completa de al menos una actividad funcional del antígeno. En ciertos casos, la unión de un anticuerpo neutralizante a su antígeno diana puede causar la inhibición parcial o completa de todas las actividades funcionales del antígeno diana.

Ácido nucleico: Tal como se usa en esta invención, la expresión "ácido nucleico" se usa en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto y/o sustancia que incluye un polímero de nucleótidos. A menudo se hace referencia a estos polímeros como polinucleótidos. Los ejemplos de ácidos nucleicos o polinucleótidos de la invención incluyen, entre otros, ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), híbridos de ADN-ARN, agentes de inducción de iARN, agentes de iARN, ARNip, ARNhc, miARN, ARN antisentido, ribocimas, ADN catalítico, ARN que induce la formación de tripe hélice, ácidos treonucleicos (ATN), ácidos glicol nucleicos (AGN), ácidos peptidonucleicos (APN), ácidos nucleicos bloqueados (LNA, inclusive LNA con una configuración β -D-ribo, α -LNA con una configuración α -L-ribo (un diastereómero de LNA), 2'-amino-LNA con una funcionalización 2'-amino y 2'-amino- α -LNA con una funcionalización 2'-amino) o híbridos de los mismos.

Paciente: Tal como se usa en esta invención, "paciente" se refiere a un sujeto que puede buscar o necesitar tratamiento, que requiere tratamiento, está recibiendo tratamiento, recibirá tratamiento o un sujeto que está bajo el cuidado de un profesional capacitado para una enfermedad o condición particular. En realizaciones particulares, un paciente es un paciente humano.

Farmacéuticamente aceptable: La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en esta invención para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, según un criterio médico sensato, son adecuados para su uso en contacto con tejidos humanos y animales sin provocar una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, con una relación beneficio/riesgo correspondiente razonable.

Excipiente farmacéuticamente aceptable: La frase "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en esta invención, se refiere a cualquier ingrediente distinto de los compuestos descritos en esta invención (por ejemplo, un vehículo capaz de suspender o disolver el compuesto activo) y que tiene las propiedades de ser sustancialmente no tóxico y no inflamatorio en un paciente. Los excipientes pueden incluir, por ejemplo: antiadherentes, antioxidantes, aglutinantes, recubrimientos, auxiliares de compresión, desintegrantes, colorantes (colores), emolientes, emulsionantes, rellenos (diluyentes), formadores de película o recubrimientos, saborizantes, fragancias, deslizantes (potenciadores de flujo), lubricantes, conservantes, impresión. tintas, sorbentes, agentes de suspensión o dispersantes, edulcorantes y aguas de hidratación. Los excipientes ejemplares incluyen, entre otros: hidroxitolueno butilado (BHT), carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), estearato de calcio, croscarmelosa, polivinilpirrolidona reticulada, ácido cítrico, crospovidona, cisteína, etilcelulosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, lactosa, estearato de magnesio, maltitol, manitol, metionina, metilcelulosa, metilparabeno, celulosa microcristalina, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, povidona, almidón pregelatinizado, propilparabeno, palmitato de retinilo, goma laca, dióxido de silicio, carboximetilcelulosa sódica, citrato de sodio, glicolato de almidón de sodio, sorbitol, almidón (de maíz), ácido esteárico, sacarosa, talco, dióxido de titanio, vitamina A, vitamina E, vitamina C y xilitol.

Sales farmacéuticamente aceptables: Tal como se usa en esta invención, "sales farmacéuticamente aceptables" hace referencia a derivados de los compuestos descritos en los que se modifica el compuesto principal al convertir un resto básico o ácido existente en su forma de sal (por ejemplo, haciendo reaccionar el grupo de base libre con un ácido orgánico adecuado). Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales de adición ácida representativas incluyen sales de acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroxibromuro, hidroxicloruro, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, sulfato de laurilo, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales representativas de metales alcalinos o alcalinotérreos incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como también cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos, incluyendo, entre otros, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente descripción incluyen las sales no tóxicas convencionales del compuesto precursor formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u

orgánicos no tóxicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente descripción se pueden sintetizar a partir del compuesto principal que contiene un resto ácido o básico mediante procedimientos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con la base o ácido adecuados en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren los medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ma ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, pág. 1418, Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl y C.G. Wermuth (ed.), Wiley-VCH, 2008 y Berge y col., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977).

- 10 *Polipéptido*: Tal como se usa en esta invención, el término "polipéptido" o "polipéptido de interés" se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos típicamente unidos por enlaces peptídicos que pueden producirse naturalmente (por ejemplo, de manera aislada o purificada) o sintéticamente.

- 15 *Sujeto*: Tal como se usa en esta invención, el término "sujeto" hace referencia a cualquier organismo al que se pueda administrar una composición según la descripción, por ejemplo, con fines experimentales, diagnósticos, profilácticos, cosméticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y humanos) y/o plantas. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente.

- 20 *Sustancialmente*: Tal como se usa en esta invención, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de mostrar una medida o grado total, o casi total, de una característica o propiedad de interés. Un experto en la materia biológica comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos en raras ocasiones, si es que ocurre, se completan y/o llegan a completarse o logran o evitan un resultado absoluto. El término "sustancialmente" se usa en esta invención, por lo tanto, para capturar la posible falta de completación inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

Que padece: Un individuo "que padece" una enfermedad, trastorno y/o condición ha sido diagnosticado y/o presenta uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno y/o condición.

- 30 *Estructura diana*: como se usa en esta invención, una "estructura diana" es un compuesto o agente que puede dirigir una nanopartícula a una célula, tejido, y/o tipo de órgano.

- Agente terapéutico*: La expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, tras ser administrado a un sujeto, tiene un efecto terapéutico, diagnóstico y/o profiláctico, y/o produce un efecto farmacológico y/o biológico deseado.

Transfección: Tal como se usa en esta invención, el término "transfección" se refiere a procedimientos para introducir una especie (por ejemplo, un polinucleótido, tal como un ARNm) en una célula.

- 40 *Tratar*: Tal como se usa en esta invención, el término "tratar" se refiere a aliviar, mejorar, inhibir, prevenir, retrasar el inicio de, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o condición, completa o parcialmente. Por ejemplo, "tratar" el cáncer puede referirse a inhibir la supervivencia, el crecimiento, y/o diseminación de un tumor. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad, trastorno y/o condición, y/o a un sujeto que muestra únicamente síntomas iniciales de la enfermedad, trastorno y/o condición, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar patologías asociadas con la enfermedad, trastorno y/o condición.

- Prevenir*: Tal como se usa en esta invención, el término "prevenir" se refiere a la inhibición parcial o total de la aparición de uno o más síntomas o características de una infección, enfermedad, trastorno y/o condición.

- 50 *Tumor*: Tal como se usa en esta invención, un "tumor" es un crecimiento anormal de tejido, ya sea benigno o maligno.

- Sin modificar*: Tal como se usa en esta invención, "sin modificar" se refiere a cualquier sustancia, compuesto o molécula antes de ser cambiado de alguna manera. Sin modificar puede, pero no siempre, referirse al tipo salvaje o la forma nativa de una biomolécula. Las moléculas pueden sufrir una serie de modificaciones mediante las cuales cada molécula modificada puede servir como la molécula de partida "no modificada" para una modificación posterior.

Equivalentes y alcance

60

Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, usando nada más que los experimentos de rutina, muchos equivalentes de realizaciones específicas según la descripción proporcionada en esta invención. No se pretende limitar el alcance de la presente invención a la descripción anterior, sino que el mismo se establece en las reivindicaciones adjuntas.

5

En las reivindicaciones, los artículos tales como "un", "uno(a)" y "el(la)" pueden significar uno o más a menos que se indique lo contrario o resulte evidente de otro modo a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran cumplidas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o de otro modo son relevantes para un producto o procedimiento

10

dado, a menos que se indique lo contrario o que sea evidente de otro modo a partir del contexto. La invención incluye realizaciones donde exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea o de otro modo es relevante para un producto o procedimiento dado. La invención incluye realizaciones donde más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o son de otro modo relevantes para un producto o procedimiento

15

dado. Cabe señalar también que la expresión "que comprende" pretende ser abarcativa y permite, aunque no exige, la inclusión de elementos o etapas adicionales. En esta invención, cuando se usa la expresión "que comprende", por consiguiente, se abarca y se describe también la expresión "que consiste en".

20

Cuando se proporcionan intervalos, se incluyen criterios de valoración. Además, se debe entender que, a menos que se indique lo contrario, o sea evidente de otro modo mediante el contexto y el entendimiento de un experto en la materia, los valores que se expresan como intervalos pueden adoptar cualquier valor o subintervalo específico dentro de los intervalos establecidos en las diferentes realizaciones de la invención, hasta una décima parte de la unidad del extremo inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25

En el caso de enunciados contradictorios de una fuente citada y de la presente solicitud, prevalecerá el enunciado de la presente solicitud.

Ejemplos

30

La invención se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no debería interpretarse que limitan el alcance de la descripción. Se entiende que los ejemplos y las realizaciones que se describen en esta invención tienen fines meramente ilustrativos y que a los expertos en la materia se les sugerirán varias modificaciones o cambios en vista de las mismas.

35

Ejemplo 1: El ARNm codificado que codifica hEPO provoca una respuesta de anticuerpo antidrogas (ADA) en primates no humanos

40

En este ejemplo, el ARNm modificado (ARNmm) que codifica la eritropoyetina humana (hEPO), pero que carece de sitios de unión de miR, se administró a macacos cinomólogos en un estudio de cuatro semanas para examinar la expresión de hEPO en los animales.

45

El ARNm que codifica hEPO se formuló en nanopartículas lipídicas MC3 (LNP), que incluyen MC3 al 50 %, DSPC al 10 %, colesterol al 38,5 %, PEG-DMG al 1,5 % y N:P -5,5. (Los valores se basan en % molar). El constructo de ARNm contenía una estructura de extremo 5' del extremo 1 (7mG(5')ppp(5')NImpNp), se modificó completamente con 5-metilcitosina y 1-metilpseudouridina y comprendió una cola poli A de 140 nucleótidos. El constructo de ARNm carecía de la presencia de sitios de unión de miR insertados. La secuencia de nucleótidos de este constructo que codifica hEPO sin ningún sitio de unión de miR insertado se muestra en la SEQ ID NO: 7 (sin mostrar la cola poliA).

50

El estudio incluyó siete grupos de animales. El grupo de control negativo fue tratado con PBS. Tres grupos de tratamiento fueron tratados con una de las tres dosis diferentes de la LNP de ARNm que codifica hEPO, a 0,02 mg/kg/dosis, 0,1 mg/kg/dosis o 0,2 mg/kg/dosis. La dosis baja se seleccionó para lograr al menos 2 veces la exposición terapéuticamente efectiva para la EPO humana, mientras que la dosis alta se seleccionó para lograr al menos 10 veces los niveles de exposición a hEPO sobre la dosis terapéuticamente efectiva. El grupo de control positivo se trató con proteína de hEPO recombinante a una dosis de 6000 U/kg. Otros dos grupos de control fueron tratados con LNP que contenía un ARNm irrelevante (forma de ARNm no transcritora) o con LNP sola. El programa de dosis fue una vez por semana durante cuatro semanas consecutivas (para un total de 5 dosis) por infusión intravenosa. Las infusiones fueron durante 60 minutos (IV) a través de bombas. El período de dosificación de cuatro semanas fue seguido por un período de evaluación de recuperación de cuatro semanas (control y dosis

60

alta solamente).

Los niveles de expresión de hEPO en los macacos se midieron por ELISA seis horas después de la infusión en cada uno de los días de tratamiento (días 1, 8, 15, 22 y 29). Los resultados se muestran en la Figura 1. Los resultados demuestran que los macacos tratados con la dosis baja de ARNm (0,02 mg/kg/dosis) mostró un nivel terapéuticamente efectivo de hEPO que se mantuvo aproximadamente al mismo nivel durante el estudio de cuatro semanas. En contraste, en los macacos tratados con dosis medias y altas de ARNm (0,1 mg/kg/dosis y 0,2 mg/kg/dosis), Los niveles de EPO disminuyeron a partir de los días 8 y 15 del estudio y permanecieron bajos durante la duración del estudio. Los recuentos de reticulocitos revelaron una reticulocitopenia persistente en los animales tratados con dosis medias y altas de ARNm (0,1 mg/kg/dosis y 0,2 mg/kg/dosis). Además, el análisis histológico reveló hematopoyesis disminuida en la médula ósea de los animales tratados con dosis medias o altas de ARNm. La reticulocitopenia y la disminución de la hematopoyesis en los animales tratados con las dosis más altas de ARNm sugirieron que una respuesta de anticuerpos antidrogas (ADA) puede haberse desarrollado con el tiempo en los animales.

Para determinar si estaba presente una respuesta de ADA contra la EPO humana, se efectuaron ELISA en el suero de los animales para detectar la presencia de anticuerpos EPO anti-humanos de macaco cinomólogo. Se recogió sangre por punción venosa femoral y se recogió suero a temperatura ambiente y se dejó coagular durante al menos 30 minutos, seguido de centrifugación durante 10 minutos en una centrifugadora refrigerada (4°C) a 2700 rpm. Se usaron procedimientos ELISA estándar para la detección de IgG EPO antihumana en el suero. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Se usó una serie de resultados de control negativo para establecer un nivel umbral, por encima del cual constituiría un resultado "positivo" en el ensayo. Los resultados de ELISA cuantitativos representativos para las muestras de control negativo, que así se usaron para establecer un nivel umbral, se muestran a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3 Resultados para el análisis de anticuerpos EPO antihumanos

Resultados de control negativo (NC)			
ID del ensayo: Duplicado	hAB Prod-01 _a A ₄₅₀ nm	hAB Prod-02 _a A ₄₅₀ nm	hAB Prod-03 A ₄₅₀ nm
1	0,345	0,440	0,364
2	0,406	0,392	0,351
3	0,360	0,412	0,353
4	0,427	0,395	0,309
5	0,391	0,390	0,325
6	0,402	0,398	0,364
7	0,397	0,377	0,368
8	0,401	0,379	0,353
9	0,392	0,429	0,326
10	0,392	0,376	0,345
11	0,412	0,375	0,358
12	0,386	0,378	0,353
Media	0,393	0,395	0,347
SD	0,022	0,022	0,018
% CV	5,6	5,5	5,2
n	12	12	12
a: Los resultados aceptados en la desviación, se refieren a las muestras de control positivo para el análisis de anticuerpos EPO antihumanos.			

Los resultados de ELISA para los siete grupos de animales diferentes usados en el estudio se muestran a continuación en la Tabla 4:

5 Tabla 4: Respuesta del anticuerpo EPO antihumano de macacos cinomólogos

Número animal	PBS	hEPO ARNmm mg/kg	de 0,02	hEPO ARNmm mg/kg	de 0,1	hEPO ARNmm mg/kg	de 0,2	hEPO recomb. 6000 U/kg	LNP vacía 0,2 mg/kg	NTX en LNP 0,2 mg/kg
1	-	-		+		+		-	-	-
2	-	-		-		+		+++	-	-
3	-	-		+		+		++	Sl. +	-
4	-	-		-		+		+++	-	-
5	-	+		+		++		++		
6	-	-		-		+		+++		
7	-					+				
8	Sl. +					++				
9	-					++				
10	-					++				
Total	1/10	1/6		3/6		10/10		5/6	1/4	0/4

Los resultados demuestran que todos los monos cinomólogos tratados con la dosis más alta de ARNmm codificador de hEPO (0,2 mg/kg/dosis), y el 50 % de los monos cinomólogos tratados con la dosis de nivel medio (0,1 mg/kg/dosis) mostró una respuesta de ADA contra la EPO humana. Este fue un hallazgo inesperado y llevó a los inventores a diseñar y probar constructos de ARNmm adicionales para intentar reducir la respuesta de ADA a la proteína codificada en primates no humanos. Los resultados de esos estudios se describen en el Ejemplo 2.

15 **Ejemplo 2: La incorporación de un sitio de unión de miR-142-3p en ARNmm inhibe una respuesta de ADA a la proteína codificada**

En este ejemplo, se preparó un constructo de ARNmm humano que codifica EPO, el cual incorporaba un sitio de unión de miR-142-3p en la 3' UTR del constructo. El constructo de ARNmm comprendía un extremo de 5' del extremo 1 (7mG(5')ppp(5')NmpNp), se modificó completamente con 5-metilcitosina y 1-metilpseudouridina y comprendió una cola poli A de aproximadamente 140 nucleótidos. Se muestra un diagrama esquemático del constructo en la Figura 2. La secuencia de nucleótidos de este ARNmm codificador de EPO humano se muestra en la SEQ ID NO: 1 (sin la cola poli A). La secuencia de nucleótidos de la 3' UTR que comprende el sitio de unión de miR-142-3p se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos del sitio de unión de miR-142-3p se muestra en la SEQ ID NO: 3. Además de la adición del sitio de unión de miR-142-3p, el constructo de ARNmm y la preparación de la LNP fueron los mismos que en el Ejemplo 1.

Los monos macacos cinomólogos fueron tratados con el constructo que comprende ARNmm que codifica hEPO con el sitio de unión de miR-142-3p en la LNP a una dosis de 0,2 mg/kg/día. Se había demostrado previamente que esta dosis provocaba una respuesta de ADA contra hEPO usando un constructo que carece del sitio de unión de miR-142-3p (véase el Ejemplo 1). Se efectuó un estudio de cuatro semanas, donde los animales fueron tratados los días 1, 8, 15, 22 y 29 como se describe en el Ejemplo 1. Las infusiones intravenosas (60 minutos) se administraron mediante un catéter permanente temporal en la vena braquial o safena.

Para examinar si una respuesta de ADA contra hEPO fue provocada en los animales, se efectuaron ELISA en el suero de los animales, como se describe en el Ejemplo 1, a fin de detectar la presencia de anticuerpos EPO antihumanos de macacos cinomólogos.

Los resultados para los cuatro animales (1301, 1302, 1303 y 1304), en cada uno de los cinco puntos de tiempo para el tratamiento a una dosis de 0,2/mg/kg, se muestran a continuación en la Tabla 5. El estado de la muestra como "negativo" o "positivo" se determinó en relación con un valor umbral establecido en función de los resultados para las muestras de control negativo, como se describe en el Ejemplo 1.

5

Tabla 5: Respuesta del anticuerpo EPO antihumano de macacos cinomólogos

ID de muestra	Punto en el tiempo	Valor promedio de A450 _{nm}	Estado (Pos./Neg.)
1301	Día 1 previo a la dosis	0,254	Negativo
	Día 8 previo a la dosis	0,255	Negativo
	Día 15 previo a la dosis	0,255	Negativo
	Día 22 previo a la dosis	0,229	Negativo
	Día 29 previo a la dosis	0,230	Negativo
1302	Día 1 previo a la dosis	0,107	Negativo
	Día 8 previo a la dosis	0,115	Negativo
	Día 15 previo a la dosis	0,174	Negativo
	Día 22 previo a la dosis	0,243	Negativo
	Día 29 previo a la dosis	0,282	Negativo
1303	Día 1 previo a la dosis	0,224	Negativo
	Día 8 previo a la dosis	0,244	Negativo
	Día 15 previo a la dosis	0,485	Positivo
	Día 22 previo a la dosis	1	Positivo
	Día 29 previo a la dosis	0,991	Positivo
1304	Día 1 previo a la dosis	0,142	Negativo
	Día 8 previo a la dosis	0,162	Negativo
	Día 15 previo a la dosis	0,189	Negativo
	Día 22 previo a la dosis	0,1287	Negativo
	Día 29 previo a la dosis	0,379	Negativo

Los resultados mostraron que solo uno de los cuatro monos tratados (1303) mostró una respuesta de ADA contra la hEPO. Por consiguiente, cuando el sitio de unión de miR-142-3p se incorporó en el constructo de ARNm que codifica la hEPO, solo el 25 % de los animales tratados con la dosis alta (0,2 mg/kg) del constructo mostró un ADA contra la proteína codificada (Tabla 5), mientras que el tratamiento con la misma dosis usando un constructo que carecía del sitio de unión de miR-142.p3 resultó en que el 100 % de los animales mostraran un ADA contra la proteína codificada (Tabla 4).

- 15 La Figura 3 muestra una comparación de los resultados de ELISA para los monos tratados con 0,2 mg/kg del constructo de ARNm que carece del sitio de unión de miR-142-3p y los resultados de ELISA para los monos tratados con 0,2 mg/kg del constructo de ARNm que contiene el sitio de unión de miR-142-3p, que muestra los niveles de anticuerpos anti-hEPO en los animales a lo largo del tiempo. Se indican los animales que mostraban una respuesta de anticuerpo antidrogas (ADA). Los resultados demuestran claramente que se observaron significativamente más respuestas de ADA en los animales tratados con el constructo que carece del sitio de unión de miR, en comparación con el constructo que contiene el sitio de unión de miR.

- 25 En un estudio de seguimiento en monos macacos cinomólogos, se observaron resultados muy similares al estudio piloto descrito anteriormente. La administración de un constructo de ARNm que codifica hEPO y carece del sitio de unión de miR-142-p3 resultó en que el 100 % de los animales mostrara un ADA contra la proteína codificada, mientras que la incorporación de un sitio de unión de miR-142-3p en el constructo resultó en que solo el 50 % de los

animales mostrara un ADA contra la proteína codificada. La incorporación de tres sitios de unión de miR-142-3p en el constructo no condujo a efectos mejorados, lo que demuestra que un solo sitio de unión de miR-142-3p fue suficiente para la reducción de ADA contra la proteína codificada.

- 5 En consecuencia, estos resultados demuestran que la incorporación de un sitio de unión de miR-142-3p en el constructo de ARNm es efectiva para reducir o eliminar una respuesta de ADA contra la proteína codificada.

Ejemplo 3: La incorporación de un sitio de unión de miR-126 o miR-142 en el ARNm inhibe la activación de las células B y la expresión de citoquinas

10

En este ejemplo, se prepararon constructos de ARNm humano que codifican EPO e incorporaron un sitio de unión de miR-142-3p o un sitio de unión de miR-126-3p, o tanto un sitio de unión de miR-142-3p como de miR-126-3p, en la 3' UTR del constructo. Los constructos de ARNm se administraron a ratones para examinar los efectos de incorporar los sitios de unión de miR en varios parámetros inmunes en los ratones.

15

Los constructos de ARNm contenían una estructura de extremo de 5' del extremo 1 (7mG(5')ppp (5')NmpNp), se modificó completamente con 5-metilcitosina y 1-metilpseudouridina y comprendían una cola poli A de 140 nucleótidos. El constructo de ARNm de control carecía de la presencia de sitios de unión de miR insertados. La secuencia de nucleótidos de este constructo de control que codifica hEPO y no tiene ningún sitio de unión de miR insertado se muestra en la SEQ ID NO: 7 (sin mostrar la cola poli A). La secuencia de nucleótidos del constructo que codifica hEPO con el sitio de unión de miR-142-3p insertado se muestra en la SEQ ID NO: 1 (sin mostrar la cola poli A). La secuencia de nucleótidos del constructo que codifica hEPO con el sitio de miR-126-3p insertado se muestra en la SEQ ID NO: 28 (sin mostrar la cola poli A). La secuencia de nucleótidos del constructo que codifica hEPO con los sitios de miR 142-3p y miR-126-3p insertado se muestra en la SEQ ID NO: 29 (sin mostrar la cola poli A). Un diagrama esquemático de constructos de ARNm ejemplares se muestra en la Figura 2. Los constructos de ARNm que codifican hEPO se formularon en nanopartículas lipídicas MC3 (LNP), incluyendo MC3 al 50 %, DSPC al 10 %, colesterol al 38,5 % y PEG-DMG al 1,5 %, N:P~5,5. (Los valores se basa en % molar).

20

25

- En un estudio inicial, se asignaron grupos de 30 ratones cada uno a los siguientes grupos de tratamiento: (i) constructo de hEpo sin ningún sitio de unión de miR; (ii) constructo de hEpo con un sitio de unión de miR-142-3p; (iii) constructo de hEpo con un sitio de unión de miR-126-3p; y (iv) constructo de hEpo con los sitios de unión de miR-142-3p y miR-126-3p. Los ARNm se administraron por vía intravenosa a ratones C57B1/6 a una dosis de 0,05mg/kg. El régimen de dosificación fue los Días 1, 8, 15, 22, 29 y 36. Para cada grupo de tratamiento, se dosificó a 5 ratones por grupo en cada día de dosis, por un total de 6 dosis. Los 25 ratones adicionales en cada grupo se dividieron en 5 subconjuntos, de modo tal que se dosificó a 5 ratones una vez en cada uno de los días de dosis 8, 15, 22, 29 y 36, por un total de una dosis por ratón.

30

35

- Después del tratamiento, se examinó a los ratones en búsqueda de: (i) la expresión de proteínas a partir del constructo de ARNm midiendo hEpo (en ng/ml), (ii) la frecuencia de células B midiendo el % de células esplénicas CD19+, y (iii) la frecuencia de células B activadas midiendo el % de células CD19+ activadas en las células esplénicas CD19+. Los resultados para estas tres lecturas se muestran en las Figuras 4A, B y C, respectivamente. Los resultados de este estudio inicial demostraron que no había una diferencia notable en la expresión de proteínas al incluir los sitios de unión de miR-142-3p o miR-126, solos o en combinación, pero hubo una disminución pequeña, aunque estadísticamente significativa en la activación de las células B, observada mediante la inclusión del sitio de unión de miR-126-3p, solo o en combinación con el sitio de unión de miR-142-3p en los constructos de ARNm.

40

45

- Para estudiar adicionalmente esta observación inicial, se efectuó un segundo conjunto de experimentos a fin de probar los constructos de ARNm a una dosis más alta (para proporcionar la mayor sensibilidad) y con un mayor número de ratones por grupo (para aumentar la confianza estadística). El régimen de dosificación fue los Días 1 y 8. Doce ratones por grupo fueron dosificados por vía intravenosa en el Día 1 con 0,2 mg/kg o 1 mg/kg de uno de los cuatro constructos de ARNm diferentes descritos anteriormente (hEpo; hEpo + miR-142-3p; hEPO + miR-126-3p; o hEpo + miR-142-3p/miR-126-3p), formulado en la LNP MC3. Seis horas después de la dosificación en el Día 1, se recogió suero para el análisis de la expresión del nivel de proteína mediante un ELISA de Epo. Además, a las seis horas después de la dosificación en el día 1, se recogieron bazo de seis de los ratones para el análisis de células B. Los seis ratones restantes por grupo se dosificaron nuevamente en el Día 8, lo cual fue seguido por la recolección de suero y recolección de bazo a las 6 horas posteriores a la dosificación para analizarlos adicionalmente.

50

55

Los resultados para la expresión de la proteína se muestran en las Figuras 5A-B (para una dosis, ya sea en 0,2 mg/kg en la Figura 5A o 1 mg/kg en la Figura 5B) y en las Figuras 6A-B (para dos dosis, a 0,2 mg/kg para la Figura

6A o 1 mg/kg para la Figura 6B). Los resultados demostraron que el nivel de expresión de la proteína de interés codificada por el constructo de ARNm no se ve significativamente afectado por la inclusión de los sitios de unión de miR (miR-142-3p, miR-126-3p o ambos) en el constructo. La expresión de proteínas se controló adicionalmente durante la semana 6 del estudio. La expresión se redujo en la semana 4 y, para la semana 5, la expresión se redujo casi al inicio (datos no mostrados). En la semana 6, casi todos los ratones en el grupo de control carecían de expresión, mientras que la inclusión del sitio o sitios de unión de miR en el constructo de ARNm (miR-142-3p, miR-126-3p o ambos) mantuvo niveles significativos de expresión (Figura 29).

Los resultados para la frecuencia de las células B y la frecuencia de las células B activadas para el tratamiento de dosis única se muestran en las Figuras 7 y 8, respectivamente. Los resultados para la frecuencia de las células B y la frecuencia de las células B activadas para el tratamiento de dos dosis se muestran en las Figuras 9 y 10, respectivamente. Estos resultados mostraron que la frecuencia general de las células B no se vio significativamente afectada por la inclusión de los miR en los constructos de ARNm, pero que la activación de las células B disminuyó ligeramente en presencia del sitio de unión de miR-142-3p y se redujo significativamente por la presencia del sitio de unión de miR-126-3p (solo o en combinación con el sitio de unión de miR-142-3p). La frecuencia de las células B y la frecuencia de las células B activadas se midieron semanalmente hasta la semana 6 del estudio y se observaron resultados similares a lo largo del curso del estudio, con frecuencias de las células B totales que no se vieron afectadas significativamente por la inclusión de los sitios de unión de miR, pero con las frecuencias de las células B activadas inhibidas por la presencia del sitio de unión de miR-142-3p o miR-126-3p solos, o ambos sitios de unión de miR en combinación.

