

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 911 677**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2012 E 19216461 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.12.2021 EP 3682905**

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

30 Prioridad:

03.10.2011 US 201161542533 P

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

20.05.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DE FOUGEROLLES, ANTONIN;
ROY, ATANU;
SCHRUM, JASON P.;
SIDDIQI, SUHAIB;
HATALA, PAUL y
BANCEL, STEPHANE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 911 677 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados, y sus usos

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de EE. UU. n. ° 61/542.533, presentada el 3 de octubre de 2011, titulada Nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados, y sus usos.

10 Campo técnico

La presente descripción proporciona composiciones y procedimientos que utilizan ácidos nucleicos modificados para modular la función celular. Los ácidos nucleicos modificados de la descripción pueden codificar péptidos, polipéptidos o múltiples proteínas. Las moléculas codificadas se pueden usar como terapéuticas y/o diagnósticas.

15 ANTECEDENTES

Los ARN de origen natural se sintetizan a partir de cuatro ribonucleótidos básicos: ATP, CTP, UTP y GTP, pero pueden contener nucleótidos modificados post-transcripcionalmente. Además, se han identificado aproximadamente cien modificaciones de nucleósidos diferentes en ARN (Rozenki, J, Crain, P y McCloskey, J. (1999). La base de datos de modificación de ARN: Actualización de 1999. Res Ácidos Nucl 27: 196-197). El papel de las modificaciones de nucleósidos en el potencial inmunoestimulante y en la eficiencia de traducción del ARN, sin embargo, no está claro.

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

En la técnica se necesitan modalidades biológicas para abordar la modulación de la traducción intracelular de ácidos nucleicos.

40 RESUMEN

La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de interés, comprendiendo dicho polinucleótido aislado:

- 45 1. (a) una secuencia de n número de nucleósidos o nucleótidos enlazados que comprende al menos un nucleósido o nucleótido modificado en comparación con la estructura química de un nucleósido o nucleótido A, G, U o C,
2. (b) una UTR 5',
3. (c) una UTR 3', y
4. (d) al menos una estructura de tapa 5',

50 donde el al menos un nucleósido o nucleótido modificado comprende 1-metilpseudouridina y no es pseudouridina o 5-metil-citidina;
donde el polinucleótido exhibe una respuesta inmunitaria innata celular reducida cuando se introduce en una población de células, en comparación con la inmunidad innata celular inducida por un ácido nucleico no modificado correspondiente.

55 En las reivindicaciones también se definen aspectos adicionales de la invención. La divulgación en la siguiente descripción proporciona tanto información relacionada con el objeto cubierto por las definiciones de las reivindicaciones como información adicional que no es el objeto de las reivindicaciones. En la siguiente descripción, cuando se hace referencia a realizaciones o aspectos, tales realizaciones o aspectos deben entenderse como realizaciones de la descripción en general, mientras que el alcance de la invención se define en las reivindicaciones. La descripción de cualquier materia no cubierta por las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.

60 La presente descripción proporciona, *entre otros*, nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos

modificados que pueden presentar una respuesta inmunitaria innata reducida cuando se introducen en una población de células, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

5 La presente descripción proporciona polinucleótidos que pueden aislarse o purificarse. Estos polinucleótidos codifican uno o más polipéptidos de interés y comprenden una secuencia de n número de nucleósidos o nucleótidos enlazados que comprende al menos un nucleósido o nucleótido modificado en comparación con la estructura química de un nucleósido o nucleótido A, G, U o C. Los polinucleótidos también comprenden una UTR 5' que comprende al menos una secuencia de Kozak, una UTR 3' y al menos una estructura de tapa 5'. Los polinucleótidos aislados pueden comprender además una cola de poli-A y pueden purificarse.

10 Los polinucleótidos aislados de la descripción también comprenden al menos una estructura de tapa 5' que se selecciona del grupo que consiste en TapaO, Tapa1, ARCA, inosina, N1-metil-guanosina, 2'fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina.

15 Las modificaciones de los polinucleótidos de la descripción pueden estar en la base de nucleósido y/o porción de azúcar de los nucleósidos que comprenden el polinucleótido.

En esta invención, un polinucleótido según la invención comprende la modificación N1-metilpseudouridina y se define adicionalmente en las reivindicaciones.

20 El nucleósido modificado no es pseudouridina (ψ) ni 5-metil-citidina (m5C).

En algunas realizaciones, se incluyen múltiples modificaciones en el ácido nucleico modificado o en uno o más nucleósidos o nucleótidos individuales. Por ejemplo, las modificaciones a un nucleósido pueden incluir una o más modificaciones a la nucleobase y el azúcar.