Los resultados para la expresión de IL-6 para los ratones tratados con una dosis se muestran en las Figuras 11A-B (0,2 mg/kg para la Figura 11A y 1 mg/kg para la Figura 11B) y, para los ratones tratados con dos dosis, se muestran en las Figuras 12A-B (0,2 mg/kg para la Figura 12A y 1 mg/kg para la Figura 12B). Estos resultados demuestran que la expresión de IL-6 disminuye en presencia del sitio de unión de miR-142-3p y se reduce aún más por la presencia del sitio de unión de miR-126-3p (solo o en combinación con el sitio de unión de miR-142-3p).

La expresión de citoquinas se examinó adicionalmente midiendo los niveles de TNF- α e IFN- γ , así como también los niveles de IL-6. Los resultados para estas tres citoquinas para ratones tratados con dos dosis a 0,2 mg/kg se muestran en las Figuras 13A (IL-6), 13B (TNF- α) y 13C (IFN- γ) y, para los ratones tratados con dos dosis a 1 mg/kg, se muestran en las Figuras 14A (IL-6), 14B (TNF- α) y 14C (IFN- γ). Estos resultados demuestran que la expresión de todas las tres citoquinas (IL-6, TNF- α e IFN- γ) disminuye en presencia del sitio de unión de miR-142-3p y se reduce aún más por la presencia del sitio de unión de miR-126-3p (solo o en combinación con el sitio de unión de miR-142-3p).

La expresión de citoquinas se monitorizó adicionalmente de manera semanal hasta la semana 6 del estudio, lo que demostró que los niveles de todas las tres citoquinas en el suero, IL-6, IFN- γ y TNF- α , se inhibieron significativamente por la presencia del sitio de unión de miR-142-3p o el sitio de unión de miR-126-3p solos, o ambos sitios de unión de miR en combinación, en el constructo de ARNm.

Por consiguiente, los estudios descritos anteriormente demuestran que la incorporación en un constructo de ARNm de un sitio de unión de miR-126-3p, un sitio de unión de miR-142-3p o ambos sitios de unión de miR en combinación, da como resultado una frecuencia reducida de activación de células B y una secreción reducida de un panel de diferentes citoquinas inmunoestimulantes (IL-6, TNF- α , IFN- γ) *in vivo* en animales tratados con el constructo de ARNm, mientras que tiene un impacto mínimo en la expresión de una proteína de interés codificada por el constructo de ARNm en el animal tratado.

Ejemplo 4: Estudios adicionales que incorporan sitios de unión de miR-126 y/o de miR-142 en constructos de ARNm

En este ejemplo, se prepararon constructos de ARNm que codificaban luciferasa e incorporaban un sitio de unión de miR-142-3p o un sitio de unión de miR-126-3p, o tanto un sitio de unión de miR-142-3p como de miR-126-3p, en la 3' UTR del constructo. Los constructos de ARNm se administraron a ratones para examinar los efectos de incorporar los sitios de unión de miR en varios parámetros inmunes en los ratones. Los constructos de ARNm contenían una estructura de extremo de 5' del extremo 1 (7mG(5')ppp(5')NlmpNp), se modificó completamente con 5-metilcitosina y 1-metilpseudouridina y comprendían una cola poli A de 100 nucleótidos. El constructo de ARNm de control carecía de la presencia de sitios de unión de miR conocidos. Los constructos de ARNm que codifican luciferasa (Luc) se formularon en nanopartículas lipídicas MC3 (LNP), incluyendo MC3 en un 50 %, DSPC en un 10 %, colesterol en un 38,5 % y PEG-DMG en un 1,5 %, N:P ~5,5. (Los valores se basa en % molar).

En un estudio inicial, se asignaron grupos de 24 ratones cada uno a los siguientes grupos de tratamiento: (i) constructo de luciferasa (Luc) sin ningún sitio de unión de miR (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 30); (ii) constructo Luc con un sitio de unión de miR-142-3p (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 31); (iii) constructo Luc con un sitio de unión de miR-126-3p (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 32); y (iv) constructo Luc con los sitios de unión de miR-142-3p y de miR-126-3p (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 33). Los ARNm se administraron por vía intravenosa a ratones C57B1/6 a una dosis de 0,2 mg/kg. En cada grupo, se seleccionaron 15 ratones para dosificar los días 1, 8, 15, 22, 29 y 36, se administraron 3 ratones solo una vez el Día 22 y se administraron 3 ratones solo una vez el Día 36. De los 15 ratones seleccionados para repetir la dosificación, 5 fueron sacrificados para la recolección de bazo 6 horas después de la dosis el Día 1, 6 horas después de la dosis el Día 22 y 6 horas después de la dosis el Día 36.

Después del tratamiento, se examinó a los ratones en búsqueda de: (i) la expresión de luciferasa del constructo de ARNm midiendo la luminiscencia corporal total; (ii) la frecuencia de células B total midiendo el % de células esplénicas CD19+; (iii) la frecuencia de células B activadas midiendo el % de células CD19+ activadas en las células CD19+ esplénicas; y (iv) la producción de citoquinas (IL-6, IFN- γ , TNF- α).

Los resultados para la expresión de luciferasa se muestran en las Figuras 15A y 15B. La Figura 15A muestra los resultados después de 1 semana (1 dosis) y la Figura 15B muestra los resultados después de 2 semanas (o 2 dosis). Los niveles de Luc fueron mucho más variables que los niveles de hEPO analizados en el Ejemplo 1. Sin embargo, los resultados demostraron que el nivel de expresión de la proteína de interés (Luc) codificada por el constructo de ARNm no se ve significativamente afectado por la inclusión de los sitios de unión de miR (miR-142-3p, miR-126-3p o ambos) en el constructo. La expresión de proteínas se controló adicionalmente durante la semana 6 del estudio. La expresión de Luciferasa mostró un cambio modesto o nulo durante las 6 semanas. La Figura 30 muestra la expresión en la semana 5.

Los resultados para la frecuencia de las células B y la frecuencia de las células B activadas para el tratamiento de dos dosis se muestran en las Figuras 16 y 17, respectivamente. Los resultados mostrados son de la semana 1 (1 dosis). Estos resultados mostraron que la frecuencia general y total de las células B no se vio significativamente afectada por la inclusión de los sitios de unión de miR en los constructos de ARNm, pero que la frecuencia de las células B activadas disminuyó ligeramente en presencia del sitio de unión de miR-142-3p y se redujo significativamente por la presencia del sitio de unión de miR-126-3p (solo o en combinación con el sitio de unión de miR-142-3p). La frecuencia reducida de células B activadas no se debió a números reducidos de células CD19+ ya que (i) medimos el porcentaje de células B activadas dentro de la población total de células B, y (ii) las frecuencias de las células B no fluctuaron entre los grupos. La frecuencia de las células B y la frecuencia de las células B activadas se midieron semanalmente hasta la semana 6 del estudio y se observaron resultados similares a lo largo del curso del estudio, con frecuencias de las células B totales que no se vieron afectadas significativamente por la inclusión de los sitios de unión de miR, pero con las frecuencias de las células B activadas inhibidas por la presencia del sitio de unión de miR-142-3p o miR-126-3p solos, o ambos sitios de unión de miR en combinación.

La expresión de citoquinas se examinó midiendo los niveles de IL-6, IFN- γ y TNF- α en suero. Los resultados para estas tres citoquinas para ratones tratados con 0,2 mg/kg de ARNm se muestran en las Figuras 18A (IL-6), 18B (IFN- γ) y 18C (TNF- α). Los resultados mostrados son para la semana 2; se observaron resultados similares en la semana 1 y la semana 3. Nuevamente, se observó más variabilidad en la expresión de citoquinas en los animales tratados con Luc en comparación con los animales tratados con hEPO descritos en el Ejemplo 1. Sin embargo, estos resultados demuestran que la expresión de al menos algunas citoquinas (más marcadamente con IFN- γ y TNF- α) disminuye en presencia del sitio de unión de miR-142-3p y/o el sitio de unión de miR-126-3p, solos o en combinación. La expresión de citoquinas se monitorizó adicionalmente hasta la semana 6 del estudio, lo que demostró que los niveles de todas las tres citoquinas en el suero, IL-6, IFN- γ y TNF- α , se inhibieron significativamente por la presencia del sitio de unión de miR-142-3p o el sitio de unión de miR-126-3p solos, o ambos sitios de unión de miR en combinación, en el constructo de ARNm.

Por consiguiente, los estudios descritos anteriormente demuestran que la incorporación en un constructo de ARNm de un sitio de unión de miR-126-3p, un sitio de unión de miR-142-3p o ambos sitios de unión de miR en combinación, da como resultado una frecuencia reducida de activación de células B y una secreción reducida de un panel de diferentes citoquinas inmunoestimulantes (TNF- α , IFN- γ) *in vivo* en animales tratados con el constructo de ARNm, mientras que tiene un impacto mínimo en la expresión de una proteína de interés codificada por el constructo de ARNm en el animal tratado.

Ejemplo 5: Estudios adicionales que incorporan miR-142 y/o sitios de unión de miR-155 en constructos de ARNm

En este ejemplo, se prepararon constructos de ARNm que codifican EPO e incorporan un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-142-5p, un sitio de unión de miR-155-5p, o combinaciones de los mismos, y/o múltiples copias de los mismos, dentro de la 3' UTR del constructo. La secuencia de miR-155-5p sobre la cual se
 5 diseñó la inserción del sitio de unión es la siguiente: uuaaugcuaauugugauaggggu (SEQ ID NO: 34). El sitio de unión de miR-155-5p insertado en la 3' UTR tiene la siguiente secuencia: ACCCCTATCACAATTAGCATTA (SEQ ID NO: 35).

Los constructos de ARNm se administraron a ratones para examinar los efectos de incorporar los sitios de unión
 10 de miR en varios parámetros inmunes en los ratones. Los constructos de ARNm contenían una estructura de extremo de 5' del extremo 1 (7mG(5')ppp (5')NimpNp), se modificó completamente con 5-metilcitosina y 1-metilpseudouridina y comprendían una cola poli A de 100 nucleótidos. El constructo de ARNm de control carecía de la presencia de sitios de unión de miR insertados. Los constructos de ARNm que codifican EPO se formularon en nanopartículas lipídicas MC3 (LNP), incluyendo MC3 al 50 %, DSPC al 10 %, colesterol al 38,5 % y PEG-DMG al
 15 1,5 %, N:P~5,5. (Los valores se basa en % molar).

En este estudio, los ratones fueron asignados a uno de los siguientes grupos de tratamiento: (i) constructo de EPO sin ningún sitio de unión de miR (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 36); (ii) constructo de EPO con un sitio de unión de miR-142-3p (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 37); (iii) constructo de EPO con tres
 20 sitios de unión de miR-142-3p (EPO_3X-miR-142-3p) (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 38); (iv) constructo de EPO con un sitio de unión de miR-142-5p (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 39); (v) constructo de EPO con tres sitios de unión de miR-142-5p (EPO_3X-miR-142-5p) (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 40); (vi) constructo de EPO con dos sitios de unión de miR-142-5p y un sitio de unión de miR-142-3p (EPO_2X-miR-142-5p_1X-miR-142-3p) (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 41); (vii) constructo de EPO
 25 con un sitio de unión de miR-155-5p (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 42); (viii) constructo de EPO con tres sitios de unión de miR-155-5p (EPO_3X-miR-155) (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 43); (ix) constructo de EPO con dos sitios de unión de miR-155-5p y un sitio de unión de miR-142-3p (EPO_2X-miR-155-5p_1X-miR-142-3p) (cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 44); y (x) LNP con secuencia de control no transcriptora ("vacía"). Los ARNm se administraron por vía intravenosa a ratones C57B1/6 a una dosis de 0,2
 30 mg/kg. El régimen de dosificación fue los Días 1 y 8.

Después del tratamiento, se examinó a los ratones en búsqueda de: (i) la expresión de proteína del constructo de ARNm midiendo los niveles de EPO codificada (en ng/ml); (ii) la frecuencia de células B total midiendo el % de células esplénicas CD19⁺; (iii) la frecuencia de células B activadas midiendo el % de células CD19⁺ activadas en las
 35 células CD19⁺ esplénicas; y (iv) la producción de citoquinas (IL-6, IFN- γ , TNF- α).

Los resultados para la expresión de la proteína de EPO se muestran en las Figuras 19A-B, mostrando la Figura 19A los resultados en la semana 1 y la Figura 19B los resultados para la semana 2. Los resultados demostraron que el nivel de expresión de la proteína de interés (EPO) codificada por el constructo de ARNm no se ve
 40 significativamente afectado por la inclusión de los sitios de unión de miR (miR-142-3p, miR-142-5p, miR-155-5p o copias múltiples y/o combinaciones de los mismos) en el constructo.

Los resultados para la frecuencia de células B y la frecuencia de células B activadas se muestran en las Figuras 20 y 21, respectivamente, para la semana 1, y en las Figuras 22 y 23, respectivamente, para la semana 2. Estos
 45 resultados mostraron que la frecuencia total de las células B no se vio afectada significativamente por la inclusión de los miR en los constructos de ARNm de EPO, pero que la frecuencia de las células B activadas disminuye en presencia del sitio de unión de miR-142-3p, el sitio de unión de miR-142-5p, el sitio de unión de miR-155-5p, o múltiples copias de los mismos y/o combinaciones de los mismos.

La expresión de citoquinas se examinó midiendo los niveles de IL-6, TNF- α y TNF- γ en el suero. Los resultados para estas tres citoquinas para ratones tratados con 0,2 mg/kg de ARNm se muestran en las Figuras 24A (IL-6), 24B (TNF- α) y 24C (IFN- γ). Los resultados mostrados son para la semana 2. Se observó variabilidad en la expresión de citoquinas en los animales tratados con EPO. Sin embargo, estos resultados demuestran que la expresión de al menos algunas citoquinas disminuye en presencia del sitio de unión de miR-142-3p, el sitio de unión de miR-142-5p,
 50 el sitio de unión de miR-155-5p o múltiples copias de los mismos y/o combinaciones de los mismos.

Por consiguiente, los estudios descritos anteriormente demuestran que la incorporación en un constructo de ARNm de un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-142-5p, un sitio de unión de miR-155-5p, o copias múltiples de los mismos y/o combinaciones de los mismos, da como resultado una frecuencia reducida de activación

de células B y una secreción reducida de un panel de diferentes citoquinas inmunoestimulantes *in vivo* en animales tratados con el constructo de ARNm, mientras que tiene un impacto mínimo en la expresión de una proteína de interés codificada por el constructo de ARNm en el animal tratado.

5 **Ejemplo 6: Efecto de los sitios de unión de miR en poblaciones particulares de células inmunes**

En este ejemplo, se efectuaron estudios para examinar el efecto de la inclusión en constructos de ARNm de un sitio de unión de miR expresado en células inmunes (miR-142, miR-126 o tanto miR-142 + como miR-126) sobre la frecuencia y la activación de poblaciones particulares de células inmunes. Los ratones Balb/c se trataron con constructos de ARNm que codifican EPO como se describe anteriormente en el Ejemplo 3, cuyos constructos ya sea carecían de sitios de unión de miR o contenían un sitio de unión de miR-142-3p, un sitio de unión de miR-126-3p o tanto un sitio de unión de miR-142-3p como un sitio de unión de miR-126-3p. Los ratones fueron tratados por vía intravenosa los días 1, 8 y 15 con 0,2 mg/kg del constructo de ARNm formulado en nanopartículas lipídicas MC3.

Un primer conjunto de experimentos examinó si los miR tenían algún efecto sobre la frecuencia de células B CD27⁺ o el nivel de expresión de CD27 en estas células. Los resultados se muestran en las Figuras 25A-B. La Figura 25A muestra la frecuencia de las células B CD27⁺ CD19⁺ en las células B CD19⁺ esplénicas, lo que demuestra que la población de células B CD27⁺ no se vio afectada por la inclusión de los sitios de unión de miR en los constructos de ARNm. La Figura 25B muestra el nivel de expresión de CD27 en la población de células B CD27⁺ y, asimismo, muestra que esta expresión no se vio afectada por la inclusión del sitio o los sitios de unión de miR en los constructos de ARNm. Por consiguiente, este primer conjunto de experimentos demostró que el efecto de los sitios de unión de miR en la inhibición de la activación de las células B y/o la inhibición de la producción de citoquinas no fue el resultado de que los sitios de unión de miR afectaran ya sea la frecuencia de las células B CD27⁺ CD19⁺ o el nivel de expresión de CD27 en estas células.

Un segundo conjunto de experimentos examinó si los miR tenían algún efecto sobre la frecuencia de las células CD11c⁺, como un marcador de células dendríticas, y/o de la frecuencia de las células dendríticas activadas (células CD11c⁺ CD70⁺ CD86⁺ cells). Los resultados se muestran en las figuras 26A-B. La Figura 26A muestra el porcentaje de células CD11c⁺ en células esplénicas de los ratones, lo que demuestra que la frecuencia total de las células CD11c⁺ se inhibió mediante la inclusión del sitio de unión de miR-142-3p, el sitio de unión de miR-126-3p, o ambos sitios de unión, en los constructos de ARNm. La Figura 26B muestra la frecuencia de las células dendríticas activadas (células (CD11c⁺ CD70⁺ CD86⁺) dentro de la población celular esplénica CD11c⁺, asimismo, muestra que la frecuencia de las células dendríticas activadas se inhibió mediante la inclusión de los sitios de unión de miR en los constructos de ARNm. Por consiguiente, este segundo conjunto de experimentos demostró que la inclusión de los sitios de unión de miR inhibía tanto la frecuencia total de las células dendríticas como la frecuencia de las células dendríticas activadas, lo que implica a esta población celular en el mecanismo de cómo la inclusión del o los sitios de unión de miR conduce a la inhibición de la activación de las células B y a la inhibición de la producción de citoquinas. Si bien no se pretende que estén limitados por el mecanismo, estos resultados sugieren que, en los ratones, los niveles disminuidos de células dendríticas CD70⁺ activadas conducen a una interacción disminuida con las células B CD27⁺, lo que conduce a una disminución de la activación de las células B y una disminución de la producción de citoquinas.

Para investigar más a fondo esto, se efectuó un tercer conjunto de experimentos en los que se examinó la capacidad de las células dendríticas plasmacitoides (pDC) de los ratones para estimular la proliferación de células B vírgenes. Para estos experimentos, se incubaron 2x10⁵ células B vírgenes etiquetadas con CFSE con 4x10⁴ pDC purificadas del bazo de ratones inyectados ya sea ARNm de hEPO, miR142 de ARNm de hEPO, miR126 de ARNm de hEPO o miR126+142 de ARNm de hEPO en la presencia de anti IgM a 10 µg/ml. Después de 5 días de cultivo, las células fueron cosechadas y analizadas mediante una citometría de flujo para la expresión de CFSE. Los niveles de proliferación de las células B vírgenes incubadas con las pDC se muestran en el gráfico de la Figura 27. Los resultados demuestran que las células B vírgenes proliferan menos en presencia de pDC de ratones tratados con los constructos de ARNm que incluyen el sitio de unión de miR-142, el sitio de unión de miR-126 o ambos sitios de unión. Estos experimentos respaldan aún más el mecanismo de que en ratones tratados con las constructos que contienen miR, la disminución de los niveles de pDC activados conduce a una menor estimulación de las células B, lo que conduce a la inhibición de la activación de las células B y la inhibición de la producción de citoquinas.

Ejemplo 7: Efecto de los sitios de unión de miR sobre la IgM

En este ejemplo, se efectuaron estudios para examinar el efecto de la inclusión en constructos de ARNm de un sitio de unión de miR expresado en células inmunes (miR-142, miR-126 o tanto miR-142 como miR-126) sobre los

niveles de IgM que se une a PEG (IgM anti-PEG).. Dado que el PEG es un componente de la LNP en la que se encapsula el constructo de ARNm, la presencia de IgM anti-PEG en el suero de los ratones contribuye a la depuración sanguínea acelerada (ABC) de la composición de LNP/ARNm.

- 5 Los ratones se trataron con los constructos de ARNm que codifican Luciferasa como se describe en el Ejemplo 2. Se recogió suero de los ratones después de la segunda, tercera y cuarta dosis de tratamiento y se midieron los niveles de IgM anti-PEG en el suero (en ng/ml). Los resultados se muestran en las figuras 28A-C. La Figura 28A muestra los niveles de IgM anti-PEG después de la segunda dosis, la Figura 28B muestra los niveles de IgM anti-PEG después de la tercera dosis y la Figura 28C muestra los niveles de IgM anti-PEG después de la cuarta dosis. Los resultados demuestran que la inclusión de los sitios de unión de miR disminuyó significativamente el nivel de IgM anti-PEG en los ratones. Este efecto ya se observó después del tratamiento con la segunda dosis y el efecto continuó durante el tratamiento con la cuarta dosis. Esta reducción de IgM anti-PEG en los ratones tratados con los constructos de ARNm que contienen el sitio de unión de miR indica que se espera que la ABC, que está mediada al menos en parte por la IgM anti-PEG, se reduzca en estos ratones.

15

Ejemplo 8: Efecto de solo un sitio de unión de miR contra múltiples sitios de unión de miR

- En este ejemplo, se efectuaron estudios para examinar el efecto de la inclusión en constructos de ARNm de un único sitio de unión de miR (1X) frente a múltiples sitios de unión de miR (por ejemplo, 3X, que tiene 3 sitios de unión de miR).

20

- Se efectuó una primera serie de estudios para examinar el miR-122, que se sabe que regula la expresión de ARNm en las células hepáticas. Para determinar el efecto de la inclusión de uno contra tres sitios de unión de miR-122 en la expresión de una proteína codificada por un constructo de ARNm, los hepatocitos primarios se cotransfectaron usando Lipofectamine 2000 con un constructo de ARNm de luciferasa (Luc) y un constructo de ARNm de proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), donde la 3' UTR de cada constructo (i) carecía de cualquier sitio de unión de miR-122 (control); (ii) contenía un sitio de unión de miR-122; o (iii) contenía tres sitios de unión de miR-122. Otro control incluyó la transfección con secuencias de ARN similares a Luc y similares a eGFP sin ATG en la secuencia de codificación putativa. Las secuencias de ARNm de estos cuatro constructos de eGFP se muestran en las SEQ ID NO: 61-64, respectivamente. Las secuencias de ARNm de estos cuatro constructos de Luc se muestran en las SEQ ID NO: 65-68, respectivamente. La secuencia de la 3' UTR que contiene tres sitios de unión de miR-122 se muestra en la SEQ ID NO: 54.

- Las células se transfectaron ya sea con 7, 5, 15, 50 o 100 ng de ARNm. La intensidad integrada verde total se midió con el tiempo durante 24 horas. Los resultados se muestran en las Figuras 31A-D, que demuestran que a dosis de ARNm más bajas (7,5 y 15 ng, en las Figuras 31A y 31B, respectivamente), los constructos de miR-122 1X y constructos de miR-122 3X condujeron a una significativa reducción en la expresión de eGFP en los hepatocitos primarios, mientras que a las dosis más altas de ARNm (50 y 100 ng, en las figuras 31C y 31D, respectivamente), los constructos de miR-122 3X mostraron una mayor inhibición de la expresión de eGFP que los constructos de miR-122 1X, y a las dosis más altas los constructos de miR-122 3X fueron capaces de mantener esa pérdida de expresión de proteínas con el tiempo. La luminiscencia de luciferasa también se examinó en los hepatocitos primarios y se observaron resultados similares: que los constructos de miR-122 3X condujeron a una mayor disminución de la expresión de proteínas, particularmente a dosis más altas de ARNm.

- En una segunda serie de experimentos para examinar el efecto de inclusión de uno contra tres sitios de unión de miR-122 en la expresión de una proteína codificada por un constructo de ARNm, los hepatocitos primarios se transfectaron usando Lipofectamine 2000 con un constructo de ARNm que codifica una caspasa y tiene, en su 3' UTR, ya sea, (i) ningún sitio de unión de miR-122 (control); (ii) un sitio de unión de miR-122; o (iii) tres sitios de unión de miR-122. Otro control incluyó la transfección con secuencias de ARN similares a Caspasa sin ATG en la secuencia de codificación putativa. Las secuencias de ARNm de estos cuatro constructos de caspasa se muestran en las SEQ ID NO: 69-72, respectivamente. La toxicidad mediada por caspasa se midió con el tiempo durante 24 horas. Los resultados se muestran en las Figuras 32A-D, que demuestran que a la dosis de ARNm más baja (7,5 ng, en la Figura 32A), tanto los constructos miR-122 1X como los miR-122 3X inhibieron la toxicidad mediada por caspasa, teniendo el constructo miR-122 3X un efecto mucho más fuerte en la inhibición de la toxicidad. Además, a las dosis más altas de ARNm (15 ng, 50 ng y 100 ng, en las Fig. 32B, 32C y 32D, respectivamente), solo el constructo miR-122 3X fue capaz de inhibir la toxicidad mediada por caspasa. También se efectuaron estudios para transfectar hepatocitos primarios con el constructo de ARNm de caspasa en una nanopartícula lipídica MC3 y se observaron resultados similares: el alivio de la toxicidad mediada por caspasa fue significativamente más fuerte con el constructo miR-122 3X que con el constructo miR-122 1X.

Para confirmar estos resultados del estudio *in vitro in vivo*, a los ratones Balb/c se les administraron conjuntamente constructos de ARNm de Luc y eGFP (0,5 mg/kg), en nanopartículas MC3, que contenían cero, uno o tres sitios de unión de miR-122. Se examinó la fluorescencia de eGFP en el hígado, cuyos resultados mostraron que la inclusión

- 5 de un sitio de unión de miR-122 condujo a una modesta disminución de la expresión de eGFP en el hígado, mientras que la inclusión de tres sitios de unión de miR-122 condujo a una disminución significativa de la expresión de eGFP en el hígado. Se observaron resultados similares para la expresión de luciferasa, con un sitio 1X que reduce la expresión de luciferasa y sitios 3X que conducen a una mayor reducción de la expresión de proteínas.
- 10 En una tercera serie de experimentos, a los monos cinomólogos se les administraron constructos de ARNm de hEPO (0,2 mg/kg), en nanopartículas MC3, que contienen cero, uno o tres sitios de unión de miR-142-3p en la 3' UTR. Los niveles de expresión de hEPO (en ng/ml) en los monos se midieron mediante ELISA, cuyos resultados se muestran en la Figura 33. Los resultados muestran que la inclusión de sitios de unión 3X de miR-142-3p en el

- 15 constructos con cero o un sitio de unión de miR-142-3p.

En general, los estudios descritos anteriormente demuestran el beneficio de la inclusión de al menos un sitio de unión de miR en los constructos de ARNm y el efecto mejorado de la inclusión de tres sitios de unión de miR en el constructo.

20

Ejemplo 9: Efecto de los sitios de unión de miR en la región 5' sin traducir (5' UTR)

En este ejemplo, se efectuaron estudios para examinar el efecto de la inclusión en constructos de ARNm de un sitio de unión de miR en uno de los tres sitios de inserción diferentes dentro de la 5' UTR del constructo de ARNm. La

- 25 secuencia de la 5' UTR usada se muestra a continuación: GGGAAATAAGAG□AGAAAAGAAGAGTA□AGAAGAAATATA□AGAGCCACC (SEQ ID NO: 53), con los tres posibles sitios de inserción (P1, P2, P3) indicados por un signo de intercalación (□). Las secuencias de la 5' UTR que tienen un sitio de unión de miR-142-3p insertado en la P1, P2 o P3 se muestran en las SEQ ID NO: 55-57, respectivamente. Las secuencias de la 5' UTR que tienen un sitio de unión de miR-122 insertado en la P1, P2 o P3

- 30 se muestran en las SEQ ID NO: 58-60, respectivamente.

En una primera serie de experimentos, los constructos de ARNm de proteína fluorescente verde mejorada (eGFP) se transfectaron en células de macrófagos murinos RAW264.7 usando Lipofectamine 2000, donde los constructos contenían sitios de unión de miR-142-3p 1x o 3x en la 3' UTR, o contenían un sitio de unión de miR-142-3p insertado

- 35 en la P1, P2 o P3 de la 5' UTR, o contenían un sitio de unión de miR-142-3p insertado en la P1, P2 o P3 de la 5' UTR en combinación con un solo sitio de unión de miR-142-3p en la 3' UTR. La fluorescencia de eGFP se midió a las 48 horas después de la transfección. Los resultados se muestran en la Figura 34. Los resultados demuestran que todos los constructos probados, incluso aquellos con el sitio de unión de miR-142-3p insertado en la P1, P2 o P3, solos o en combinación con un sitio de unión de miR-142-3p en la 3' UTR, condujeron a la reducción significativa

- 40 de la expresión de proteínas en las células.

Se efectuaron constructos similares usando hEPO como la proteína codificada y se efectuaron experimentos similares con células RAW264.7 transfectadas. Los resultados con los constructos de hEPO fueron muy similares a aquellos con los constructos de eGFP, con todos los constructos probados, incluso aquellos con el sitio de unión de

- 45 miR insertado en la P1, P2 o P3, solos o en combinación con un sitio de unión de miR en la 3' UTR, condujeron a la reducción significativa de la expresión de proteínas en las células. Sin embargo, con los constructos de hEPO, el grado de inhibición por los constructos de la 5' UTR P1, P2 y P3 fue ligeramente menor (60, 73 y 93 %, respectivamente) en comparación con el grado de inhibición con las constructos de eGFP (89, 96 y 98 %, respectivamente).

50

En una segunda serie de experimentos, los constructos de ARNm de hEPO se hicieron similares a los descritas anteriormente, excepto que los constructos contenían sitios de unión de miR-122 1x o 3x en la 3' UTR, o contenían un sitio de unión de miR-122 insertado ya sea en la P1, P2 o P3 de la 5' UTR, o contenían un sitio de unión de miR-122 insertado en la P1, P2 o P3 de la 5' UTR combinado con un único sitio de unión de miR-122 en la 3' UTR. Los

- 55 constructos de ARNm se transfectaron en hepatocitos primarios usando Lipofectamine 2000. La expresión de hEPO (en ng/mL) se midió por ELISA, cuyos resultados se muestran en la Figura 35. Los resultados demuestran que todos los constructos probados, incluso aquellos con el sitio de unión de miR-122 insertado en la P1, P2 o P3 solo o en combinación con un sitio de unión de miR-122 en la 3' UTR condujeron a una expresión de proteína significativamente reducida en las células.

60

Para confirmar estos resultados *in vitro* del estudio *in vivo*, a os ratones Balb/c se les administró el panel de constructos de ARNm de hEPO/miR-122 en nanopartículas MC3 o se les administró el panel de constructos de hEPO/miR-142-3p usando Lipofectamine 2000. Los resultados mostraron que, de manera similar a las observaciones *in vitro*, todos los constructos probados, incluso aquellos con el sitio de unión de miR-122 o miR-142-3p insertado en la P1, P2 o P3, solos o en combinación con un sitio de unión de miR-122 o miR-142-3p en la 3' UTR, condujeron a la reducción significativa de la expresión de proteínas en los ratones.

En general, estos estudios demuestran el beneficio de la inclusión de al menos un sitio de unión de miR ya sea en la 3' UTR o la 5' UTR del constructo de ARNm, o una combinación de sitios de unión de miR en la 3' UTR y la 5' UTR.

10

RESUMEN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Secuencia
1	GGGAAAUAAGAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGGAGUGC ACGAGUGUCCCGCGUGGUUGUGGUUGCUGCUGCUCUCUUGAGCCUCCACUGGGAC UGCCUGUGCUGGGGGCACCACCCAGAUUGAUCUGCGACUCACGGGUACUUGAGAGGU ACCUUCUUGAAGCCAAAAGAAGCCGAAAACAUCACAACCGGAUGCGCCGAGCACUGCU CCCUCAAUGAGAACAUUACUGUACCGGAUACAAAGGUCAAUUUCUAUGCAUGGAAGA GAAUGGAAGUAGGACAGCAGGCCGUCGAAGUGUGGCAGGGGCUCCGCGUUUUGUCGG AGGCGGUGUUGCGGGGUCAGGCCUCCUCGUAACUCAACACAGCCGUGGGAGCCCC UCCAACUUGAUGUCGAUAAAAGCGGUGUCGGGGCUCGCGAGCUUGACGACGUUGCUUC GGGCUCUGGGCGCACAAAAGGAGGCUAUUUUCGCCGCCUGACGCGGCCUCCGCGGCAC CCCUCCGAACGAUCACCGCGGACACGUUUAGGAAGCUUUUUAGAGUGUACAGCAAUU UCCUCCGCGGAAAGCUGAAAUUGUAUACUGGUAAGCGUGUAGGACAGGGGAUCGCU GAUAAUAGGCUUGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGC CCCUCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGUGG UCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (EPO con un sitio de unión de miR 142-3p)
2	GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUC CCCUUCCUGCACCCGUACCCCUCCAUAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAA UAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-3)
3	UCCAUAAGUAGGAAACACUACA (sitio de unión de miR 142-3p)
4	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (Péptido 2A)
5	GGAAGCGGAGCTACTAATTGAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAAC CCTGGACCT (polinucleótido que codifica el péptido 2A)
6	TCCGGACTCAGATCCGGGGATCTCAAAATTGTCGCTCCTGTCAAACAAACTCTTAAC TTTGATTTACTCAAACCTGGCTGGGGATGTAGAAAGCAATCCAGGTCCACTC (polinucleótido que codifica el péptido 2A)

ES 2 810 701 T3

SEQ ID NO:	Secuencia
7	GGGAAUAAGAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAUAUAAGAGCCACCAUGGGAGUGC ACGAGUGUCCCGCGUGGUUGUGGUUGCUGCUGCUCUUGAGCCUCCACUGGGAC UGCCUGUGCUGGGGGCACCACCCAGAUUGAUCUGCGACUCACGGGUACUUGAGAGGU ACCUUCUUGAAGCCAAAGAAGCCGAAAACAUCACAACCGGAUGCGCCGAGCACUGCU CCCUCAAUGAGAACAUAUACUGUACCGGAUACAAAGGUCAAUUUCUAUGCAUGGAAGA GAAUGGAAGUAGGACAGCAGGCCGUCGAAGUGUGGCAGGGGCUCGCGCUUUUGUCGG AGGCGGUGUUGCGGGGUCAGGCCCUCCUCGUCAACUCAUCACAGCCGUGGGAGCCCC UCCAACUUCAGUCGAUAAAGCGGUGUCGGGGCUCGCGAGCUUGACGACGUUGCUUC GGGCUCUGGGGCGCAGAAAGGAGGCUAUUUUCGCCGCCUGACGCGGCCUCCGCGGCAC CCCUCCGAACGAUCACCGCGGACACGUUUAGGAAGCUUUUAGAGUGUACAGCAAUU UCCUCCGCGGAAAGCUGAAAUUGUAUACUGGUGAAGCGUGUAGGACAGGGGAUCGCU GAUAAUAGGCUUGAGCCUCGGUGGGCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGC CCCUCUCCCCUCCUGCACCCCGUACCCCGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGG CGGC (EPO humana sin sitios de unión de miR)
8	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA (secuencia de miR 142-3p)
9	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU (secuencia de miR 142-5p)
10	CCUCUGAAAUUCAGUUCUUCAG (secuencia de miR 146-3p)
11	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU (secuencia de miR 146-5p)
12	CUCCUACAUUUAGCAUUAACA (secuencia de miR 155-3p)
13	UUAAUGCUAUUCGUGAUAGGGGU (secuencia de miR 155-5p)
14	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG (secuencia de miR 126-3p)
15	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG (secuencia de miR 126-5p)
16	CCAGUAUUAACUGUGCUGCUGA (secuencia de miR 16-3p)
17	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG (secuencia de miR 16-5p)
18	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU (secuencia de miR 21-3p)
19	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (secuencia de miR 21-5p)
20	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA (secuencia de miR 223-3p)

SEQ ID NO:	Secuencia
21	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU (secuencia de miR 223-5p)
22	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG (secuencia de miR 24-3p)
23	UGCCUACUGAGCUGAUUACAGU (secuencia de miR 24-5p)
24	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC (secuencia de miR 27-3p)
25	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA (secuencia de miR 27-5p)
26	CGCAUUAUUACUCACGGUACGA (sitio de unión de miR 126-3p)
27	UGAUAUAG GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAG CCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>CGCAUUAUUACUCACGGUACGA</u> GUGG UCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 126-3p)
28	GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGGAGUGC ACGAGUGUCCCGCGUGGUUGUGGUUGCUGCUGCUCUUGAGCCUCCACUGGGAC UGCCUGUGCUGGGGGCACCACCCAGAUUGAUCUGCGACUCACGGGUACUUGAGAGGU ACCUUCUUGAAGCCAAAGAAGCCGAAACAUCACAACCGGAUGCGCCGAGCACUGCU CCCUCAAUGAGAACAUAUCUGUACCGGAUACAAAGGUCAAUUUCUAUGCAUGGAAGA GAAUGGAAGUAGGACAGCAGGCCGUCGAAGUGUGGCAGGGGCUCCGCGUUUUGUCGG AGGCGGUGUUGCGGGGUCAGGCCUCCUCGUAACUCAACAGCCGUGGGAGCCCC UCCAACUUC AUGUCGAUAAAGCGGUGUCGGGGCUCGCGAGCUUGACGACGUUGCUUC GGGCUUGGGCGCACAAAAGGAGGCUAUUUCGCCGCCUGACGCGGCCUCCGCGGCAC CCCUCCGAACGAUACCCGCGGACACGUUUAGGAAGCUUUUAGAGUGUACAGCAAUU UCCUCCGCGGAAAGCUGAAAUUGUAUACUGGUGAAGCGUGUAGGACAGGGGAUCGCU GAUAAUAGGCUUGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGC CCCUCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>CGCAUUAUUACUCACGGUACGA</u> GUGGU CUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (hEPO con un sitio de unión de miR 126-3p)
29	GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGAGCCACCAUGGGAGUGC ACGAGUGUCCCGCGUGGUUGUGGUUGCUGCUGCUCUUGAGCCUCCACUGGGAC UGCCUGUGCUGGGGGCACCACCCAGAUUGAUCUGCGACUCACGGGUACUUGAGAGGU ACCUUCUUGAAGCCAAAGAAGCCGAAACAUCACAACCGGAUGCGCCGAGCACUGCU CCCUCAAUGAGAACAUAUCUGUACCGGAUACAAAGGUCAAUUUCUAUGCAUGGAAGA GAAUGGAAGUAGGACAGCAGGCCGUCGAAGUGUGGCAGGGGCUCCGCGUUUUGUCGG AGGCGGUGUUGCGGGGUCAGGCCUCCUCGUAACUCAACAGCCGUGGGAGCCCC UCCAACUUC AUGUCGAUAAAGCGGUGUCGGGGCUCGCGAGCUUGACGACGUUGCUUC GGGCUUGGGCGCACAAAAGGAGGCUAUUUCGCCGCCUGACGCGGCCUCCGCGGCAC CCCUCCGAACGAUACCCGCGGACACGUUUAGGAAGCUUUUAGAGUGUACAGCAAUU UCCUCCGCGGAAAGCUGAAAUUGUAUACUGGUGAAGCGUGUAGGACAGGGGAUCGCU GAUAAUAGGCUUGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGC CCCUCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC <u>CGCAUUAUUACUCACGGUACGA</u> GUGGU CUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (hEPO con sitios de unión de miR 142-3p y miR 126-3p)

SEQ ID NO:	Secuencia
30	TGATAATAG GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAG CCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGG GCGGC (3' UTR, sin sitios de unión de miR)
31	TGATAATAG GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAG CCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCTCCATAAAGTAGGAAACACTACAGTG GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-3p)
32	TGATAATAG GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAG CCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCGCGCATTATTACTCACGGTACGAGTGG TCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 126-3p)
33	TGATAATAG TCCATAAAGTAGGAAACACTACAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCGCGC ATTATTACTCACGGTACGAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con sitios de unión de miR 142-3p y miR 126-3p)
34	UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU (secuencia de miR 155-5p)
35	ACCCCTATCACAATTAGCATTA (sitio de unión de miR 155-5p)
36	TGATAATAG GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAG CCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGG GCGGC (3' UTR sin sitio de unión de miR)
37	UGAUAAUAG GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAG CCCCUCCUCCCUUCCUGCACCCGUACCCCUCCATAAAGUAGGAAACACUACAGUG GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-3p)
38	TGATAATAG TCCATAAAGTAGGAAACACTACAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCCTTGGGCCTCCATAAAGTAGGAAACACTACATCCCCCAGCCCCCTCCTCCC CTTCTGCACCCGTACCCCTCCATAAAGTAGGAAACACTACAGTGGTCTTTGAATA AAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con 3 sitios de unión de miR 142-3p)
39	TGATAATAG GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCAG CCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCCGAGTAGGCTTTCTACTTTATGCTGGT CTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-5p)
40	TGATAATAG AGTAGGCTTTCTACTTTATGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTT GCCCCTTGGGCCAGTAGGCTTTCTACTTTATGCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTC CTGCACCCGTACCCCGAGTAGGCTTTCTACTTTATGCTGGTCTTTGAATAAAGTCT GAGTGGGCGGC (3' UTR con 3 sitios de unión de miR 142-5p)
41	TGATAATAG AGTAGGCTTTCTACTTTATGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTT GCCCCTTGGGCCTCCATAAAGTAGGAAACACTACATCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCT TCTGCACCCGTACCCCGAGTAGGCTTTCTACTTTATGCTGGTCTTTGAATAAAGT CTGAGTGGGCGGC (3' UTR con 2 sitios de unión de miR 142-5p y un sitio de unión de miR 142-3p)

SEQ ID NO:	Secuencia
42	TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAG CCCCCTCCTCCCCTTCTTGACCCCGTACCCCCACCCCTATCACAATTAGCATTAAGTG GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 155-5p)
43	TGATAATAGACCCCTATCACAATTAGCATTAAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCCCTTGGGCCACCCCTATCACAATTAGCATTAATCCCCCAGCCCCCTCCTCCC CTTCTTGACCCCGTACCCCCACCCCTATCACAATTAGCATTAAGTGGTCTTTGAATA AAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con 3 sitios de unión de miR 155-5p)
44	TGATAATAGACCCCTATCACAATTAGCATTAAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCCCTTGGGCCTCCATAAAGTAGGAAACACTACATCCCCCAGCCCCCTCCTCCC CTTCTTGACCCCGTACCCCCACCCCTATCACAATTAGCATTAAGTGGTCTTTGAATA AAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con 2 sitios de unión de miR 155-5p y un sitio de unión de miR 142-3p)
45	UAUUUAGUGUGAUAAUGGCGUU (sitio de unión de miR 122)
46	CAAACACCAUUGUCACACUCCA (sitio de unión de miR 122)
47	TGATAATAGTCCATAAAGTAGGAAACACTACAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCCCTTGGGCCCAAACACCAATTGTCACTCCATCCCCCAGCCCCCTCCTCCC TTCTTGACCCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con sitios de unión de miR 142-3p y miR 122-5p)
48	TGATAATAGTCCATAAAGTAGGAAACACTACAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTG GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-3p , inserción en la P1)
49	TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCTTCCATAAAGTAGGAAACACTACACATGCTTC TTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTG GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-3p , inserción en la P2)
50	TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGCTCCATAAAG TAGGAAACACTACATCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTG GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-3p , inserción en la P3)
51	AGUAGUGCUUUCUACUUUAUG (sitio de unión de miR -142-5p)
52	GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAAAGCACUACUAACAGCACUGGAGGGUGUAGU GUUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGUACUGUG (miR-142)
53	GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC (5' UTR)
54	TGATAATAGCAAACACCATTGTCACACTTCCAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCT TGCCCCCTTGGGCCCAAACACCATTGTCACACTTCCATCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCT TCCTGCACCCGTACCCCCCAAACACCATTGTCACACTTCCAGTGGTCTTTGAATAAAG TCTGAGTGGGCGGC (3' UTR con 3X sitios de unión de miR122)

SEQ ID NO:	Secuencia
55	GGGAAATAAGAGTCCATAAAAGTAGGAAACACTACAAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAA TATAAGAGCCACC (5' UTR con un sitio de unión de miR142-3p en la posición p1)
56	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAATCCATAAAAGTAGGAAACACTACAGAAGAAA TATAAGAGCCACC (5' UTR con un sitio de unión de miR142-3p en la posición p2)
57	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAATCCATAAAAGTAGGAAACA CTACAGAGCCACC (5' UTR con un sitio de unión de miR142-3p en la posición p3)
58	GGGAAATAAGAGCAAACACCATTGTCACACTCCAAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAAT ATAAGAGCCACC (5' UTR con un sitio de unión de miR122-3p en la posición p1)
59	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAACAAACACCATTGTCACACTCCAGAAGAAAT ATAAGAGCCACC (5' UTR con un sitio de unión de miR122-3p en la posición p2)
60	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAACAAACACCATTGTCACAC TCCAGAGCCACC (5' UTR con un sitio de unión de miR122-3p en la posición p3)
61	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTGTCCA AGGGTGAGGAATTGTTTACCGGGGTGGTGCCTATTCTCGTCGAACTTGACGGGGATG TGAATGGACACAAGTTTTCGGTATCCGGAGAAGGAGAGGGTGACGCCACATACGGAA AGCTTAACTCAAATTCATCTGTACGACGGGGAACTGCCCGTACCCTGGCCTACGC TCGTAACCACGCTGACTTATGGAGTGCAGTGCTTTAGCAGATACCCCGACCATATGA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCGGCGATGCCCGAGGGGTACGTGCAAGAGAGGACCA TTTTCTTCAAAGACGATGGCAATTACAAAACACGCGCAGAAGTCAAGTTTGAGGGCG ATACTCTGGTCAATCGGATCGAATTGAAGGGAATCGATTTCAAAGAAGATGGAAACA TCCTTGGCCATAAGCTCGAGTACAATACTCGCATAATGTCTATATCATGGCTG ACAAGCAGAAAAACGGTATCAAAGTCAACTTTAAGATCCGACACAATATTGAGGACG GTTCTGGTGCAGCTTGCGGACCACTATCAACAGAATACGCCGATTGGGGATGGTCCGG TCCTTTTGCCGGATAACCATTATCTCTCAACCCAGTCAGCCCTGAGCAAAGATCCAA ACGAGAAGAGGGACCACATGGTCTTGCTCGAATTCGTGACAGCGGCAGGGATCACTC TGGGAATGGACGAGTTGTACAAGTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTG GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (constructo de ARNm de eGFP sin sitios de unión de miR)

SEQ ID NO:	Secuencia
62	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTGTCCA AGGGTGAGGAATTGTTTACCGGGGTGGTGCCTATTCTCGTCGAACTTGACGGGGATG TGAATGGACACAAGTTTTTCGGTATCCGGAGAAGGAGAGGGTGACGCCACATACGGAA AGCTTACACTCAAATTCATCTGTACGACGGGGAAACTGCCCGTACCCTGGCCTACGC TCGTAACCACGCTGACTTATGGAGTGCAGTGCTTTAGCAGATACCCCGACCATATGA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCGGCGATGCCCCGAGGGGTACGTGCAAGAGAGGACCA TTTTCTTCAAAGACGATGGCAATTACAAAACACGCGCAGAAGTCAAGTTTGAGGGCG ATACTCTGGTCAATCGGATCGAATTGAAGGGAATCGATTTCAAAGAAGATGGAAACA TCCTTGGCCATAAGCTCGAGTACAACATAACTCGCATAATGTCTATATCATGGCTG ACAAGCAGAAAAACGGTATCAAAGTCAACTTTAAGATCCGACACAATATTGAGGACG GTTCCGGTGCAGCTTGCGGACCACTATCAACAGAATACGCCGATTGGGGATGGTCCGG TCCTTTTGGCCGATAACCATTATCTCTCAACCCAGTCAGCCCTGAGCAAAGATCCAA ACGAGAAGAGGGACCACATGGTCTTGCTCGAATTCGTGACAGCGGCAGGGATCACTC TGGGAATGGACGAGTTGTACAAGTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCTTTGGGCCTCCCCCAGCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCCAA ACACCATTGTCACTCCAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (constructo de ARNm de eGFP con 1X sitio de unión de miR122 en la 3' UTR)
63	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTGTCCA AGGGTGAGGAATTGTTTACCGGGGTGGTGCCTATTCTCGTCGAACTTGACGGGGATG TGAATGGACACAAGTTTTTCGGTATCCGGAGAAGGAGAGGGTGACGCCACATACGGAA AGCTTACACTCAAATTCATCTGTACGACGGGGAAACTGCCCGTACCCTGGCCTACGC TCGTAACCACGCTGACTTATGGAGTGCAGTGCTTTAGCAGATACCCCGACCATATGA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCGGCGATGCCCCGAGGGGTACGTGCAAGAGAGGACCA
	TTTTCTTCAAAGACGATGGCAATTACAAAACACGCGCAGAAGTCAAGTTTGAGGGCG ATACTCTGGTCAATCGGATCGAATTGAAGGGAATCGATTTCAAAGAAGATGGAAACA TCCTTGGCCATAAGCTCGAGTACAACATAACTCGCATAATGTCTATATCATGGCTG ACAAGCAGAAAAACGGTATCAAAGTCAACTTTAAGATCCGACACAATATTGAGGACG GTTCCGGTGCAGCTTGCGGACCACTATCAACAGAATACGCCGATTGGGGATGGTCCGG TCCTTTTGGCCGATAACCATTATCTCTCAACCCAGTCAGCCCTGAGCAAAGATCCAA ACGAGAAGAGGGACCACATGGTCTTGCTCGAATTCGTGACAGCGGCAGGGATCACTC TGGGAATGGACGAGTTGTACAAGTGATAATAGCAAACACCATTGTCACTCCAGCT GGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTTGGGCCCCAACACCATTGTCACTCC ATCCCCCAGCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCAACACCATTGTCACTC ACTCCAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (constructo de ARNm de eGFP con 3X sitio de unión de miR122 en la 3' UTR)
64	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATCGTCTCCA AGGGTCAGGAATTCTCTACCGGGGTGTCCTTATTCTCGTCGAACTTGACGGGGATC TCAATCGACACAACCTCTCGATCTCCGGAGAAGGAGAGGGTCACGCCACATACGGAA AGCTTACACTCAAATTCATCTATCCGACGGGGAAACTCCCCATCCCCCTCGCCTACGC TCATCACCACGCTCACTTATCGAGTCCAGTCTTTAGCAGATACCCCGACCATATCA AGCAGCACGACTTCTTCAAGTCGGCGATCCCCGAGGGATCCGTCCAAGAGAGGACCA TTTTCTTCAAAGACGATCGCAATTACAAAACACGCGCAGAAGTCAACTTTGAGGGCG ATACTCTCGTCAATCGGATCGAATTGAAGGGAATCGATTTCAAAGAAGATCGAAACA TCCTTGGCCATAAGCTCGAATCCAACATAACTCGCATAATCTCTATATCATCGCTC ACAAGCAGAAAAACGATCTCAAAGTCAACTTTAAGATCCGACACAATATTGAGGACG CTCCGGTCCAGCTTGCGGACCACTATCAACAGAATACGCCGATTGGGGATCGTCCGG TCCTTTTGGCCGATAACCATTATCTCTCAACCCAGTCAGCCCTCAGCAAAGATCCAA ACGAGAAGAGGGACCACATCGTCTTGCTCGAATTCGTGACAGCGGCAGGGATCACTC TCGGAATCGACGACTCATCCAAGTGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTC TTGCCCTTTGGGCCTCCCCCAGCCCTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTG GTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (constructo de ARNm de nst-eGFP de control)

SEQ ID NO:	Secuencia
65	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAAGATG CGAAGAACATCAAGAAGGGACCTGCCCCGTTTTACCCTTTGGAGGACGGTACAGCAG GAGAACAGCTCCACAAGGCGATGAAACGCTACGCCCTGGTCCCCGGAACGATTGCGT TTACCGATGCACATATTGAGGTAGACATCACATACGCAGAATACTTCGAAATGTCGG TGAGGCTGGCGGAAGCGATGAAGAGATATGGTCTTAACACTAATCACCGCATCGTGG TGTGTTCCGAGAACTCATTGCAGTTTTTTCATGCCGGTCCTTGGAGCACTTTTCATCG GGGTGCGAGTCGCGCCAGCGAACGACATCTACAATGAGCGGGAACCTTGAATAGCA TGGGAATCTCCAGCCGACGGTCGTGTTGTCTCCAAAAGGGGCTGCAGAAAATCC TCAACGTGCAGAAGAAGCTCCCCATTATTCAAAGATCATCATTATGGATAGCAAGA CAGATTACCAAGGGTTCCAGTCGATGTATACCTTTGTGACATCGCATTTGCCGCCAG GGTTTAACGAGTATGACTTCGTCCCCGAGTCATTTGACAGAGATAAAACCATCGCGC TGATTATGAATTCCTCGGGTAGCACCGGTTTGCCAAAGGGGTGGCGTTGCCCCACC GCACTGCTTGTGTGCGGTTCTCGCACGCTAGGGATCCTATCTTTGGTAATCAGATCA TTCCCGACACAGCAATCCTGTCCGTGGTACCTTTTCATCACGGTTTGGCATGTTCA CGACTCTCGGCTATTTGATTGCGGTTTCAGGGTCGTACTTATGTATCGGTTTCGAGG AAGAACTGTTTTTGAGATCCTTGCAAGATTACAAGATCCAGTCGGCCCTCCTTGTGC CAACGCTTTTCTCATTCTTTGCGAAATCGACACTTATTGATAAGTATGACCTTTCCA ATCTGCATGAGATTGCCTCAGGGGGAGCGCCGCTTAGCAAGGAAGTCGGGGAGGCAG TGGCCAAGCGCTTCCACCTTCCCGGAATTTCGGCAGGGATACGGGCTCACGGAGACAA CATCCGCGATCCTTATCACGCCCAGGGTGACGATAAGCCGGGAGCCGTCGGAAAAG TGGTCCCCTTCTTTGAAGCCAAGGTTCGTAGACCTCGACACGGGAAAAACCTTCGGAG TGAACCAGAGGGGCGAGCTCTGCGTGAGAGGGCCGATGATCATGTACGGTTACGTGA ATAACCCTGAAGCGACGAATGCGCTGATCGACAAGGATGGGTGGTTGCATTCCGGAG ACATTGCCTATTGGGATGAGGATGAGCACTTCTTTATCGTAGATCGACTTAAGAGCT TGATCAAATACAAAGGCTATCAGGTAGCGCCTGCCGAGCTCGAGTCAATCCTGCTCC AGCACCCCAACATTTTCGACGCCGGAGTGCCCGGTTGCCCGATGACGACGCGGGTG
	AGCTGCCAGCGGCCGTGGTAGTCCTCGAACATGGGAAAACAATGACCGAAAAGGAGA TCGTGGACTACGTAGCATCACAAAGTGACGACTGCGAAGAAACTGAGGGGAGGGGTAG TCTTTGTGGACGAGGTCCCGAAAAGGCTTGACTGGGAAGCTTGACGCTCGCAAAATCC GGGAAATCCTGATTAAGGCAAAAGAGGCGGGAAAATCGCTGTCTGATAATAGGCTG GAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCT TCCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (constructo de ARNm de Luc sin sitios de unión de miR)