En algunas realizaciones se proporcionan nuevos bloques de construcción, por ejemplo, nucleósidos y nucleótidos para la preparación de polinucleótidos modificados y su procedimiento de síntesis y fabricación.

30 La presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los polinucleótidos modificados descritos en esta invención. Estos también pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados de un solvente, solvente acuoso, solvente no acuoso, medio de dispersión, diluyente, dispersión, auxiliar de suspensión, agente tensioactivo, agente isotónico, agente espesante o emulsionante, conservante, lípido, liposoma lipidoide, nanopartícula lipídica, nanopartículas con cubierta de núcleo, polímero, péptido lipoplex, proteína, célula, hialuronidasa y mezclas de estos.

También se proporcionan procedimientos para utilizar los polinucleótidos y ácidos nucleicos modificados de la descripción. En este caso, los polinucleótidos se pueden formular por cualquier medio conocido en la técnica o administrar a través de cualquiera de varias vías que incluyen inyección por medios intradérmicos, subcutáneos o intramusculares.

40 La administración de los ácidos nucleicos modificados de la descripción puede ser a través de dos o más dosis divididas iguales o desiguales. En algunos casos, el nivel del polipéptido producido por el sujeto mediante la administración de dosis divididas del polinucleótido es mayor que los niveles producidos mediante la administración de la misma dosis diaria total de polinucleótido como una sola administración.

50 La detección de los ácidos nucleicos modificados o los polipéptidos codificados se puede realizar en el fluido corporal del sujeto o paciente donde el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, suero, plasma, ascitis, orina, líquido cefalorraquídeo (CSF), esputo, saliva, médula ósea, líquido sinovial, humor acuoso, líquido amniótico, cerumen, leche materna, líquido de lavado bronquioalveolar, semen, líquido prostático, líquido de Cowper o líquido preeyaculatorio, sudor, materia fecal, cabello, lágrimas, líquido de quiste, líquido pleural y peritoneal, líquido pericárdico, linfa, quimo, quilo, bilis, líquido intersticial, menstruación, pus, sebo, vómito, secreciones vaginales, secreción mucosa, agua de heces, jugo pancreático, líquidos de lavado de cavidades sinusales, aspirados broncopulvares, líquido de cavidad blastocil y sangre de cordón umbilical.

55 En algunos casos, la administración es de acuerdo con un régimen de dosificación que ocurre en el transcurso de horas, días, semanas, meses o años y se puede lograr mediante el uso de uno o más dispositivos seleccionados de sistemas de inyección de múltiples agujas, sistemas de catéter o lumen y sistemas de ultrasonido, eléctricos o basados en radiación.

60 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. En esta invención se describen procedimientos y materiales para su uso en la presente descripción; también se pueden utilizar otros procedimientos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, procedimientos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

65

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 Los objetivos, características y ventajas anteriores y otros serán evidentes a partir de la siguiente descripción de realizaciones particulares de la descripción, como se ilustra en los dibujos adjuntos en los que los caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Los dibujos no se encuentran necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de diversas realizaciones de la descripción.

10 La figura 1 proporciona el espectro y las gráficas de los resultados analíticos para N4-Me-CTP (NTP del compuesto 1); La Figura 1A proporciona el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) en DMSO y la Figura 1B proporciona el espectro de RMN en D₂O, la Figura 1C proporciona los resultados de espectrometría de masas (MS), y la Figura 1D es los resultados de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para N4-metilcitidina (N4-Me-citidina, compuesto 1).

La Figura 2 muestra los resultados de HPLC para N4-Me-CTP (NTP del compuesto 1).

15 LA Figura 3 proporciona los resultados analíticos para 2'-OMe-N, N-di-Me-CTP (NTP del compuesto 2). La Figura 3A proporciona el espectro de RMN. La Figura 3B proporciona los resultados de MS. La Figura 3C proporciona resultados de HPLC para 2'-O-metil-N⁴, N⁴-dimetilcitidina (2'-OMe-N,N-di-Me-citidina, compuesto 2).

La Figura 4 muestra los resultados de HPLC para 2'-OMe-N, N-di-Me-CTP (NTP del compuesto 2).

La Figura 5 proporciona los resultados de HPLC para 5-metoxycarbonilmetoxi-UTP (NTP del compuesto 3).

20 La Figura 6 proporciona los resultados analíticos de 3-metil pseudouridina (compuesto 4). La Figura 6A proporciona el espectro de RMN de 3-metil pseudouridina (compuesto 4) y la Figura 6B proporciona los resultados de HPLC para 3-metilpseudouridina (compuesto 4).