SEQ ID NO:	Secuencia
66	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAAGATG CGAAGAACATCAAGAAGGGACCTGCCCCGTTTTACCCTTTGGAGGACGGTACAGCAG GAGAACAGCTCCACAAGGCGATGAAACGCTACGCCCTGGTCCCCGGAACGATTGCGT TTACCGATGCACATATTGAGGTAGACATCACATACGCAGAATACTTCGAAATGTCGG TGAGGCTGGCGGAAGCGATGAAGAGATATGGTCTTAACACTAATCACCGCATCGTGG TGTGTTCCGAGAACTCATTGCAGTTTTTTCATGCCGGTCCTTGGAGCACTTTTCATCG GGGTGCGAGTCGCGCCAGCGAACGACATCTACAATGAGCGGGAACCTTGAATAGCA TGGGAATCTCCCAGCCGACGGTCGTGTTTGTCTCCAAAAAGGGGCTGCAGAAAATCC TCAACGTGCAGAAGAAGCTCCCCATTATTCAAAGATCATCATTATGGATAGCAAGA CAGATTACCAAGGGTTCCAGTCGATGTATACCTTTGTGACATCGCATTTGCCGCCAG GGTTTAACGAGTATGACTTCGTCCCCGAGTCATTTGACAGAGATAAAACCATCGCGC TGATTATGAATTCCTCGGGTAGCACCGGTTTGCCAAAGGGGGTGGCGTTGCCCCACC GCACCTGCTTGTGTGCGGTTCTCGCACGCTAGGGATCCTATCTTTGGTAATCAGATCA TTCCCGACACAGCAATCCTGTCCGTGGTACCTTTTCATCACGGTTTGGCATGTTCA CGACTCTCGGCTATTTGATTTGCGGTTTCAGGGTCGTACTTATGTATCGGTTTCGAGG AAGAAGTGTGTTTGGATCCTTGCAAGATTACAAGATCCAGTCGGCCCTCCTTGTGC CAACGCTTTTCTCATTCTTTGCGAAATCGACACTTATTGATAAGTATGACCTTTCCA ATCTGCATGAGATTGCCTCAGGGGGAGCGCCGCTTAGCAAGGAAGTCGGGGAGGCAG TGGCCAAGCGCTTCCACCTTCCCGGAATTCGGCAGGGATACGGGCTCACGGAGACAA CATCCGCGATCCTTATCACGCCCCGAGGGTGACGATAAGCCGGGAGCCGTCGGAAAAAG TGGTCCCCTTCTTTGAAGCCAAGGTTCGTAGACCTCGACACGGGAAAAACCTTCGGAG TGAACCAGAGGGGGCGAGCTCTGCGTGAGAGGGCCGATGATCATGTCAGGTTACGTGA ATAACCTGAAGCGACGAATGCGCTGATCGACAAGGATGGGTGGTTCGATTTCGGGAG ACATTGCCTATTTGGGATGAGGATGAGCACTTCTTTATCGTAGATCGACTTAAGAGCT TGATCAAATACAAAGGCTATCAGGTAGCGCCTGCCGAGCTCGAGTCAATCCTGCTCC AGCACCCCAACATTTTCGACGCCGGAGTGGCCGGGTTGCCCGATGACGACGCGGGTG AGCTGCCAGCGGCCGTGGTAGTCTCGAACATGGGAAAACAATGACCGAAAAGGAGA TCGTGGACTACGTAGCATCACAAGTGACGACTGCGAAGAACTGAGGGGAGGGGTAG TCTTTGTGGACGAGGTCCCGAAAGGCTTGACTGGGAAGCTTGACGCTCGCAAAATCC GGGAAATCCTGATTAAGGCAAGAAAGGCGGGAAATCGCTGTCTGATAATAGGCTG GAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCCT TCCTGCACCCGTACCCCCCAACACCATTGTACACTCCAGTGGTCTTTGAATAAAG TCTGAGTGGGCGGC (constructo de ARNm de Luc con 1X sitio de unión de miR122 en la 3' UTR)
67	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGAAGATG CGAAGAACATCAAGAAGGGACCTGCCCCGTTTTACCCTTTGGAGGACGGTACAGCAG GAGAACAGCTCCACAAGGCGATGAAACGCTACGCCCTGGTCCCCGGAACGATTGCGT TTACCGATGCACATATTGAGGTAGACATCACATACGCAGAATACTTCGAAATGTCGG TGAGGCTGGCGGAAGCGATGAAGAGATATGGTCTTAACACTAATCACCGCATCGTGG TGTGTTCCGAGAACTCATTGCAGTTTTTTCATGCCGGTCCTTGGAGCACTTTTCATCG GGGTGCGAGTCGCGCCAGCGAACGACATCTACAATGAGCGGGAACCTTGAATAGCA TGGGAATCTCCCAGCCGACGGTCGTGTTTGTCTCCAAAAAGGGGCTGCAGAAAATCC TCAACGTGCAGAAGAAGCTCCCCATTATTCAAAGATCATCATTATGGATAGCAAGA CAGATTACCAAGGGTTCCAGTCGATGTATACCTTTGTGACATCGCATTTGCCGCCAG GGTTTAACGAGTATGACTTCGTCCCCGAGTCATTTGACAGAGATAAAACCATCGCGC TGATTATGAATTCCTCGGGTAGCACCGGTTTGCCAAAGGGGGTGGCGTTGCCCCACC GCACTGCTTGTGTGCGGTTCTCGCACGCTAGGGATCCTATCTTTGGTAATCAGATCA TTCCCGACACAGCAATCCTGTCCGTGGTACCTTTTCATCACGGTTTGGCATGTTCA

SEQ ID NO:	Secuencia
	CGACTCTCGGCTATTTGATTTCGGTTTTTCAGGGTCGTAATTATGTATCGGTTTCGAGG AAGAACTGTTTTTGAGATCCTTGCAAGATTACAAGATCCAGTCGGCCCTCCTTGTGC CAACGCTTTTCTCATTCTTTGCGAAATCGACACTTATTGATAAGTATGACCTTTCCA ATCTGCATGAGATTGCCTCAGGGGGAGCGCCGCTTAGCAAGGAAGTCGGGGAGGCAG TGGCCAAGCGCTTCCACCTTCCCGGAATTTCGGCAGGGATACGGGCTCACGGAGACAA CATCCGCGATCCTTATCACGCCCCGAGGGTGACGATAAGCCGGGAGCCGTCGGAAAAG TGGTCCCCCTTCTTTGAAGCCAAGGTTCGTAGACCTCGACACGGGAAAAACCCTCGGAG TGAACCAGAGGGGGGAGCTCTGCGTGAGAGGGCCGATGATCATGTACAGGTTACGTGA ATAACCCTGAAGCGACGAATGCGCTGATCGACAAGGATGGGTGGTTGCATTTCGGGAG ACATTGCCTATTGGGATGAGGATGAGCACTTCTTTATCGTAGATCGACTTAAGAGCT TGATCAAATACAAAGGCTATCAGGTAGCGCCTGCCGAGCTCGAGTCAATCCTGCTCC AGCACCCCAACATTTTCGACGCCGGAGTGGCCGGGTGCCCCGATGACGACGCGGGTG AGCTGCCAGCGGCCGTGGTAGTCCTCGAACATGGGAAAAAATGACCGAAAAGGAGA TCGTGGACTACGTAGCATCACAAGTGACGACTGCGAAGAACTGAGGGGAGGGGTAG TCTTTGTGGACGAGGTCCCGAAAGGCTTGACTGGGAAGCTTGACGCTCGCAAAATCC GGGAAATCCTGATTAAGGCAAAAGAGCGGGAAAATCGCTGTCTGATAATAGCAAA CACCATTGTACACTCCAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCC CAAACACCATTGTACACTCCATCCCCCAGCCCTCCTCCCTTCTGACCCCGTA CCCCCAACACCATTGTACACTCCAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGG C (constructo de ARNm de Luc con 3X sitio de unión de miR122 en la 3' UTR)
68	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATAGAAGATA CGAAGAACATCAAGAAGGGACCTACCCCGTTTTACCCTTTGGAGGACGGTACAGCAG GAGAACAGCTCCACAAGCGGATAAAACGCTACGCCCTAGTCCCGGAACGATTGCGT TTACCGATACACATATTGAGGTAGACATCACATACGCAGAATACTTCGAAATATCGG TCAGGCTAGCGGAAGCGATAAAGAGATATAGTCTTAACACTAATCACCGCATCGTCG TCTATTTCGGAGAACTCATTGCAGTTTTTCATAACCGGTCCTTGGAGCACTTTTCATCG GGTTCGCACTCGCGCCAGCGAAGACATCTACAATAAGCGGGAAGTCTTGAATAGCA TAGGAATCTCCAGCCGACGGTCGTCTTTGTCTCCAAAAAGGGGCTACAGAAAATCC TCAACGTCCAGAAGAAGCTCCCCATTATTCAAAGATCATCATTATAGATAGCAAGA CAGATTACCAAGGGTTCCAGTCGATATATACCTTTGTACATCGCATTTGCCGCCAG GGTTTAACGAGTATAACTTCGTCCCCGAGTCATTTGACAGAGATAAAACCATCGCGC TAATTATAAATTCTCGGTAGCACCGGTTTGCCAAAGGGGTCGCGTTGCCCCACC GCACTACTTGTCTACGGTTCTCGCACGCTAGGGATCCTATCTTTGGTAATCAGATCA TTCCCGACACAGCAATCCTATCCGTGCTACCTTTTCATCACGGTTTTGGCATATTCA CGACTCTCGGCTATTTGATTTCGGTTTTTCAGGGTCGTAATTATATATCGGTTTCGAGG AAGAACTATTTTTGAGATCCTTGCAAGATTACAAGATCCAGTCGGCCCTCCTTGTCC CAACGCTTTTCTCATTCTTTGCGAAATCGACACTTATTGATAAGTATAACCTTTCCA ATCTACATAAGATTGCCTCAGGGGGAGCGCCGCTTAGCAAGGAAGTCGGGGAGGCAG TCGCCAAGCGCTTCCACCTTCCCGGAATTTCGGCAGGGATACGGGCTCACGGAGACAA CATCCGCGATCCTTATCACGCCCCGAGGGTCACGATAAGCCGGGAGCCGTCGGAAAAG TCGTCCCCCTTCTTTGAAGCCAAGGTTCGTAGACCTCGACACGGGAAAAACCCTCGGAG TCAACCAGAGGGGGGAGCTCTACGTACAGAGGGCCGATAATCATATCAGGTTACGTCA ATAACCCTAAAGCGACGAATACGCTAATCGACAAGGATAGGTTCGTTGCATTTCGGGAG ACATTGCCTATTGGGATAAGGATAAGCACTTCTTTATCGTAGATCGACTTAAGAGCT TGATCAAATACAAAGGCTATCAGGTAGCGCCTACCGAGCTCGAGTCAATCCTACTCC AGCACCCCAACATTTTCGACGCCGGAGTCGCCGGGTTGCCCGATAACGACGCGGGTC AGCTACCAGCGGCCGTCTGTAGTCCTCGAACATAGGAAAAACAATAACCGAAAAGGAGA TCGTGCACTACGTAGCATCACAAGTCACGACTACGAAGAACTAAGGGGAGGGGTAG TCTTTGTGACGAGGTCCCGAAAGGCTTGACTAGGAAGCTTGACGCTCGCAAAATCC GGGAAATCCTAATTAAGGCAAAAGAGCGGGAAAATCGCTATCTGATAATAGGCTG GAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCTCCTCCCT TCCTGCACCCGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (constructo de ARNm de nst-Luc de control)

SEQ ID NO:	Secuencia
69	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTAGAAA TAGATGCAGCCTCCGTTTACACGCTGCCTGCTGGAGCTGACTTCCTCATGTGTTACT CTGTTGCAGAAGGATATTATTCTCACCGGGAAACTGTGAACGGCTCATGGTACATT AAGATTTGTGTGAGATGTTGGGAAAATATGGCTCCTCCTTAGAGTTCACAGAACTCC TCACACTGGTGAACAGGAAAGTTTCTCAGCGCCGAGTGGACTTTTGCAAAGACCCAA GTGCAATTGGAAAGAAGCAGGTTCCCTGTTTTGCCTCAATGCTAACTAAAAAGCTGC ATTTCTTTCCAAAATCTAATCTCGAGCACCACCACCACCACCGTTGAAATTGATG GGGGATCCCCCATGAGCTCGGCCTCGGGGCTCCGCAGGGGGCACCCGGCAGGTGGGG AAGAAAACATGACAGAAACAGATGCCTTCTATAAAAGAGAAATGTTTGATCCGGCAG AAAAGTACAAAATGGACCACAGGAGGAGAGGAATTGCTTTAATCTTCAATCATGAGA GGTTCTTTTGGCACTTAACACTGCCAGAAAGGCGGGGCACCTGCGCAGATAGAGACA ATCTTACCCGCAGGTTTTTTCAGATCTAGGATTTGAAGTGAAATGCTTTAATGATCTTA AAGCAGAAGAAGTACTGCTCAAAATTCATGAGGTGTCAACTGTTAGCCACGCAGATG CCGATTGCTTTGTGTGTGTCTTCTGAGCCATGGCGAAGGCAATCACATTTATGCAT ATGATGCTAAAATCGAAATTCAGACATTAAGTGGCTTGTTCAAAGGAGACAAGTGTC ACAGCCTGGTTGGAAAAACCAAGATATTTATCATCCAGGCATGTCGGGGAAACAGC ACGATGTGCCAGTCATTCTTTGGATGTAGTAGATTGATAATAGGCTGGAGCCTCGG TGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCTTCTTGCACC CGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGCGGC (constructo de ARNm de caspasa sin sitios de unión de miR)
70	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTAGAAA TAGATGCAGCCTCCGTTTACACGCTGCCTGCTGGAGCTGACTTCCTCATGTGTTACT CTGTTGCAGAAGGATATTATTCTCACCGGGAAACTGTGAACGGCTCATGGTACATT AAGATTTGTGTGAGATGTTGGGAAAATATGGCTCCTCCTTAGAGTTCACAGAACTCC TCACACTGGTGAACAGGAAAGTTTCTCAGCGCCGAGTGGACTTTTGCAAAGACCCAA GTGCAATTGGAAAGAAGCAGGTTCCCTGTTTTGCCTCAATGCTAACTAAAAAGCTGC ATTTCTTTCCAAAATCTAATCTCGAGCACCACCACCACCACCGTTGAAATTGATG GGGGATCCCCCATGAGCTCGGCCTCGGGGCTCCGCAGGGGGCACCCGGCAGGTGGGG AAGAAAACATGACAGAAACAGATGCCTTCTATAAAAGAGAAATGTTTGATCCGGCAG AAAAGTACAAAATGGACCACAGGAGGAGAGGAATTGCTTTAATCTTCAATCATGAGA GGTTCTTTTGGCACTTAACACTGCCAGAAAGGCGGGGCACCTGCGCAGATAGAGACA ATCTTACCCGCAGGTTTTTTCAGATCTAGGATTTGAAGTGAAATGCTTTAATGATCTTA AAGCAGAAGAAGTACTGCTCAAAATTCATGAGGTGTCAACTGTTAGCCACGCAGATG CCGATTGCTTTGTGTGTGTCTTCTGAGCCATGGCGAAGGCAATCACATTTATGCAT ATGATGCTAAAATCGAAATTCAGACATTAAGTGGCTTGTTCAAAGGAGACAAGTGTC ACAGCCTGGTTGGAAAAACCAAGATATTTATCATCCAGGCATGTCGGGGAAACAGC ACGATGTGCCAGTCATTCTTTGGATGTAGTAGATTGATAATAGGCTGGAGCCTCGG TGGCCATGCTTCTTGCCCTTGGGCCTCCCCCAGCCCCCTCCTCCCTTCTTGCACC CGTACCCCCCAAACACCATTTGTCACACTCCAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGG GCGGC (Construcción de ARNm de caspasa con 1X sitio de unión de miR122 en la 3' UTR)

SEQ ID NO:	Secuencia
71	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCATGGTAGAAA TAGATGCAGCCTCCGTTTACACGCTGCCTGCTGGAGCTGACTTCCTCATGTGTACT CTGTTGCAGAAGGATATTATTCTCACCAGGAACTGTGAACGGCTCATGGTACATTC AAGATTTGTGTGAGATGTTGGGAAAATATGGCTCCTCCTTAGAGTTCACAGAACTCC TCACACTGGTGAACAGGAAAGTTTCTCAGCGCCGAGTGGACTTTTGCAAAGACCCAA GTGCAATTGGAAAGAAGCAGGTTCCCTGTTTTGCCTCAATGCTAACTAAAAAGCTGC ATTTCTTTCCAAAATCTAATCTCGAGCACCACCACCACCACCACGTTGAAATTGATG GGGGATCCCCCATGAGCTCGGCCTCGGGGCTCCGCAGGGGGCACCCGGCAGGTGGGG AAGAAAACATGACAGAAACAGATGCCTTCTATAAAAGAGAAATGTTGATCCGGCAG AAAAGTACAAAATGGACCACAGGAGGAGAGGAATTGCTTTAATCTCAATCATGAGA GGTTCTTTTGGCACTTAACACTGCCAGAAAGGCGGGGCACCTGCCGAGATAGAGACA ATCTTACCCGCAGGTTTTTCAGATCTAGGATTTGAAGTGAATGCTTTAATGATCTTA AAGCAGAAGAAGTACTGCTCAAAATTCATGAGGTGTCAACTGTTAGCCACGCAGATG CCGATTGCTTTGTGTGTCTTCTGAGCCATGGCGAAGGCAATCACATTTATGCAT ATGATGCTAAAATCGAAATTCAGACATTAAGTGGCTTGTTCAAAGGAGACAAGTGTC
	ACAGCCTGGTTGGAAAACCAAGATATTTATCATCCAGGCATGTCGGGGAAACCAGC ACGATGTGCCAGTCATTCTTTGGATGTAGTAGATTGATAATAGCAAACACCATTTGT CACACTCCAGCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTGGGCCCCAACACCA TTGTACACTCCATCCCCCAGCCCCCTCTCCCTTCTGACCCGTACCCCCAAA CACCATTGTCACACTCCAGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (Construcción de ARNm de caspasa con 3X sitio de unión de miR122 en la 3' UTR)
72	GGGAAATAAGAGAGAAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACCAAGGGTAGAAA TAGATCCAGCCTCCGTTTACACGTTGCTTGTGGAGTTGACTTCCTCTTGTCTTACT TTGTTGCAGAAGGATATTATTCTCACCAGGAAATTGTCAACGGCTCATTGTACATTC AAGATTTGTCTCAGATCTTGGGAAAATAGCGCTCCTCCTTAGAGTTCACAGAACTCC TCACATTGGTCAACAGGAAAGTTTCTCAGCGCCGAGTCGACTTTTGCAAAGACCCAA GTCCAATTGGAAAGAAGCAGGTTCCCTTGTGTTTTGCCTCATTGCTAACTAAAAAGTTGC ATTTCTTTCCAAAATCTAATCTCGAGCACCACCACCACCACCACGTTGAAATTGATT GGGGATCCCCCATTAGCTCGGCCTCGGGGCTCCGCAGGGGGCACCCGGCAGGTGCGG AAGAAAACATTACAGAAACAGATTCTTCTATAAAAGAGAAATCTTTGATCCGGCAG AAAAGTACAAAATCGACCACAGGAGGAGAGGAATTGCTTTAATCTCAATCATCAGA GGTTCTTTTGGCACTTAACATTGCGAGAAAGGCGGGGCACTTGCGCAGATAGAGACA ATCTTACCCGCAGGTTTTTCAGATCTAGGATTTGAAGTCAAATCCTTTAATCATCTTA AAGCAGAAGAAGTATTGCTCAAAATTCATCAGGTCTCAATTGTTAGCCACGCAGATC CCGATTGCTTTGTCTCTCTCTTCTTGGAGCCATCGCGAAGGCAATCACATTTATCCAT ATCATCTTAAATCGAAATTCAGACATTAATTGGCTTGTTCAAAGGAGACAAGTCTC ACAGCTTGGTTGGAAAACCAAGATATTTATCATCCAGGCATCTCGGGGAAACCAGC ACGATTTGCCAGTCATTCTTTGGATCTAGTAGATTGATAATAGGCTGGAGCCTCGG TGGCCATGCTTCTTGCCCCCTGGGGCTCCCCCAGCCCCCTCTCCCTTCTGACCC CGTACCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC (construcción de ARNm de nst-caspasa de control)
73	<u>UGAUAAUAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUC</u> UUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCUGUACCCCCCGC <u>AUUAAUACUCACGGUACGAGUGGUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC</u> (3' UTR con sitios de unión de miR 142-3p y miR 126-3p)
74	ACCCCUAUCACAAUAGCAUUA (sitio de unión de miR 155-5p)
75	<u>UGAUAAUAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUUC</u> UUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACUCCCCCAGCCCCUCCUCC CUUCCUGCACCUGUACCCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGUGGUCUUUGAAUA AAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con 3 sitios de unión de miR 142-3p)

SEQ ID NO:	Secuencia
76	UGAUAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAG CCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC<u>AGUAGUCGUUCUACUUUAUG</u>GUGGU CUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-5p)
77	UGAUAUAG<u>AGUGGCUUCUACUUUAUG</u>GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUCUUG GCCCCUUGGGCC<u>AGUAGUCGUUCUACUUUAUG</u>UCCCCCAGCCCCUCUCCCCUCC UGCACCCGUACCCCC<u>AGUAGUCGUUCUACUUUAUG</u>GUGGUCUUUGAAUAAAGUCUG AGUGGGCGGC (3' UTR con 3 sitios de unión de miR 142-5p)
78	UGAUAUAG<u>AGUAGUCGUUCUACUUUAUG</u>GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUCUUG GCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCU UCCUGCACCCGUACCCCC<u>AGUAGUCGUUCUACUUUAUG</u>GUGGUCUUUGAAUAAAGU CUGAGUGGGCGGC (3' UTR con 2 sitios de unión de miR 142-5p y un sitio de unión de miR 142-3p)
79	UGAUAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUCUUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAG CCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCC<u>ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUA</u>GUG GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 155-5p)
80	UGAUAUAG<u>ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUA</u>GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUCU UUGCCCCUUGGGCC<u>ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUA</u>UCCCCCAGCCCCUCCUCCC CUUCCUGCACCCGUACCCCC<u>ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUA</u>GUGGUCUUUGAAUA AAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con 3 sitios de unión de miR 155-5p)
81	UGAUAUAG<u>ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUA</u>GCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUCU UUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUCCCCCAGCCCCUCCUCCC CUUCCUGCACCCGUACCCCC<u>ACCCCUAUCACAAUUAGCAUUA</u>GUGGUCUUUGAAUA AAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con 2 sitios de unión de miR 155-5p y un sitio de unión de miR 142-3p)
82	UGAUAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAUGCUCU UUGCCCCUUGGGCCUCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCCGUG GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-3p , inserción en la P2)
83	UGAUAUAGGCUGGAGCCUCGGUGGCCAUGCUCUUGCCCCUUGGGCCUCCAUAAAG <u>UAGGAAACACUACA</u>UCCCCCAGCCCCUCCUCCCCUCCUGCACCCGUACCCCCGUG GUCUUUGAAUAAAGUCUGAGUGGGCGGC (3' UTR con un sitio de unión de miR 142-3p , inserción en la P3)
84	GGGAAUAAGAGUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAAGAAAAGAGUAAGAAGAAA UAUAAGAGCCACC (5' UTR con un sitio de unión de miR142-3p en la posición p1)
85	GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAUCCAUAAAGUAGGAAACACUACAGAAGAAA UAUAAGAGCCACC (5' UTR con un sitio de unión de miR142-3p en la posición p2)
86	GGGAAUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAAGAAGAAUUAUAAUCCAUAAAGUAGGAAACA CUACAGAGCCACC (5' UTR con un sitio de unión de miR142-3p en la posición p3)
Codón de parada = negrita sitio de unión de miR 142-3p = subrayado sitio de unión de miR 126-3p = negrita subrayado	

SEQ ID NO:	Secuencia
sitio de unión de miR 122-5p = doble subrayado sitio de unión de miR 155-5p = sombreado sitio de unión de miR 142-5p = subrayado sombreado y negrita	

REIVINDICACIONES

1. Un ARN mensajero (ARNm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNm comprende:

- 5 (i) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p;
(ii) al menos un sitio de unión de miR-126; o
(iii) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de miR-126, opcionalmente donde el ARNm comprende una o más nucleobases modificadas, para usar en un procedimiento para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpo antidrogas en un sujeto, el procedimiento comprende
10 administrar el ARNm al sujeto de tal manera que una respuesta de anticuerpo antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

2. Un ARN mensajero modificado (ARNm) que codifica un polipéptido de interés, donde el ARNm comprende:

- 15 (i) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p;
(ii) al menos un sitio de unión de miR-126; o
(iii) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de miR-126,

y donde el ARNm comprende una o más nucleobases modificadas, para su uso en un procedimiento de reducción o
20 inhibición de la toxicidad relacionada con fármacos en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar el ARNm al sujeto, de modo tal que la toxicidad relacionada con fármacos para el polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

3. El ARNm para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ARNm se administra por vía
25 intravenosa encapsulado en una nanopartícula lipídica, opcionalmente mediante una infusión semanal.

4. Un ARNm modificado que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP (nanopartícula lipídica), donde el ARNm comprende:

- 30 (i) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p;
(ii) al menos un sitio de unión de miR-126; o
(iii) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de miR-126 y

donde el ARNm comprende una o más nucleobases modificadas;

35 para su uso en un procedimiento para reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antidrogas después de la administración repetida del polipéptido de interés a un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis del ARNm encapsulado y administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis del ARNm encapsulado en una LNP, de modo tal que una respuesta de anticuerpos antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

40 5. Un ARNm modificado que codifica un polipéptido de interés encapsulado en una LNP, donde el ARNm comprende:

- 45 (i) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p;
(ii) al menos un sitio de unión de miR-126; o
(iii) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de miR-126, y

donde el ARNm comprende una o más nucleobases modificadas,

50 para su uso en un procedimiento de reducir o inhibir una respuesta de anticuerpos antidrogas después de la administración repetida del polipéptido de interés a un sujeto, comprendiendo el procedimiento

(i) administrar al sujeto por vía intravenosa una primera dosis de la LNP del ARNm encapsulado,
(ii) detectar un nivel de anticuerpos antidrogas en una muestra de un sujeto; y
(iii) administrar al sujeto por vía intravenosa una segunda dosis de ARNm encapsulado en una LNP cuando el
55 nivel de anticuerpos antidrogas en la muestra disminuye, de modo tal que una respuesta de anticuerpo antidrogas al polipéptido de interés se reduce o inhibe en el sujeto.

6. El ARNm para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ARNm comprende una 5' UTR, un marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés, una 3' UTR que
60 comprende

- (i) el al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p;
- (ii) el al menos un sitio de unión de miR-126; o
- (iii) el al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de miR-126, y una

donde el ARNm comprende una 5' UTR y una 3' UTR que son heterólogas a la región de codificación, y/o donde el ARNm está completamente modificado.

7. El ARNm para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ARNm comprende pseudouridina (ψ), pseudouridina (ψ) y 5-metil-citidina (m5C), 1-metil-pseudouridina (m1 ψ), 1-metil-pseudouridina (m1 ψ) y 5-metil-citidina (m5C), 2-tiouridina (s2U), 2-tiouridina y 5-metil-citidina (m5C), 5-metoxi-uridina (mo5U), 5-metoxi-uridina (mo5U) y 5-metil-citidina (m5C), 2'-O-metil uridina, 2'-O-metil uridina y 5-metil-citidina (m5C), N6-metil-adenosina (m6A) o N6-metil-adenosina (m6A) y 5-metil-citidina (m5C).

8. El ARNm para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ARNm comprende pseudouridina (ψ), N1-metilpseudouridina (m1 ψ), 2-tiouridina, 4'-tiouridina, 5-metilcitosina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 4-tio-pseudouridina, 5-aza-uridina, dihidropseudouridina, 5-metoxiuridina o 2'-O-metil uridina, o combinaciones de los mismos.

9. El ARNm para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ARNm comprende 1-metil-pseudouridina (m1 ψ), 5-metoxi-uridina (mo5U), 5-metil-citidina (m5C), pseudouridina (ψ), α -tio-guanosina o α -tio-adenosina, o combinaciones de los mismos.

10. El ARNm para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido de interés es una proteína terapéutica, una citoquina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o una proteína de fusión, y/o, El ARNm está en una nanopartícula lipídica y/o donde la nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico y/o ionizable, opcionalmente donde el lípido catiónico y/o ionizable es DLin-KC2-DMA o DLin-MC3-DMA.

11. El ARNm para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde

- (a) el ARNm comprende al menos un sitio de unión de microARN miR-142-3p que comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 3 o
- (b) el ARNm comprende al menos dos sitios de unión de microARN, donde al menos uno de los sitios de unión de microARN es un sitio de unión de microARN miR-142-3p, opcionalmente donde el ARNm comprende un sitio de unión de miR-142-3p y un segundo sitio de unión de microARN para un miR seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-142-5p, miR-146-3p, miR-146-5p, miR-155, miR-126, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27 o
- (c) el ARNm comprende al menos un sitio de unión de microARN miR-126 que comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 26 o
- (d) el ARNm comprende al menos dos sitios de unión de microARN, donde al menos uno de los sitios de unión de microARN es un sitio de unión de microARN miR-126, opcionalmente donde el ARNm comprende un sitio de unión de miR-126 y un segundo sitio de unión de microARN para un miR seleccionado de entre el grupo que consiste en miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146-3p, miR-146-5p, miR-155, miR-16, miR-21, miR-223, miR-24 y miR-27 o
- (e) el constructo de ARNm comprende un sitio de unión de miR-126 y un sitio de unión de miR-142-3p.

12. El ARNm para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el constructo de ARNm comprende tres sitios de unión de miR-142-3p o tres sitios de unión de miR-126.

13. El ARNm para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el marco de lectura abierto optimizado por codón que codifica el polipéptido de interés comprende un codón de parada y donde el

- (i) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p;
- (ii) al menos un sitio de unión de miR-126; o
- (iii) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de miR-126 se encuentran dentro de la 3' UTR (a) 30-50 nucleótidos después del codón de parada o (b) al menos 50 nucleótidos después del codón de parada.

14. El ARNm para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el
- 5 (i) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p;
(ii) al menos un sitio de unión de miR-126; o
(iii) al menos un sitio de unión de microARN de miR-142-3p y al menos un sitio de unión de miR-126 se ubica dentro de una UTR 5' del constructo de ARNm.

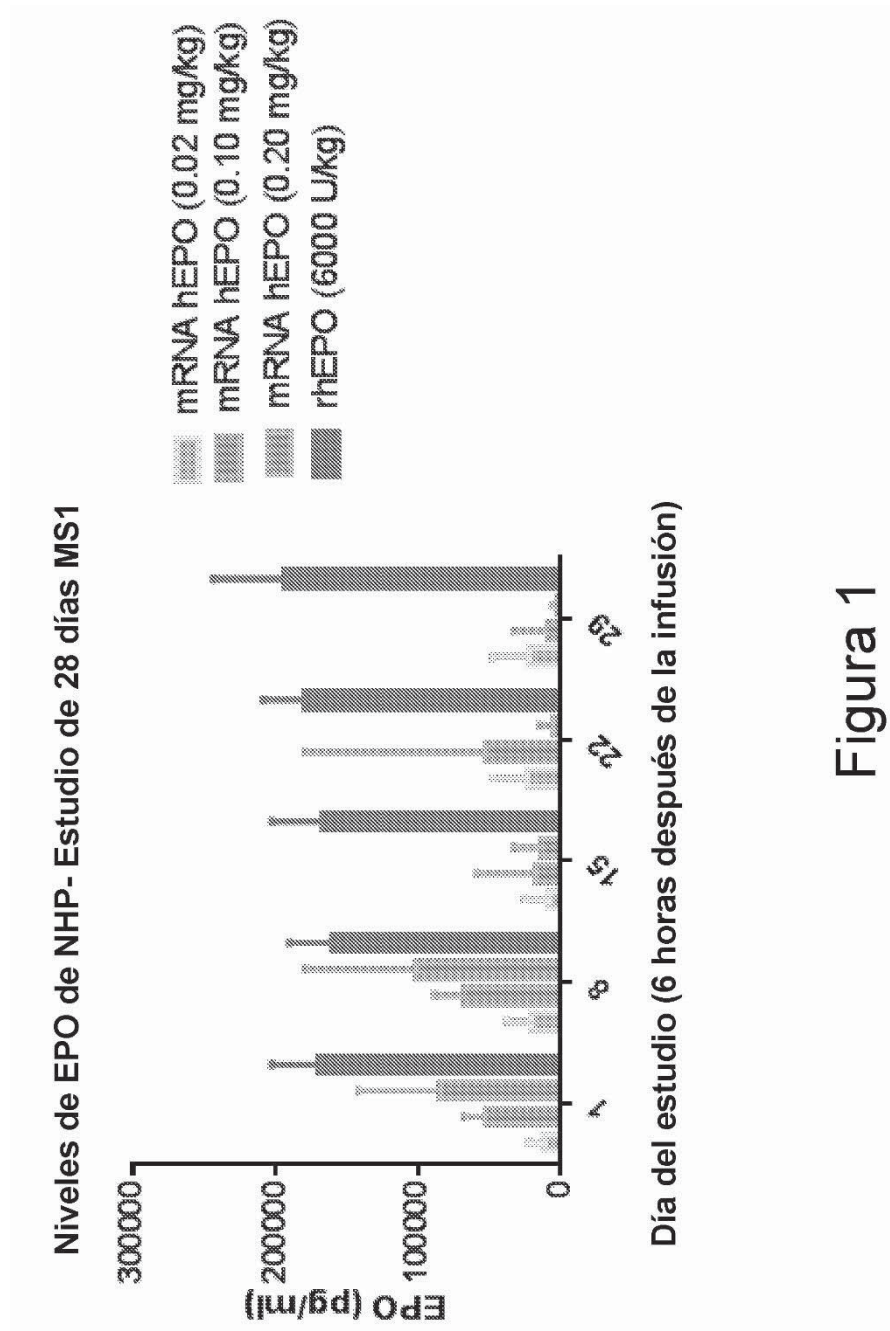


Figura 1

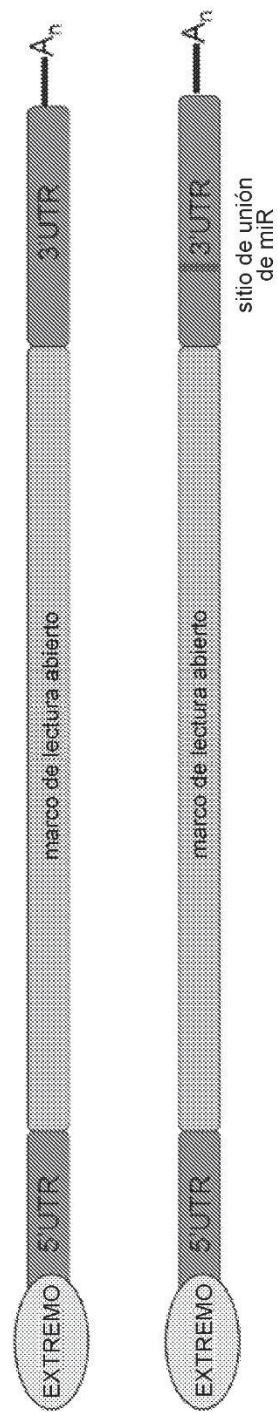


Figura 2

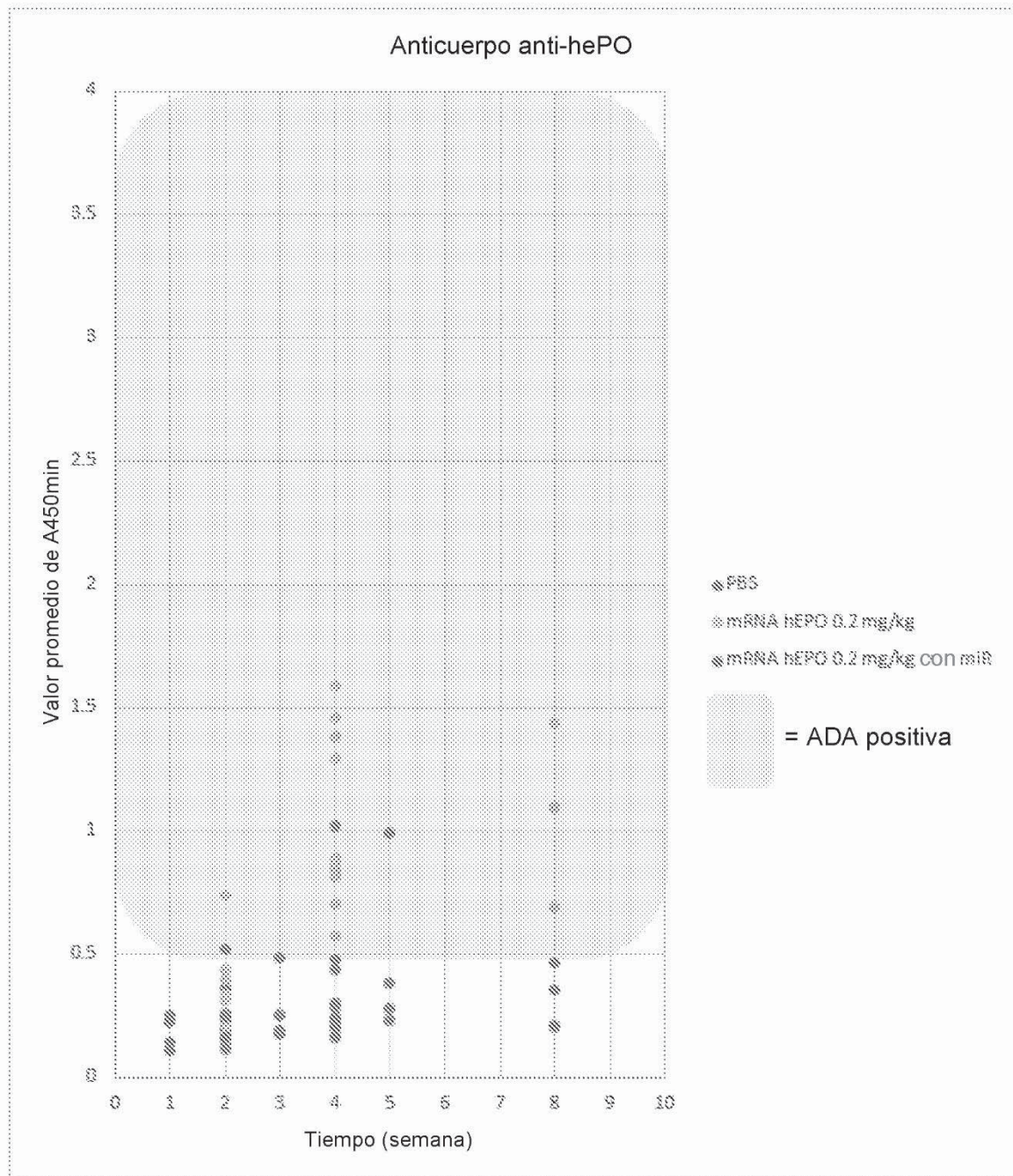
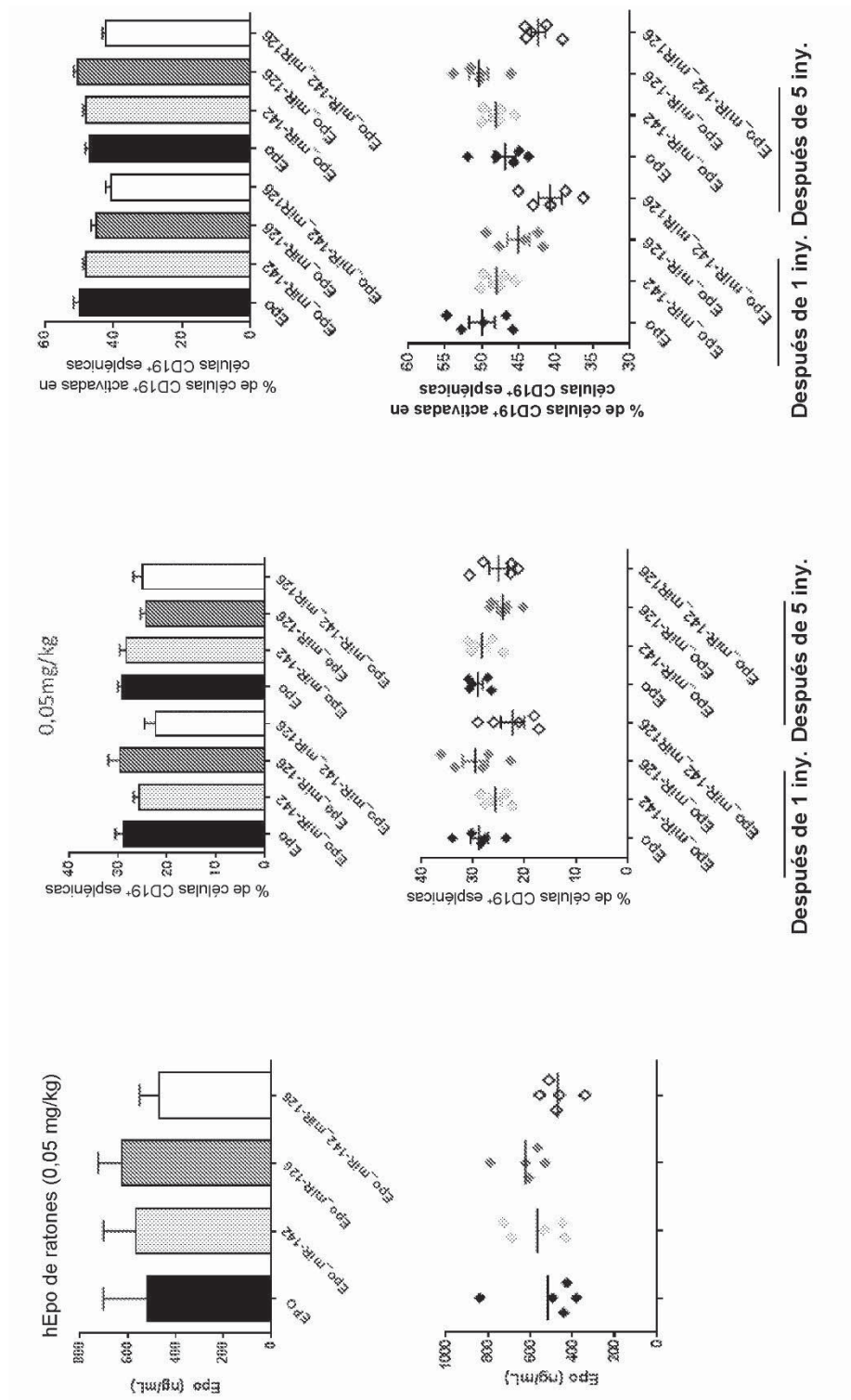
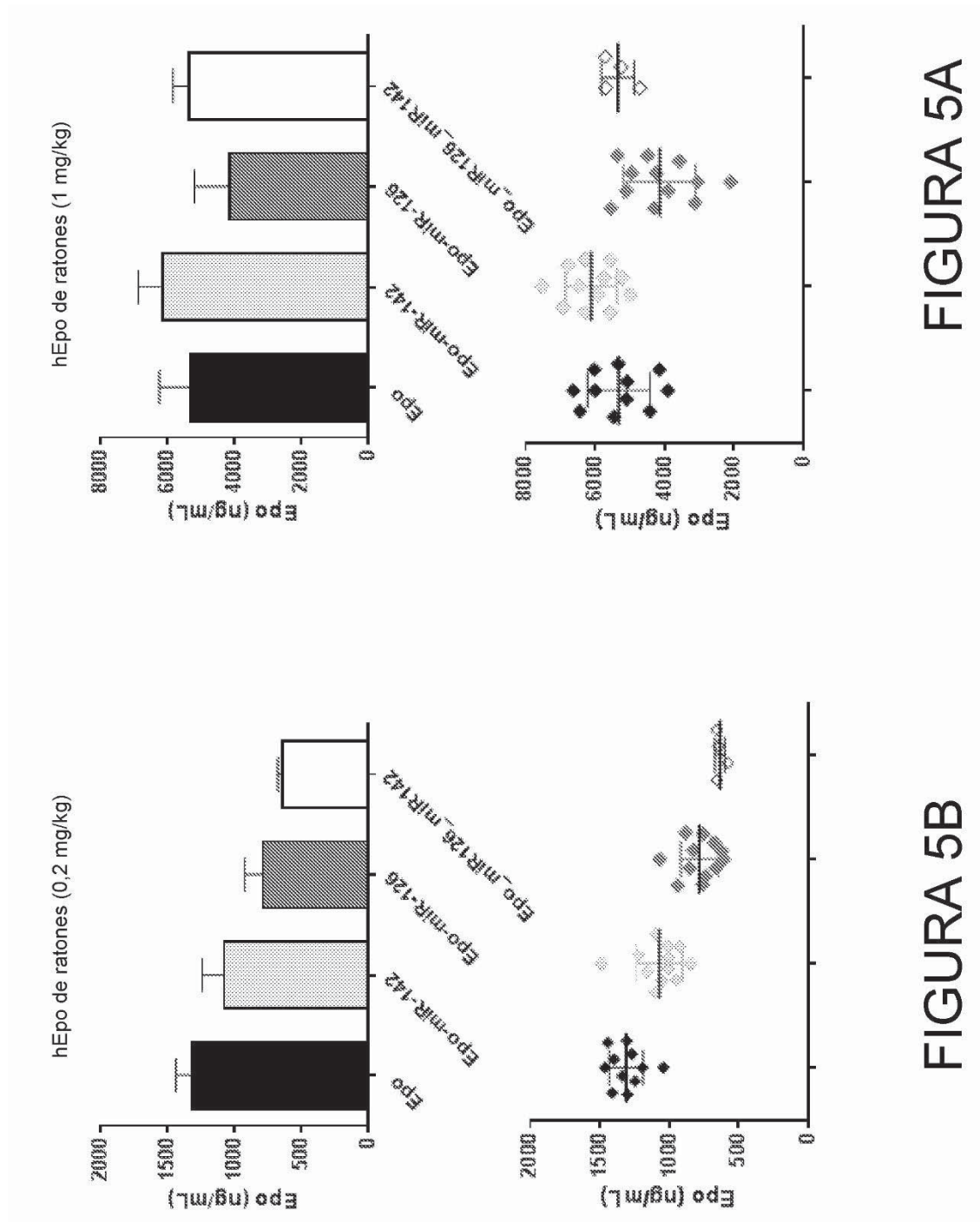


Figura 3





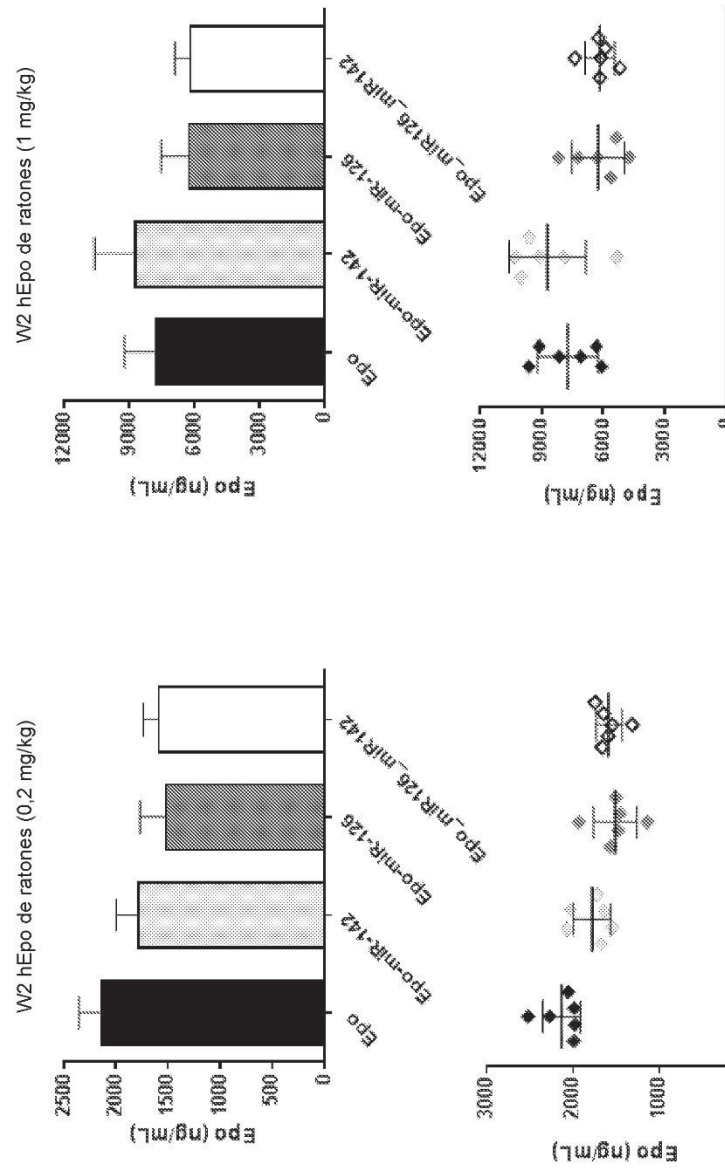


FIGURA 6A

FIGURA 6B

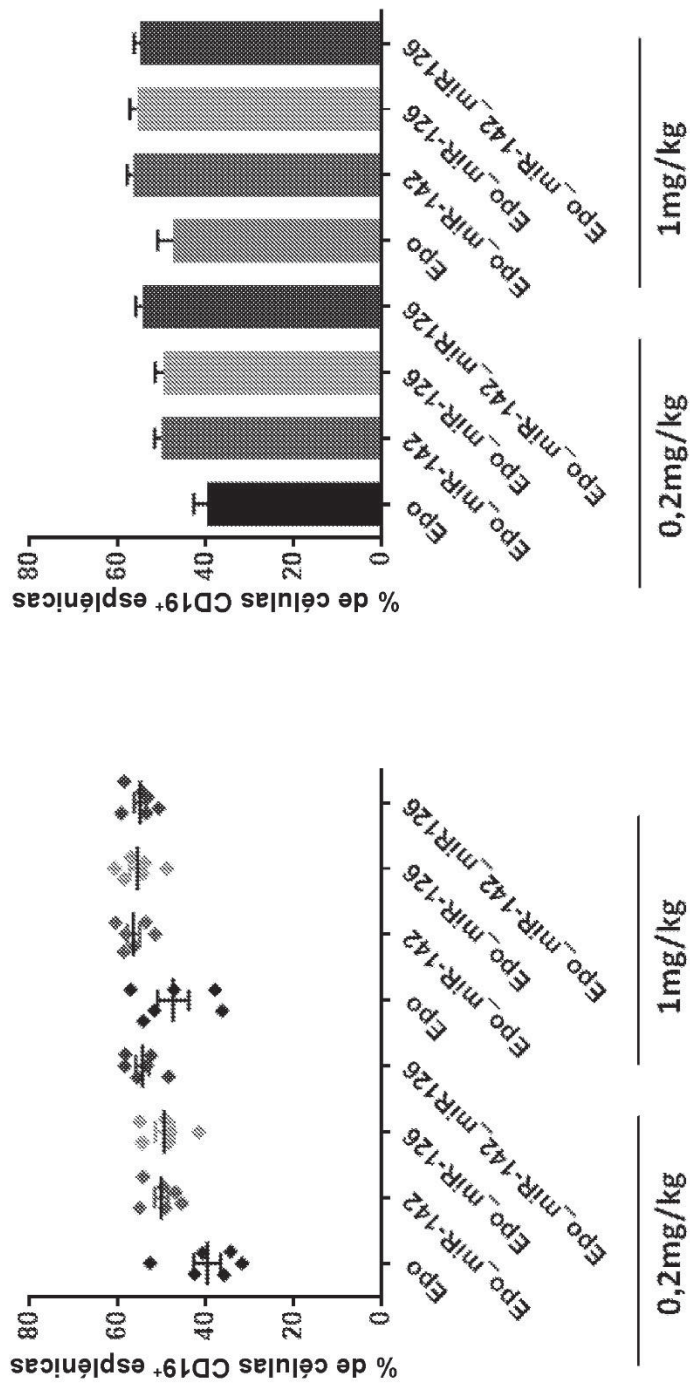
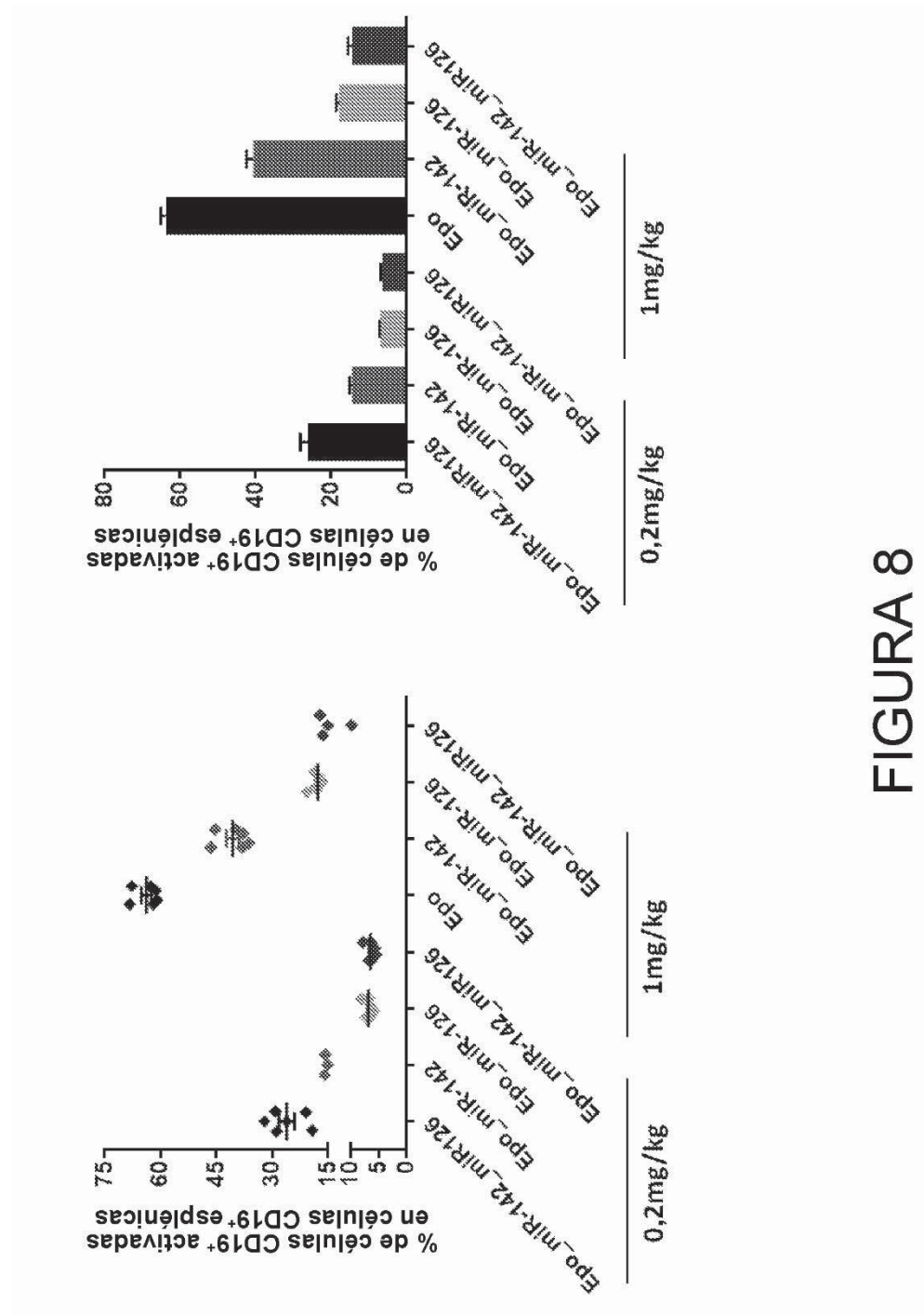