La Figura 7 proporciona los resultados analíticos de 5-TBDMS-OCH₂-citidina (compuesto 6). La Figura 7A proporciona el espectro de RMN, la Figura 7B proporciona los resultados de MS y la Figura 7C proporciona los resultados de HPLC para 5-TBDMS-OCH₂-citidina (compuesto 6).

30 La Figura 8 proporciona los resultados analíticos de 5-trifluorometil uridina (compuesto 8). La Figura 8A proporciona el espectro de RMN, la Figura 8B proporciona resultados de MS y la Figura 8C proporciona resultados de HPLC para 5-trifluorometil uridina (compuesto 8).

La Figura 9 proporciona los resultados del espectro de RMN para 5-(metoxycarbonil) metil uridina (compuesto 9).

35 La figura 10 proporciona una gráfica que muestra la variabilidad de la expresión de proteína (GCSF; línea B) y citocina (interferón-alfa (IFNa); línea A y factor de necrosis tumoral-alfa (TNFa); línea C) en función del porcentaje de modificación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 La presente descripción proporciona, *entre otros*, nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados que presentan propiedades terapéuticas mejoradas que incluyen, pero no se limitan a, una respuesta inmunitaria innata reducida cuando se introduce en una población de células.

45 Dado que sigue existiendo la necesidad en la materia de modalidades terapéuticas para abordar la miríada de barreras que rodean la modulación eficaz de la traducción intracelular y el procesamiento de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos o fragmentos de estos, los inventores han demostrado que determinadas secuencias de ARNm modificadas tienen el potencial como terapéuticas con beneficios más allá de simplemente evadir, evitar o disminuir la respuesta inmunitaria.

50 La presente descripción aborda esta necesidad proporcionando compuestos o polinucleótidos basados en ácido nucleico que codifican un polipéptido de interés (por ejemplo, ARNm modificado) y que tienen características estructurales y/o químicas que evitan uno o más de los problemas en la técnica, por ejemplo, características que son útiles para optimizar la terapéutica basada en ácido nucleico mientras se conserva la integridad estructural y funcional, se supera el umbral de expresión, se mejoran los índices de expresión, la vida media y/o las concentraciones de proteína, se optimiza la localización de proteínas y se evitan las bio-respuestas perjudiciales tales como la respuesta inmunitaria y/o las vías de degradación.

60 En esta invención se proporcionan, en parte, polinucleótidos que codifican polipéptidos de interés que han sido modificados químicamente para mejorar una o más de la estabilidad y/o depuración en tejidos, captación y/o cinética de receptores, acceso celular por las composiciones, acoplamiento con maquinaria de traducción, vida media de ARNm, eficiencia de traducción, evasión inmunitaria, capacidad de producción de proteínas, eficiencia de secreción (cuando corresponda), accesibilidad a la circulación, vida media de proteína y/o modulación del estado, función y/o actividad de una célula.

65 Los nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos modificados de la descripción, incluida la combinación de modificaciones descrita en esta invención, tienen propiedades superiores que los hacen más adecuados como modalidades terapéuticas.

Se ha determinado que el modelo de "todos o ninguno" en la materia es extremadamente insuficiente para describir los fenómenos biológicos asociados con la utilidad terapéutica del ARNm modificado. Los presentes inventores han determinado que para mejorar la producción de proteínas, se puede considerar la naturaleza de la modificación, o combinación de modificaciones, el porcentaje de modificación y la encuesta de más de una citocina o métrica para determinar la eficacia y el perfil de riesgo de un ARNm modificado particular.

En un aspecto de la descripción, los procedimientos para determinar la eficacia de un ARNm modificado en comparación con el no modificado implican la medición y el análisis de una o más citocinas cuya expresión se activa mediante la administración del ácido nucleico exógeno de la descripción. Estos valores se comparan con la administración de un ácido nucleico no modificado o con una métrica estándar tal como respuesta a citocinas, PolilC, R-848 u otro estándar conocido en la técnica.

Un ejemplo de una métrica estándar desarrollada en esta invención es la medida de la relación del nivel o cantidad de polipéptido (proteína) codificado producido en la célula, tejido u organismo con respecto al nivel o cantidad de una o más (o un panel) de citocinas cuya expresión se activa en la célula, tejido u organismo como resultado de la administración o contacto con el ácido nucleico modificado. Tales relaciones se denominan en esta invención relación de proteína:citocina o relación "PC". Cuanto mayor sea la relación de PC, más eficaz será el ácido nucleico modificado (polinucleótido que codifica la proteína medida). Las relaciones de PC preferidas, mediante citocina, 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 ácidos nucleicos modificados que tienen proporciones de PC más altas que un ácido nucleico modificado de una construcción diferente o no modificada.