FIGURA 7



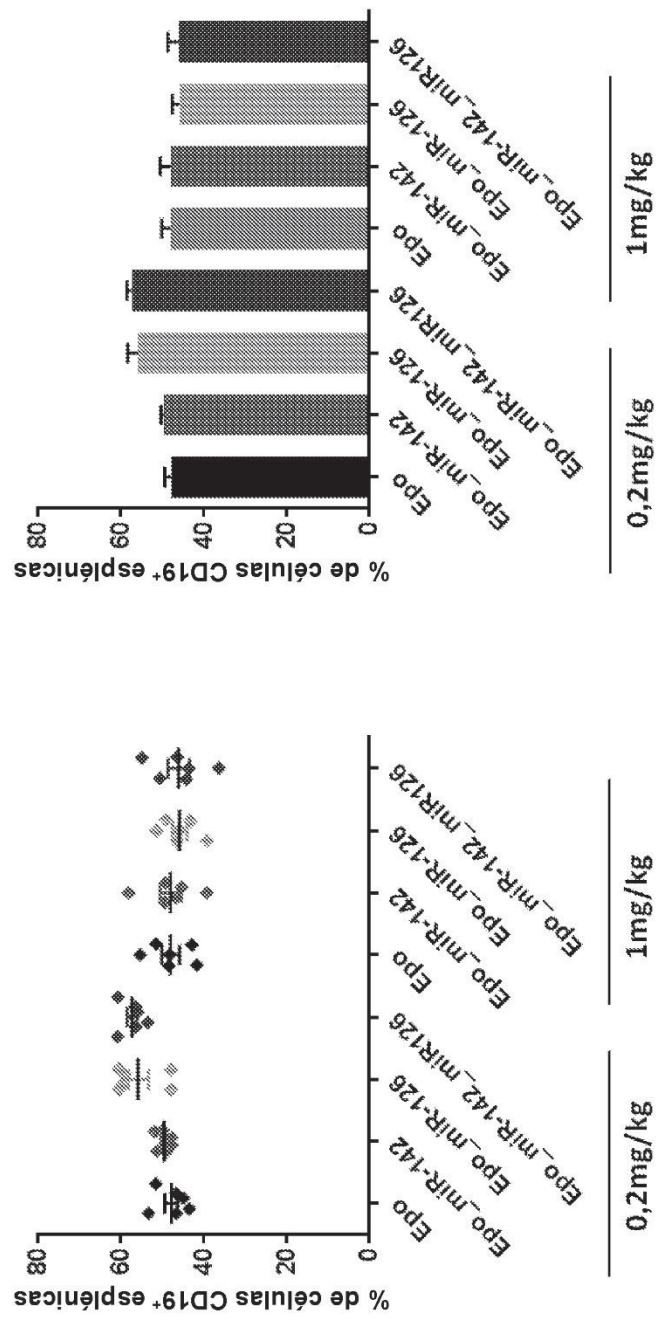


FIGURA 9

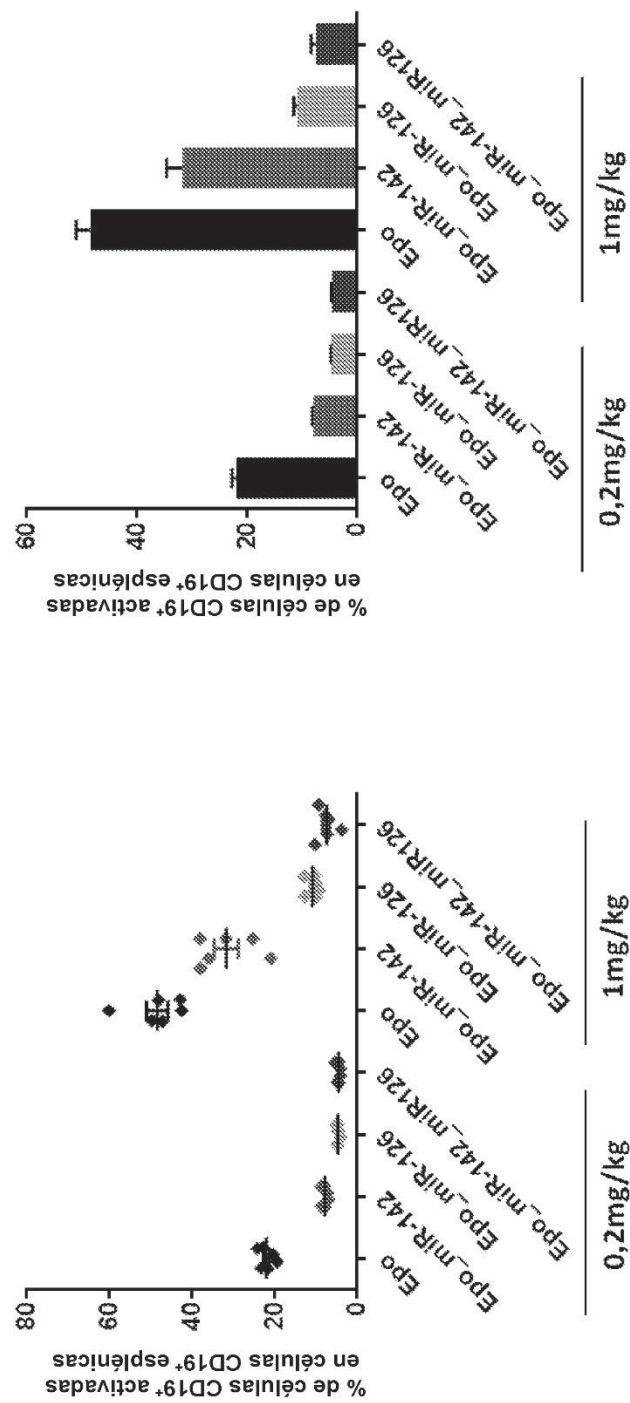


FIGURA 10

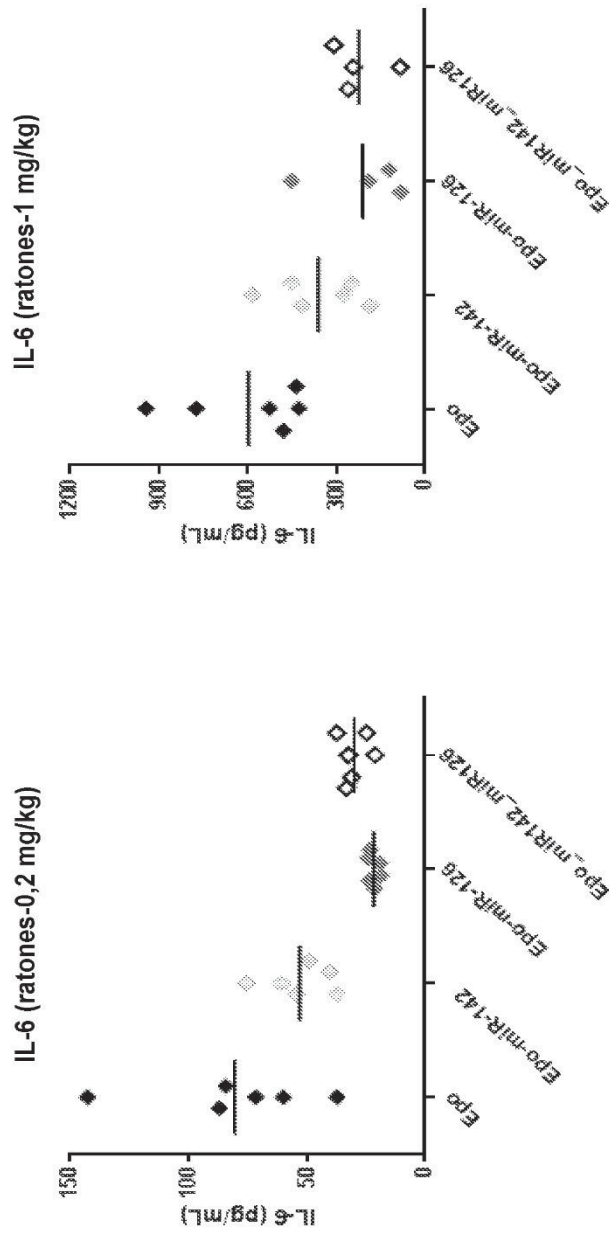


FIGURA 11A

FIGURA 11B

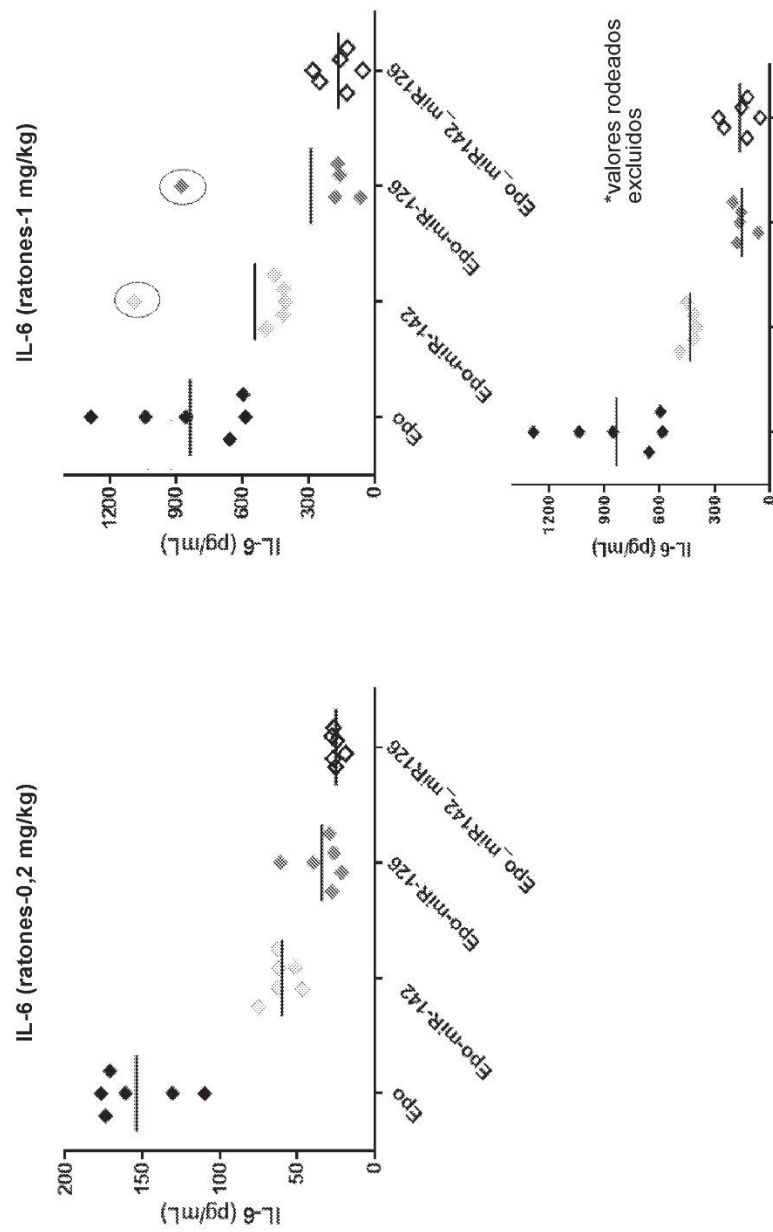


FIGURA 12B

FIGURA 12A

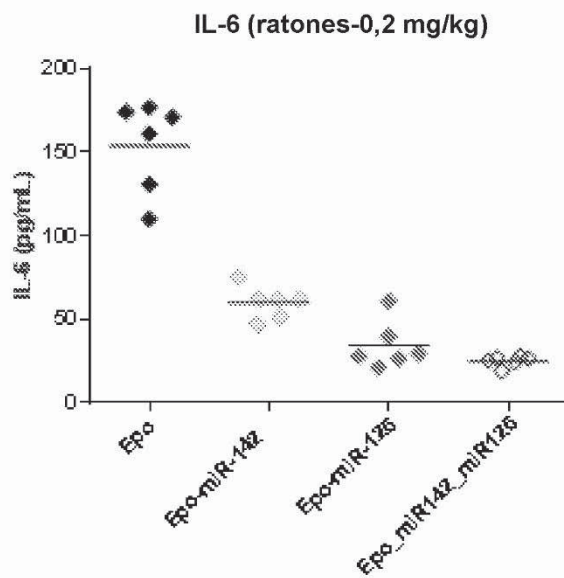


FIGURA 13A

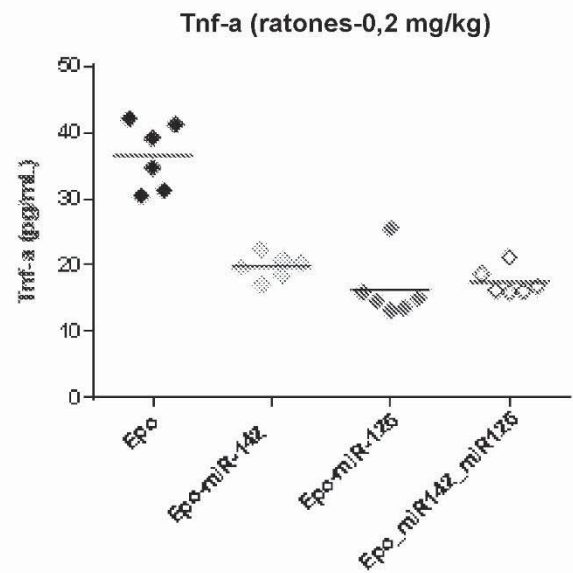


FIGURA 13B

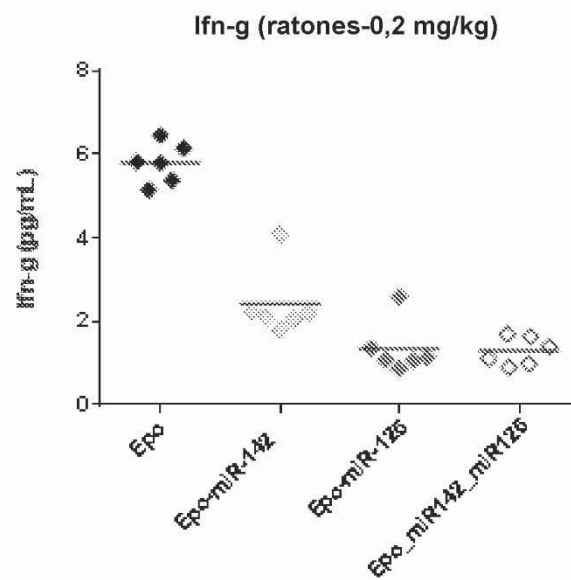


FIGURA 13C



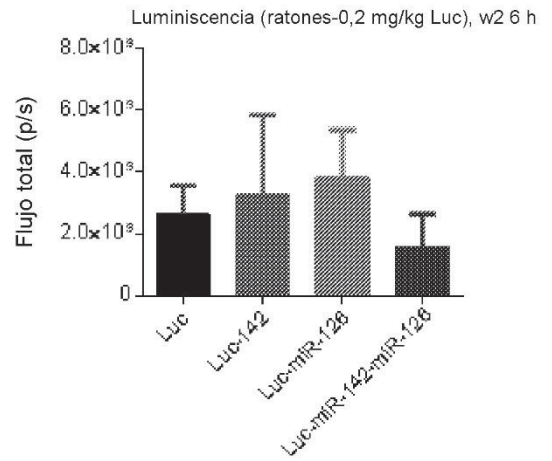
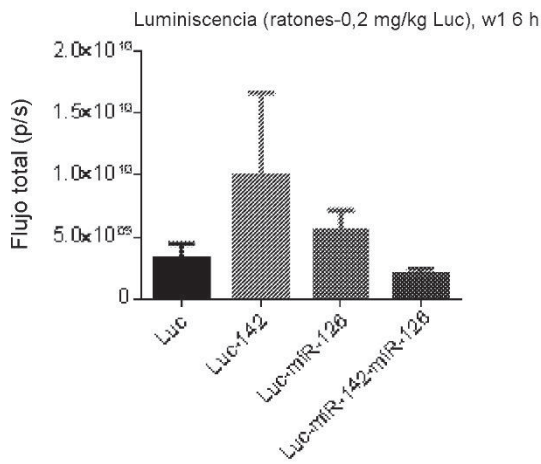
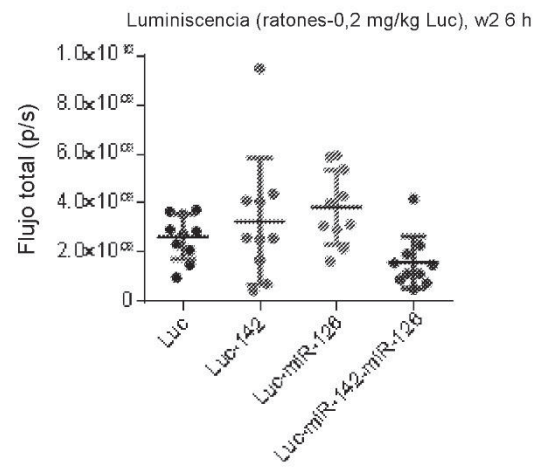
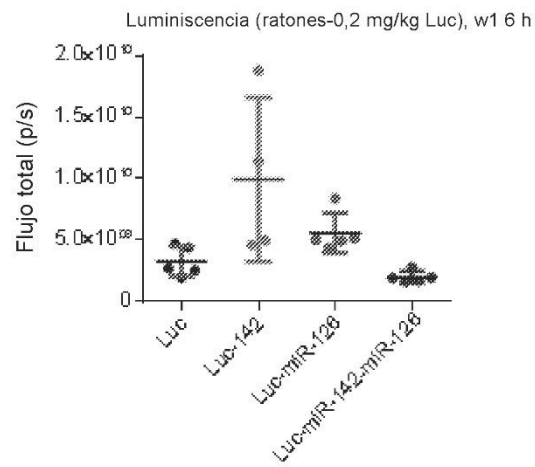
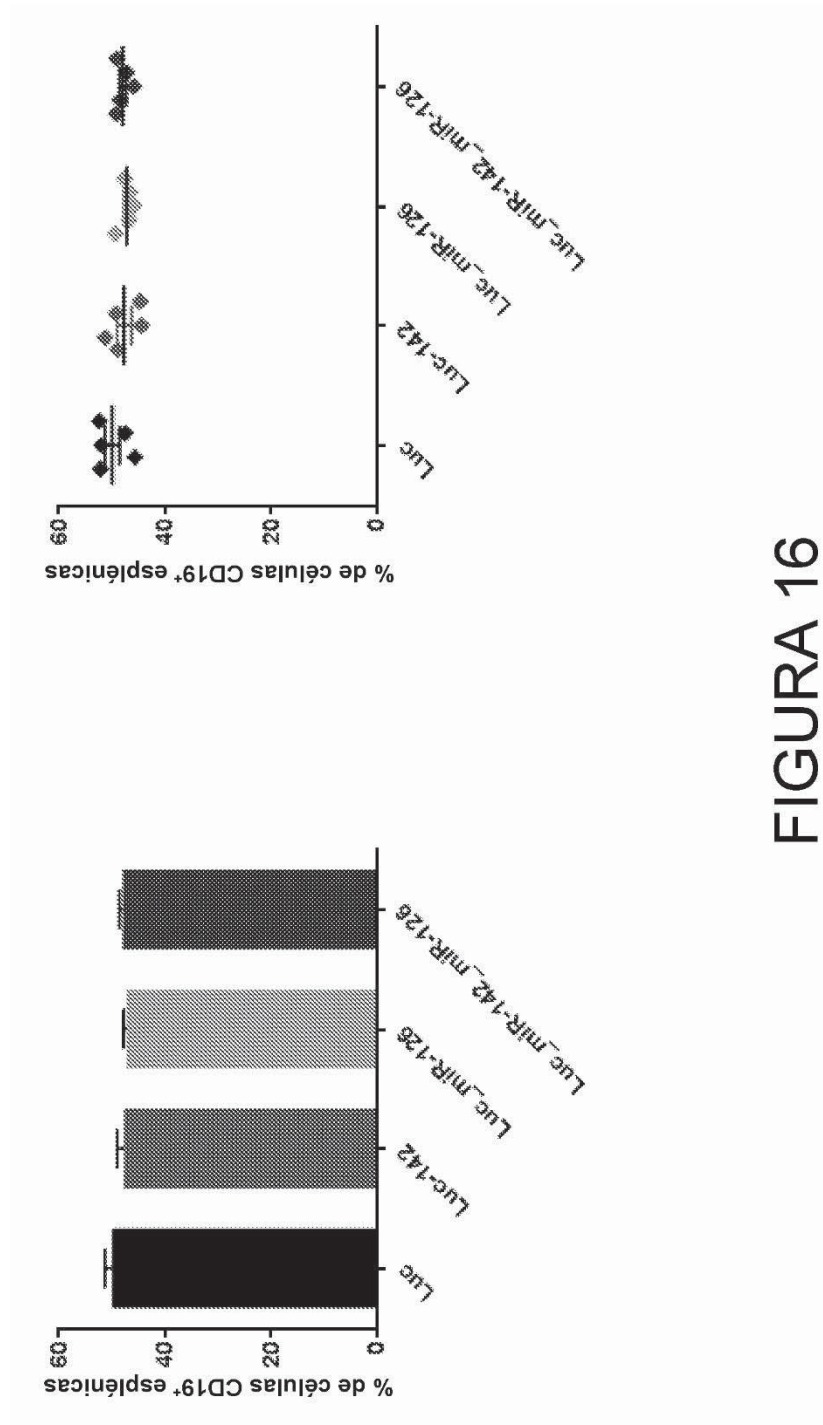
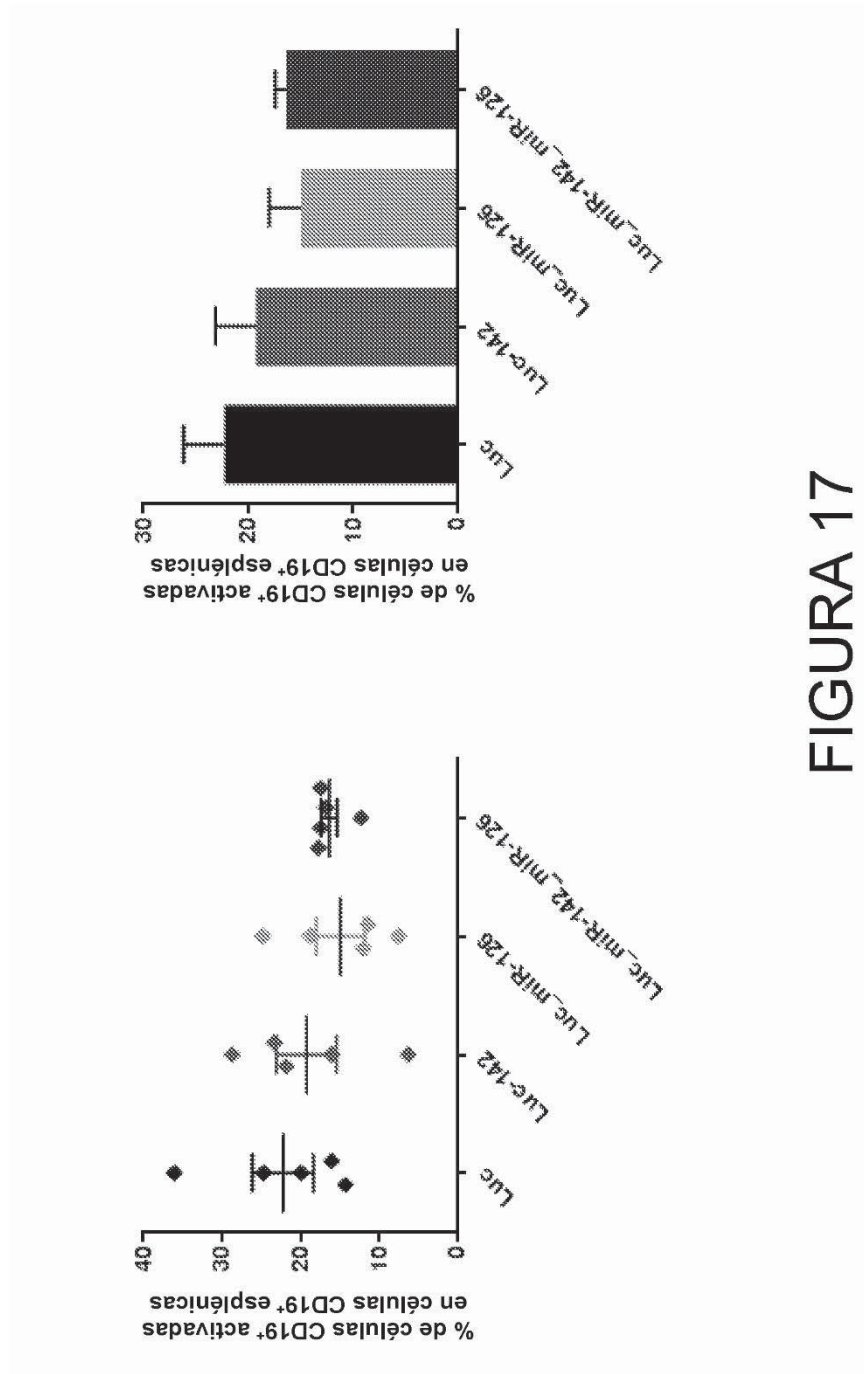
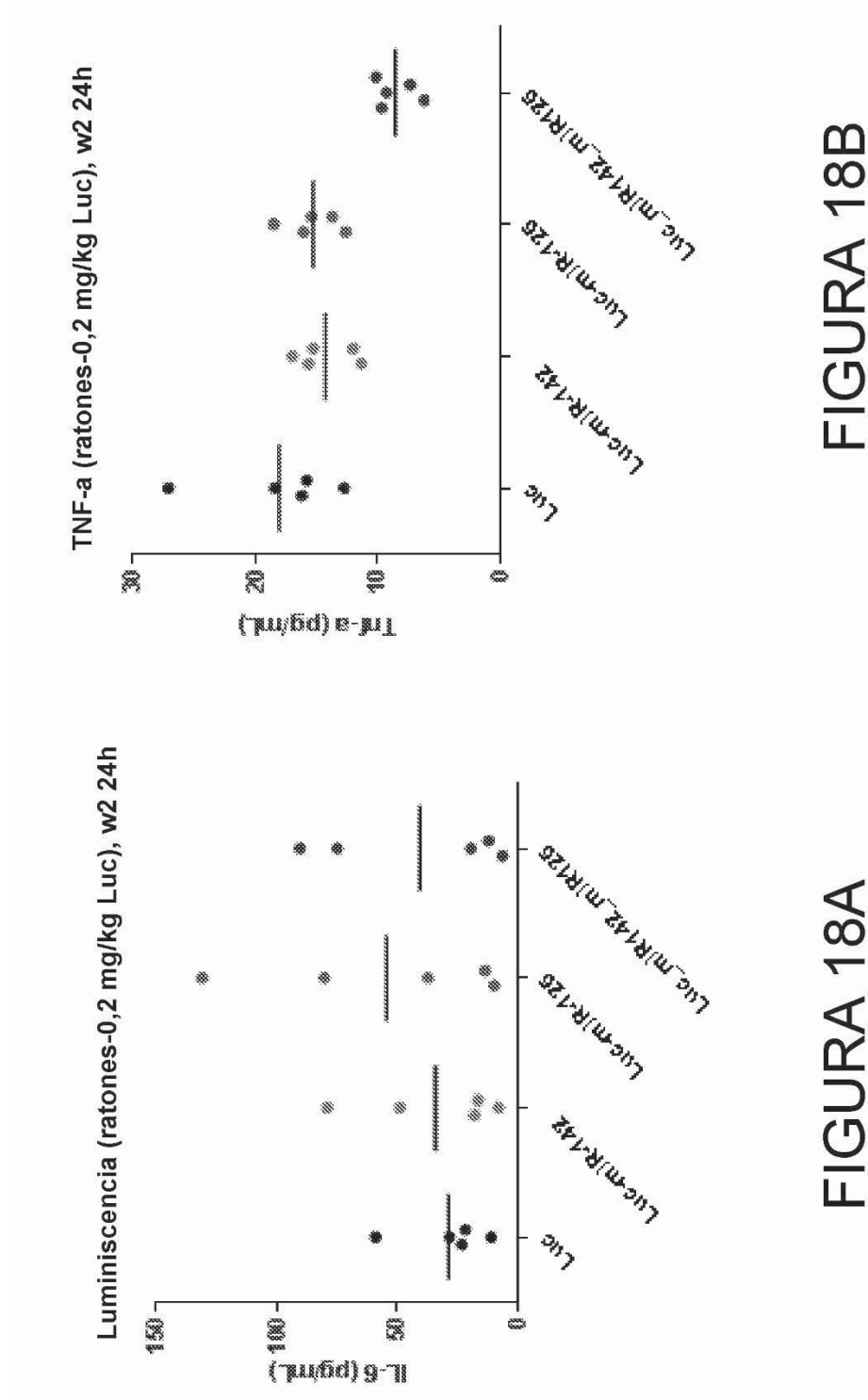


FIGURA 15A

FIGURA 15B







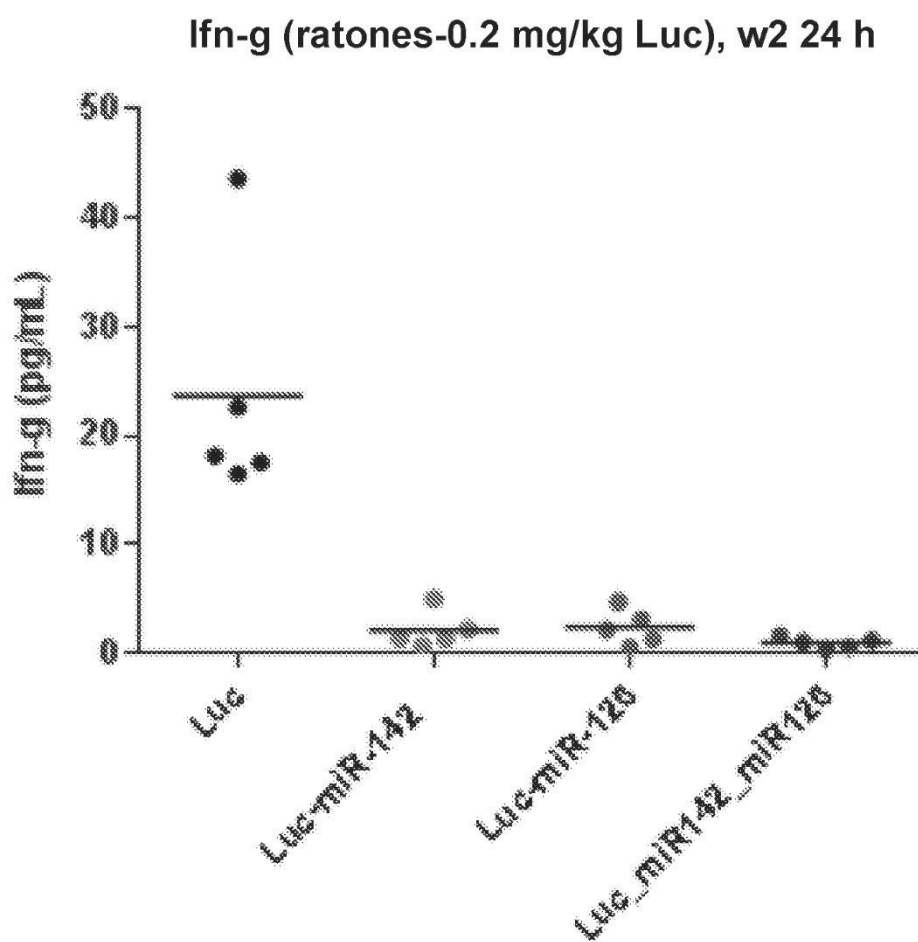


FIGURA 18C

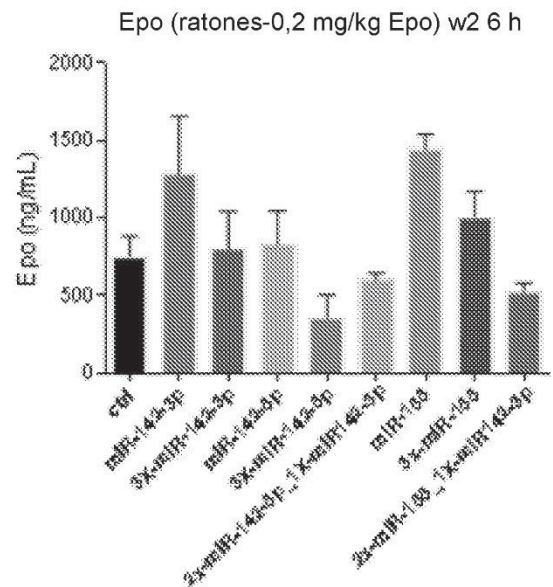
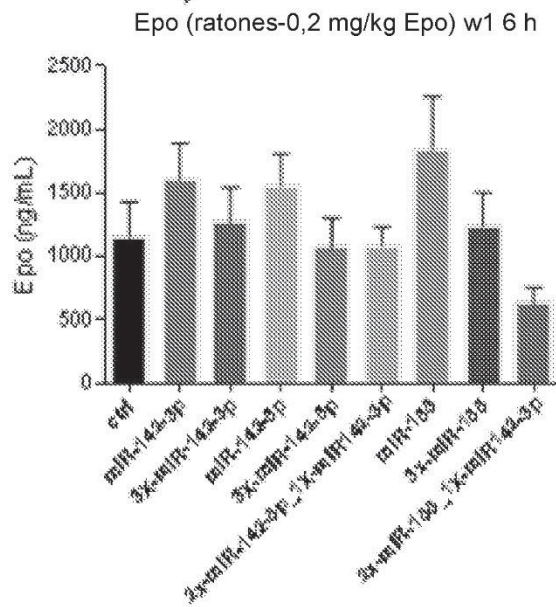
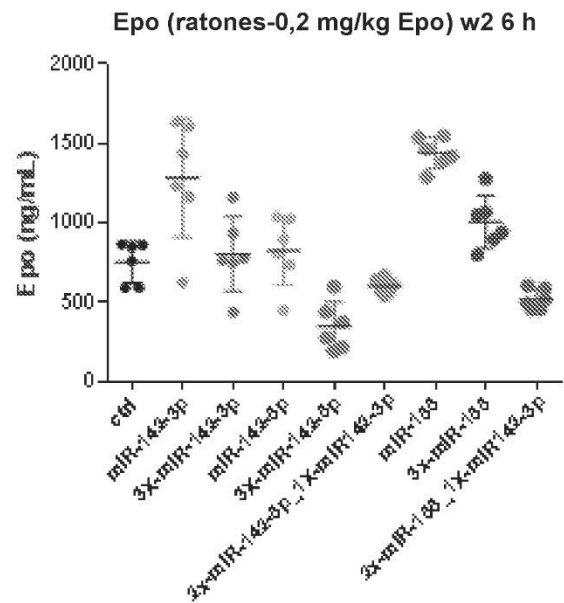
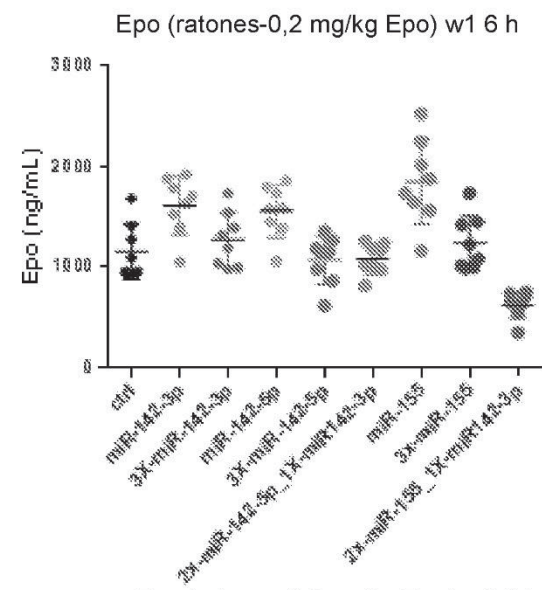
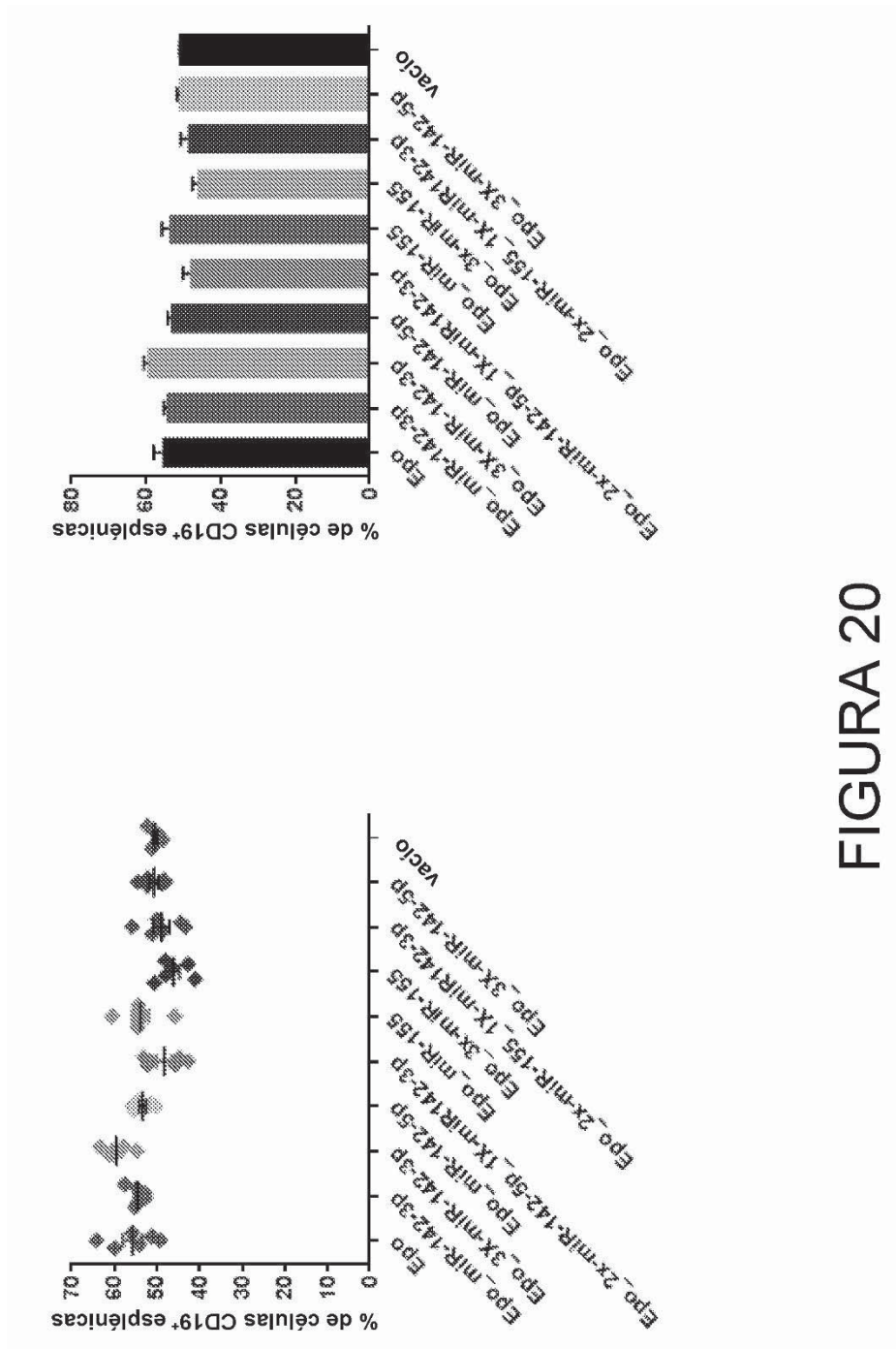
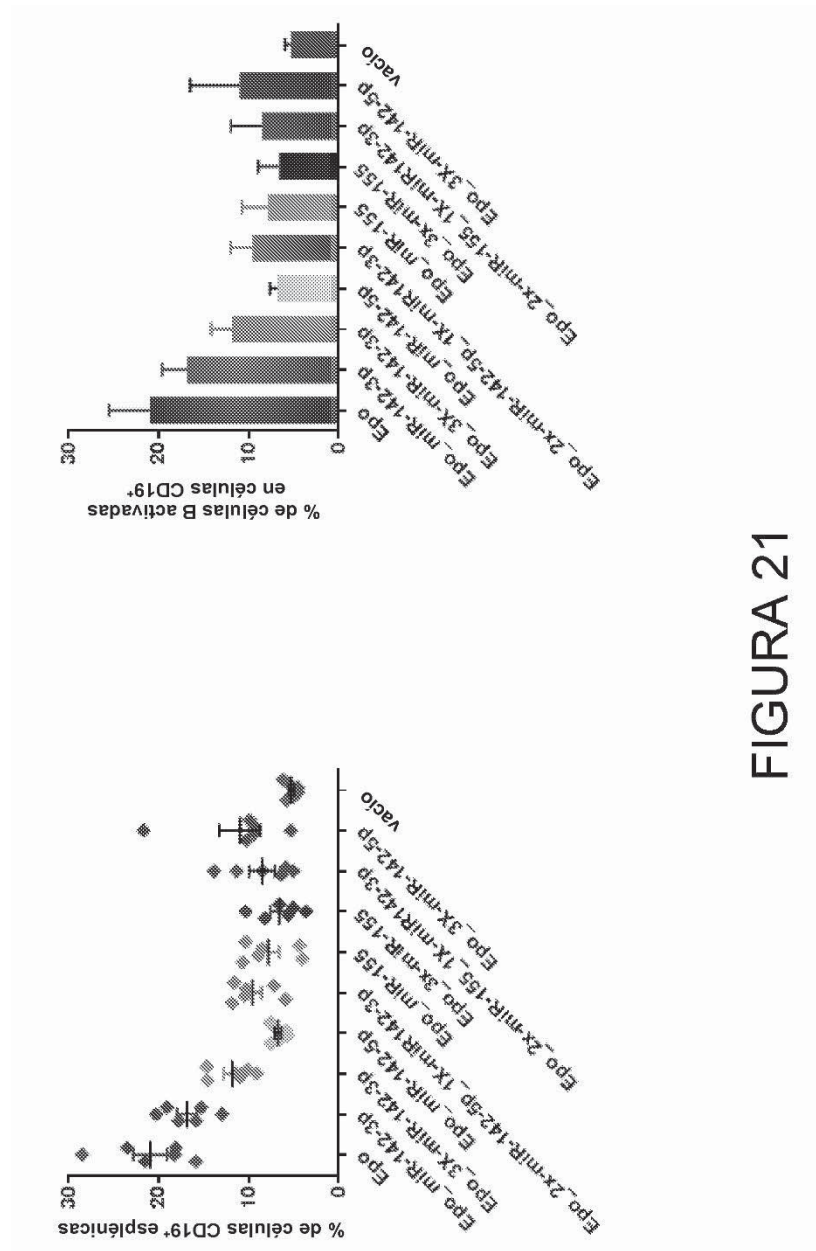


FIGURA 19A

FIGURA 19B









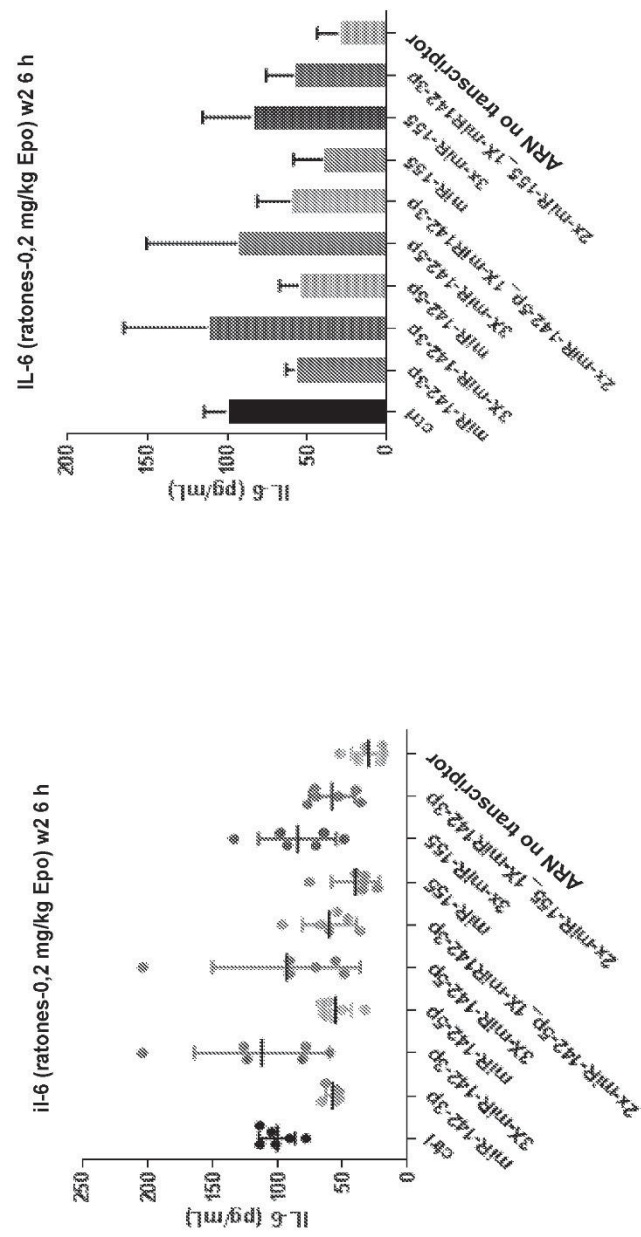


FIGURA 24A

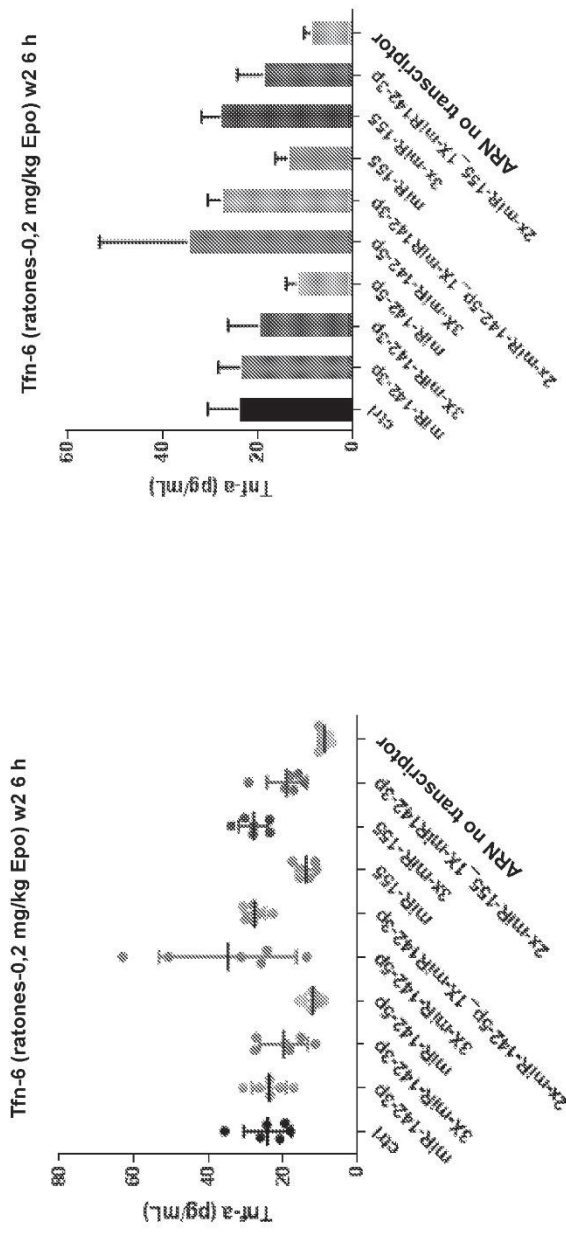


FIGURA 24B

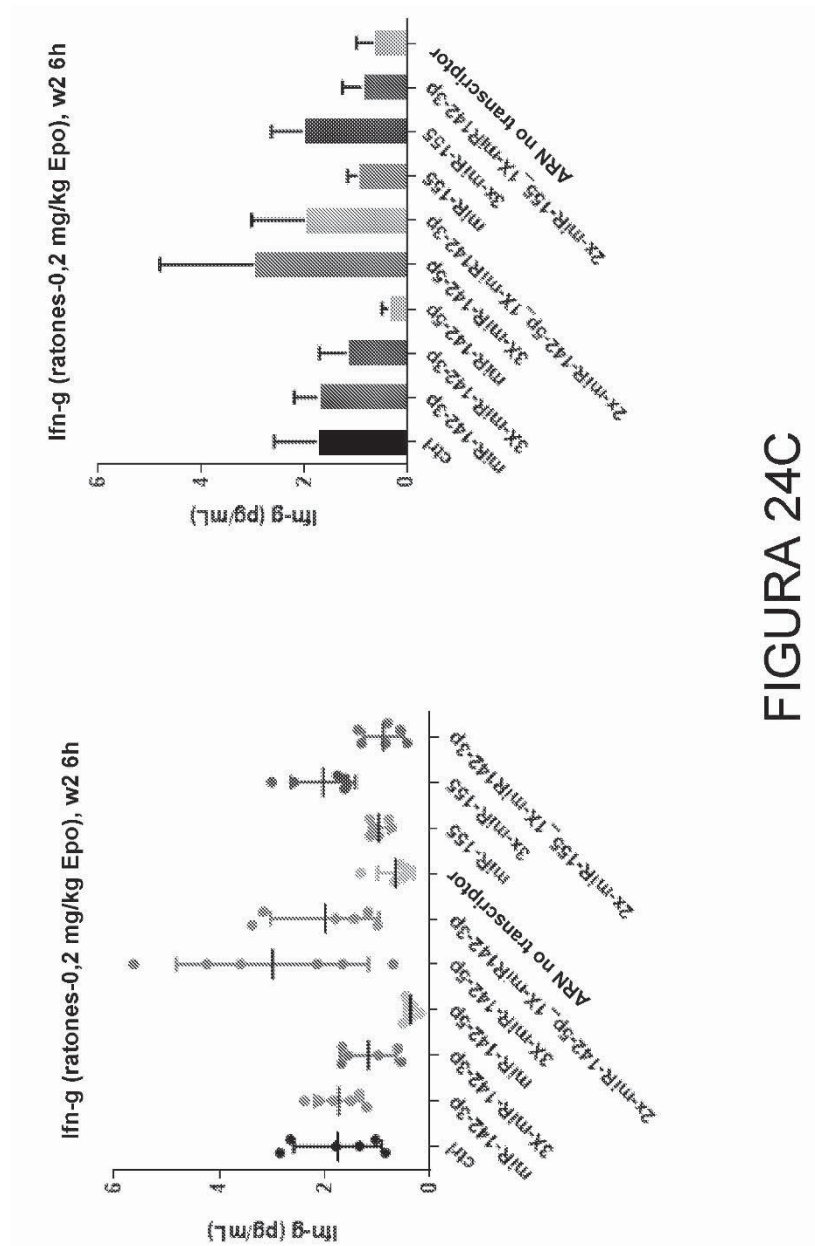
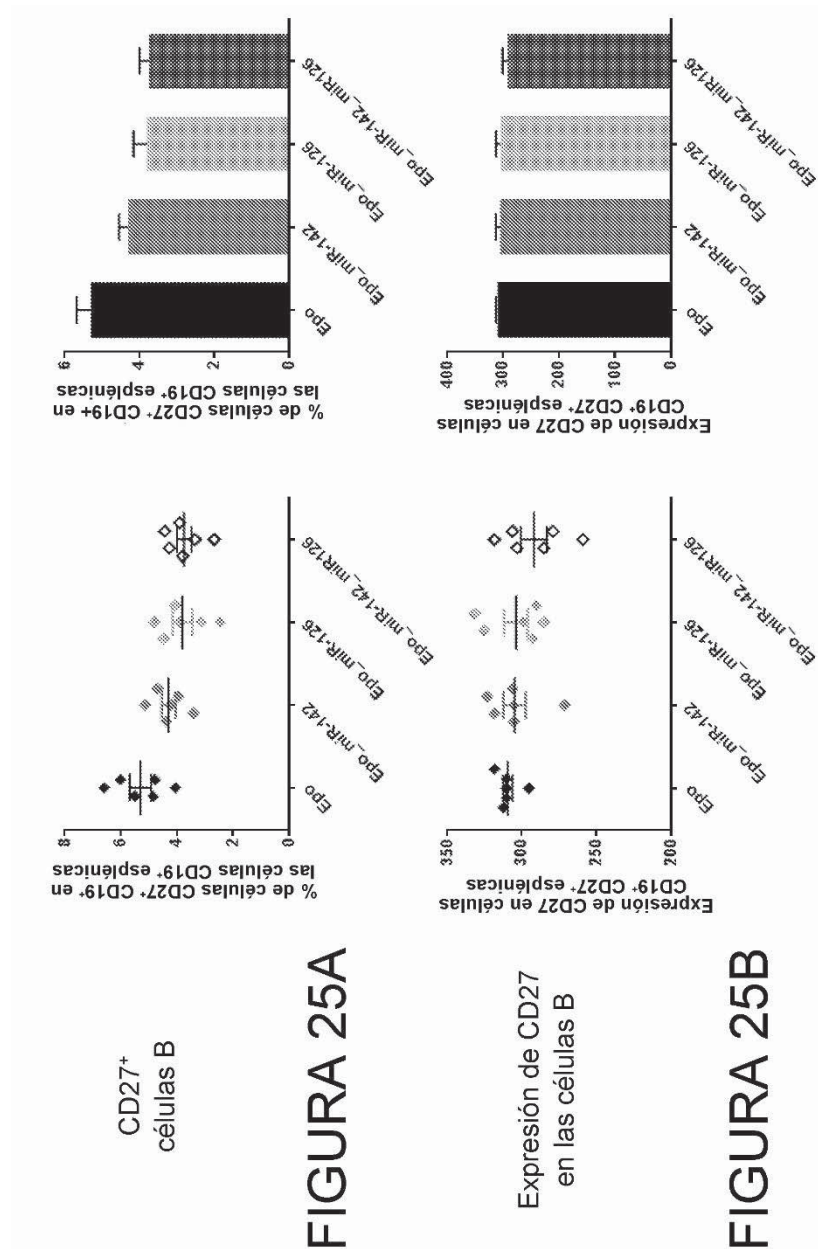


FIGURA 24C



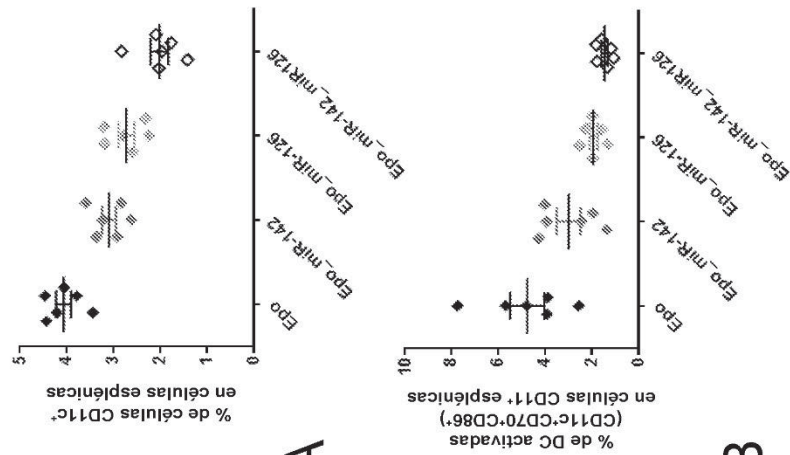
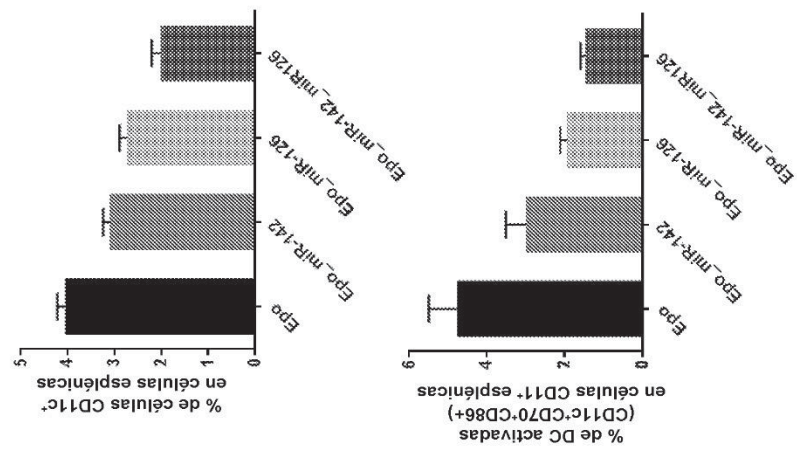
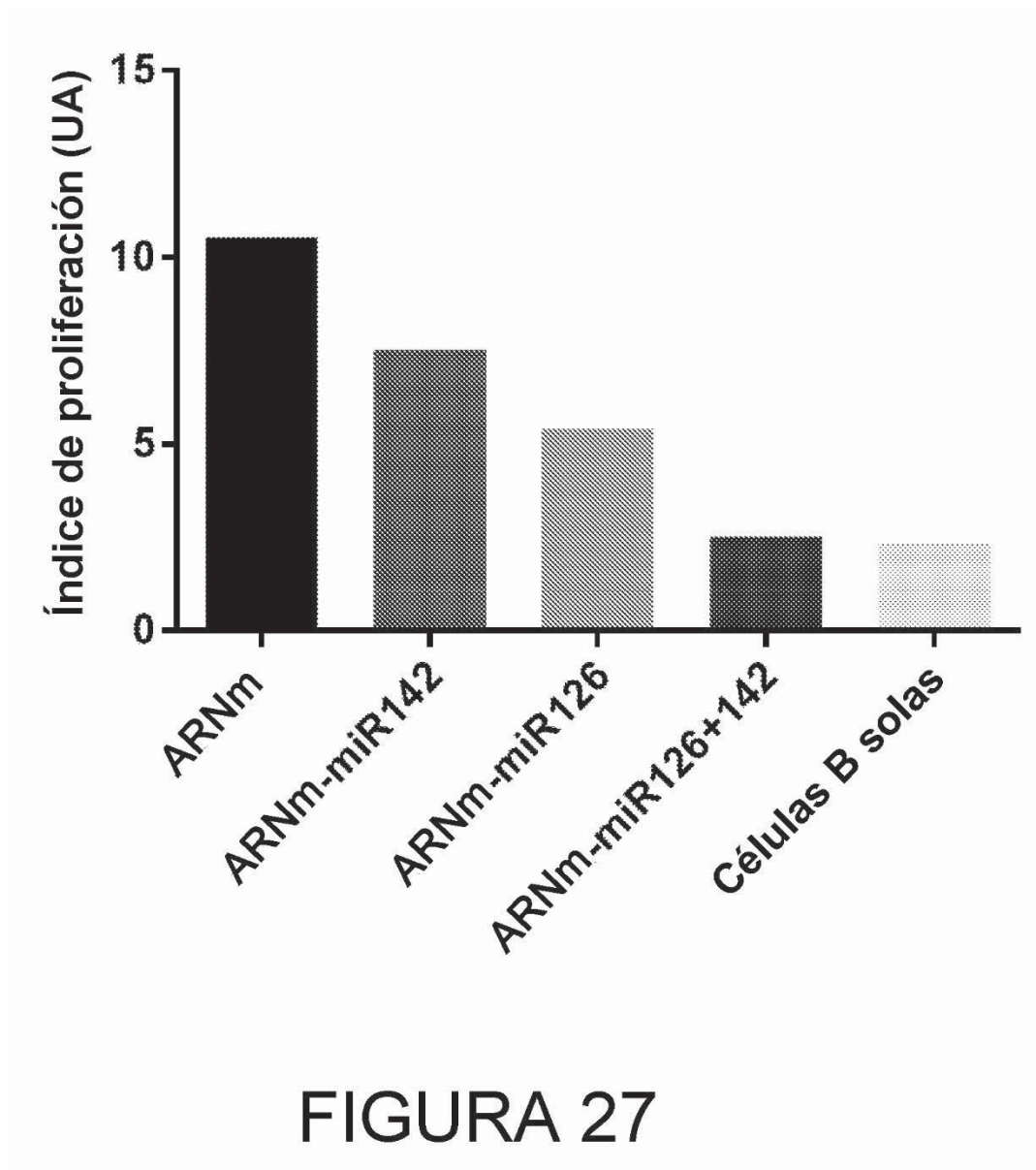


FIGURA 26B



FIGURA 26A

Células CD11c⁺
totales



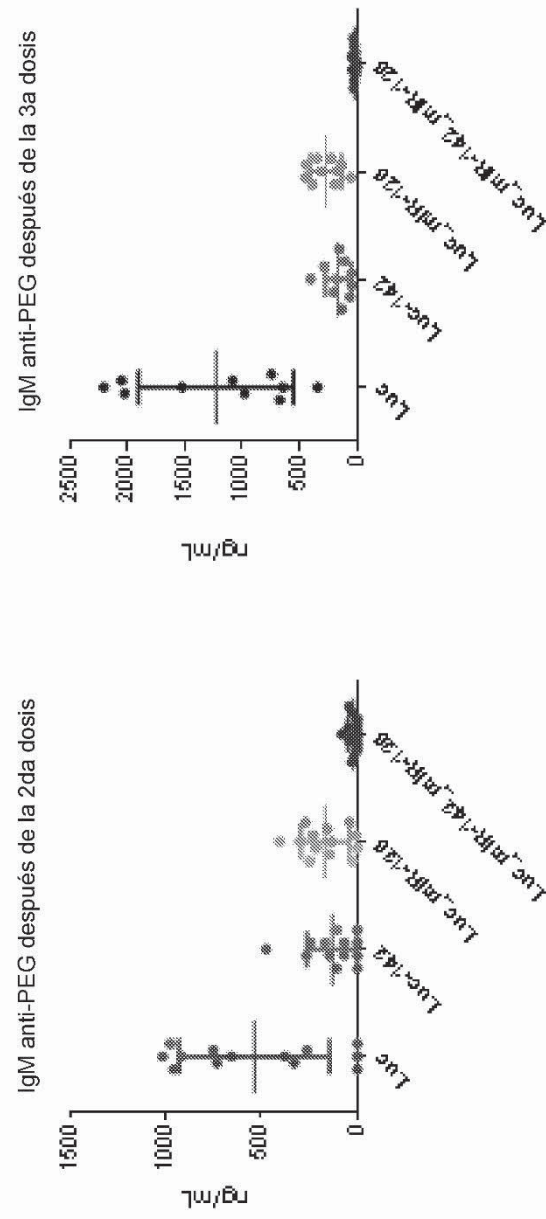


FIGURA 28A

FIGURA 28B

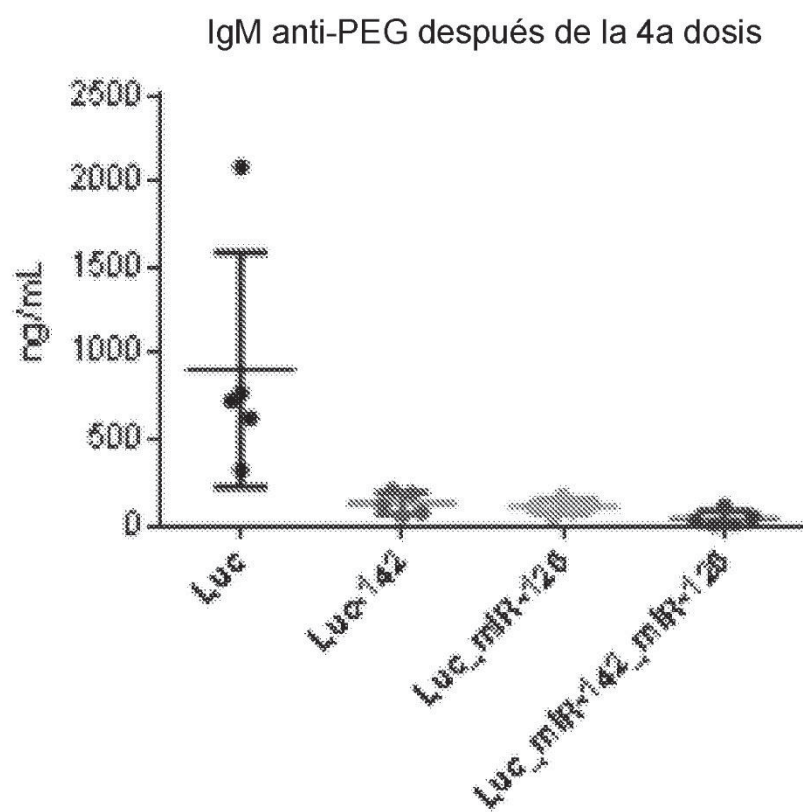
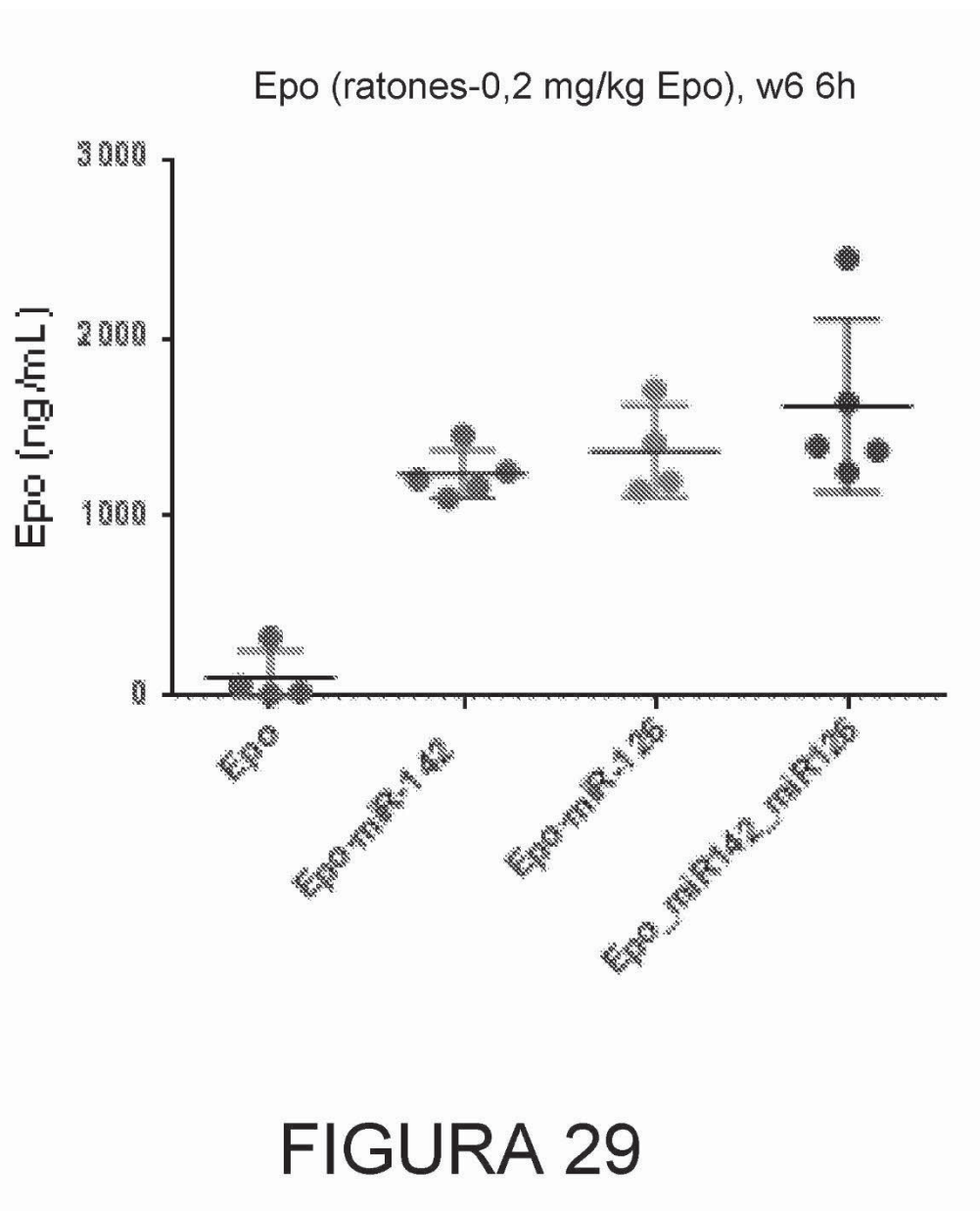


FIGURA 28C



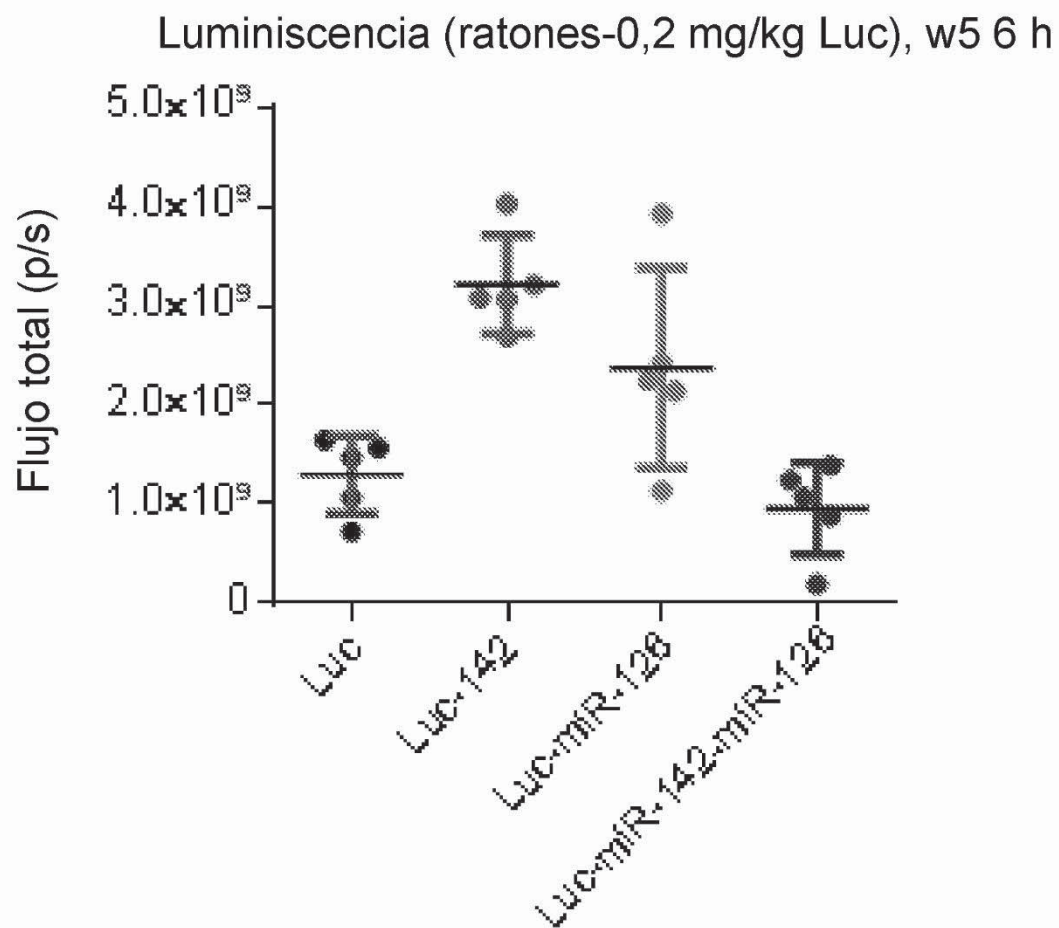
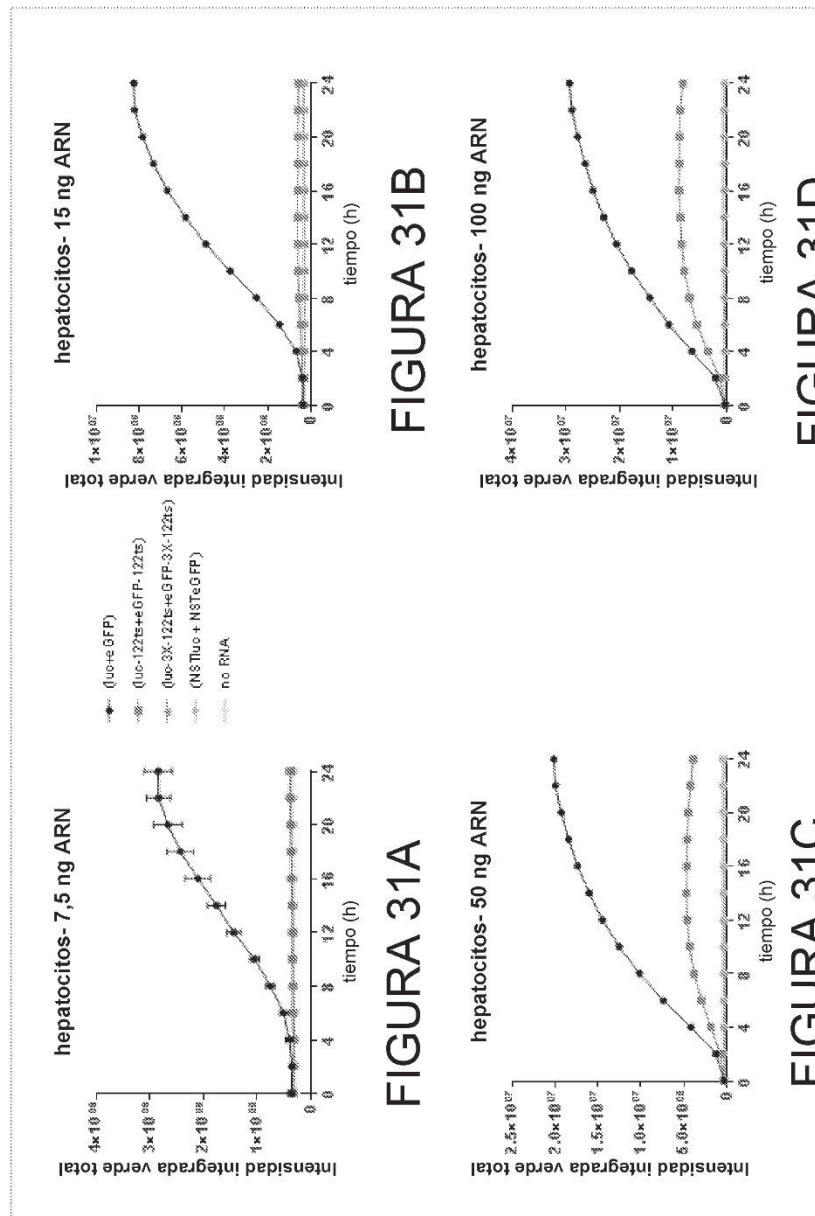


FIGURA 30



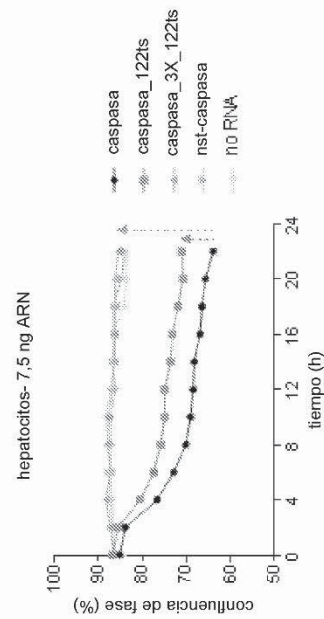


FIGURA 32A

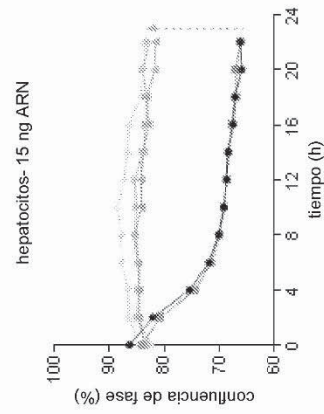


FIGURA 32B

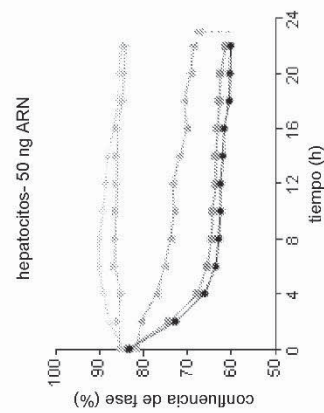


FIGURA 32C

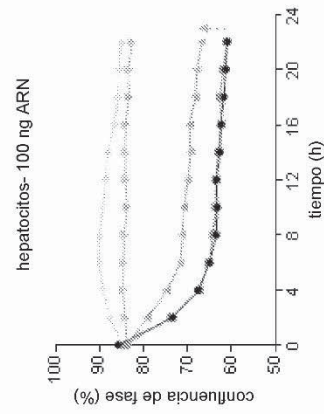


FIGURA 32D

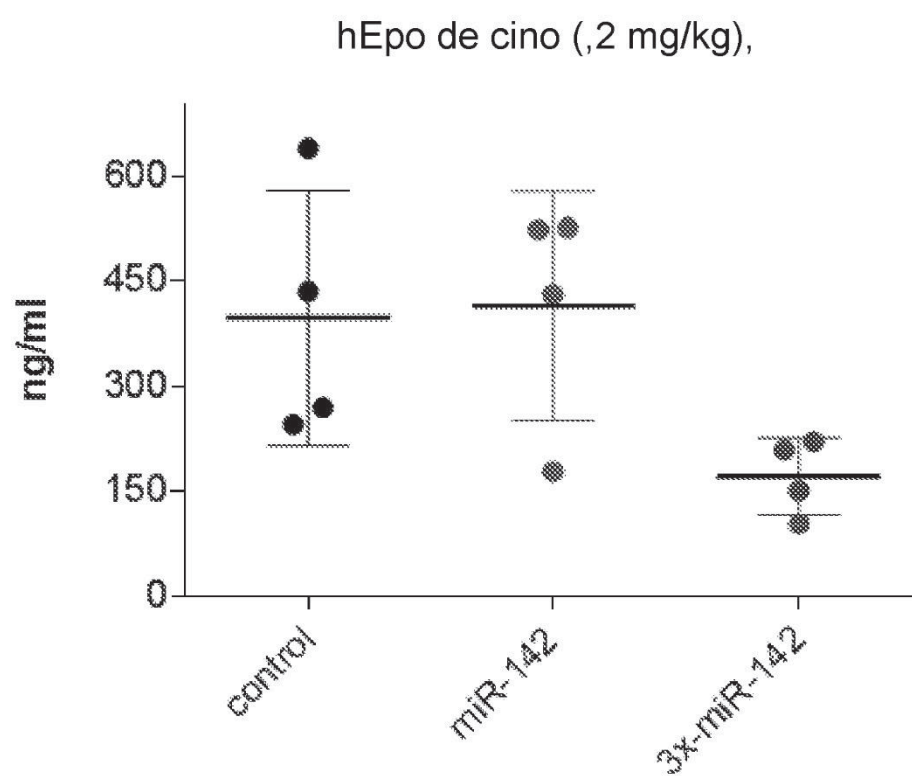


FIGURA 33

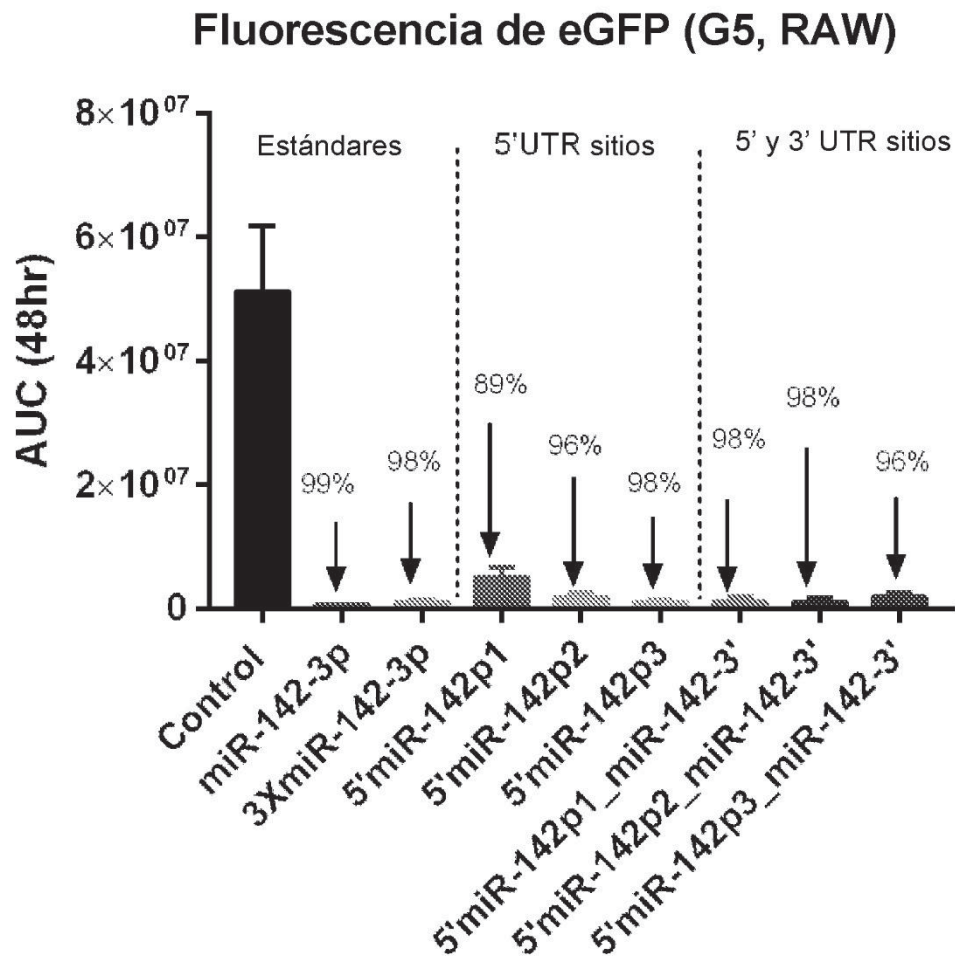


FIGURA 34

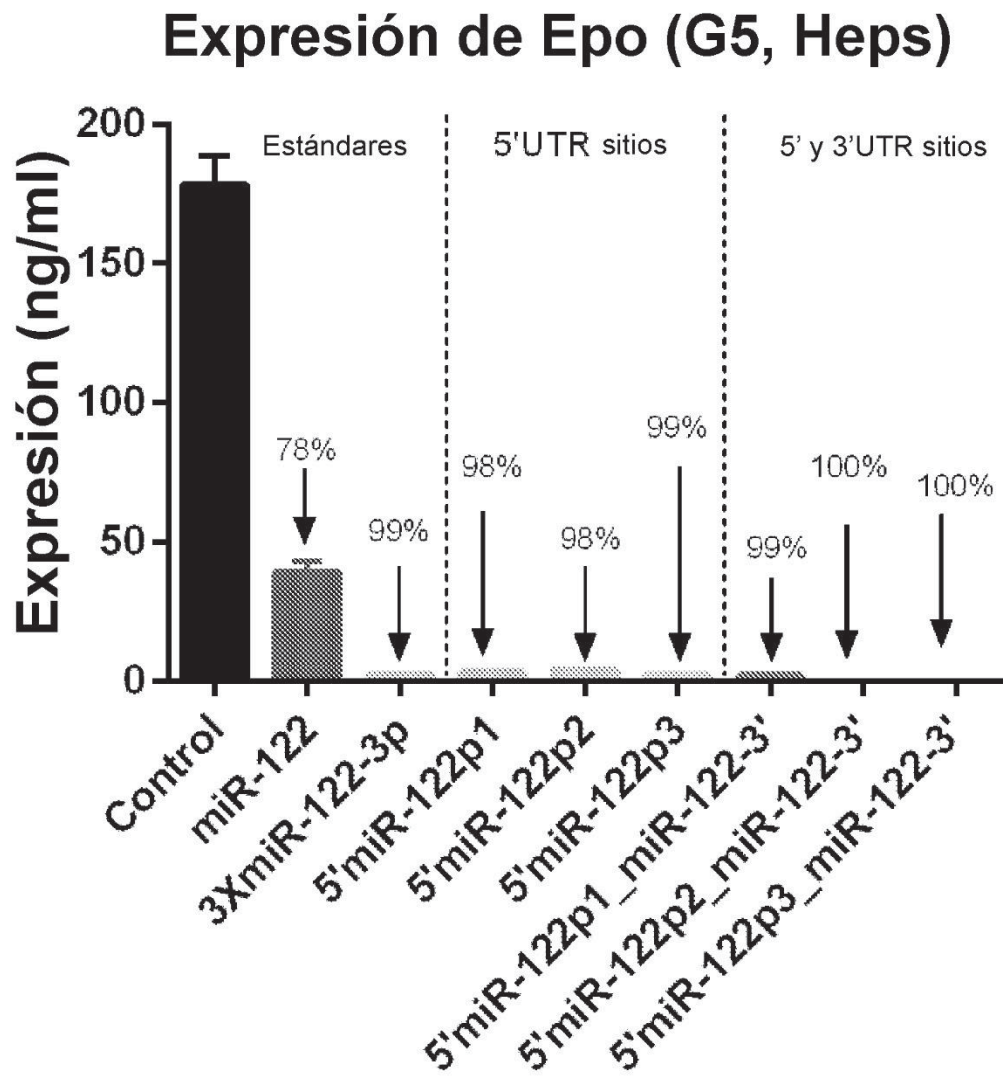


FIGURA 35