La relación de PC se puede calificar adicionalmente mediante la modificación porcentual presente en el polinucleótido. Por ejemplo, normalizado a un ácido nucleico modificado al 100 %, se puede determinar la producción de proteína en función de la citocina (o riesgo) o el perfil de citocina.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para determinar, a través de productos químicos, citocinas o modificación porcentual, la eficacia relativa de cualquier polinucleótido modificado particular mediante la comparación de la relación PC del ácido nucleico modificado (polinucleótido).

En otro aspecto, el ARNm modificado químicamente es sustancialmente no tóxico y no mutagénico.

En un caso, los nucleósidos modificados, los nucleótidos modificados y los ácidos nucleicos modificados se pueden modificar químicamente en la cara del surco principal, interrumpiendo así las interacciones del compañero de unión al surco principal, lo que puede causar respuestas inmunitarias innatas. Además, estos nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados se pueden usar para administrar una carga útil, por ejemplo, agente detectable o terapéutico, a un objetivo biológico. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden estar unidos covalentemente a una carga útil, por ejemplo, un agente detectable o terapéutico, a través de un enlazador unido a la nucleobase o al resto de azúcar. Las composiciones y procedimientos descritos en esta invención se pueden utilizar, *in vivo e in vitro*, tanto extracelular como intracelularmente, así como en ensayos tales como ensayos sin células.

En algunos casos, la presente descripción proporciona compuestos que comprenden un nucleótido que interrumpe la unión de un compañero que interactúa con un surco principal, por ejemplo, unión, con un ácido nucleico, donde el nucleótido tiene una afinidad de unión reducida con los compañeros que interactúan con un surco principal.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona nucleótidos que contienen modificaciones químicas, donde el nucleótido tiene unión alterada a compañeros que interactúan en el surco principal.

En algunos casos, las modificaciones químicas se ubican en la cara del surco principal de la nucleobase, y donde las modificaciones químicas pueden incluir reemplazar o sustituir un átomo de una nucleobase de pirimidina con una amina, un SH, un alquilo (por ejemplo, metilo o etilo) o un halo (por ejemplo, cloro o fluro).

En otro aspecto, la presente descripción proporciona modificaciones químicas ubicadas en el resto de azúcar del nucleótido.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona modificaciones químicas ubicadas en la estructura principal de fosfato del ácido nucleico.

En algunos casos, las modificaciones químicas alteran la electroquímica en la cara del surco principal del ácido nucleico.

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

En otro aspecto, la presente descripción proporciona secuencias de ácido nucleico que comprenden al menos dos nucleótidos, donde la secuencia de ácido nucleico comprende un nucleótido que interrumpe la unión de un compañero de interacción de surco principal con la secuencia de ácido nucleico, donde el nucleótido tiene menor afinidad de unión al compañero de unión de surco principal.

5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden un compuesto como se describe en esta invención. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica.

10 En algunos casos, la composición comprende además una polimerasa de ARN y una plantilla de ADNc. En algunos casos, la composición comprende además un nucleótido que se selecciona del grupo que consiste en adenosina, citosina, guanosina y uracilo.

15 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona procedimientos para elaborar una formulación farmacéutica que comprende una proteína secretada fisiológicamente activa, que comprende transfectar una primera población de células humanas con el ácido nucleico farmacéutico fabricado mediante los procedimientos descritos en esta invención, donde la proteína secretada está activa sobre una segunda población de células humanas.

20 En algunos casos, la proteína secretada es capaz de interactuar con un receptor en la superficie de al menos una célula presente en la segunda población.

En algunos casos, la proteína secretada es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

En algunos casos, la segunda población contiene células de mieloblastos que expresan el receptor G-CSF.

25 En determinados aspectos, en esta invención se proporcionan productos terapéuticos de combinación que contienen uno o más ácidos nucleicos modificados que contienen regiones traducibles que codifican para una proteína o proteínas que aumentan la inmunidad de un sujeto mamífero junto con una proteína que induce toxicidad celular dependiente de anticuerpos. Por ejemplo, se proporcionan productos terapéuticos que contienen uno o más ácidos nucleicos que codifican trastuzumab y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En particular, tales terapias de combinación son útiles en pacientes con cáncer de mama Her2+ que desarrollan resistencia inducida a trastuzumab. (Véase, por ejemplo, Albrecht, *Inmunoterapia*. 2(6):795-8 (2010)).

30 En un aspecto, se pretende que los compuestos de la presente descripción sean estables. Se aprecia además que determinadas características de la presente descripción, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la presente descripción que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Nucleótidos, nucleósidos y polinucleótidos modificados de la descripción

40 En esta invención, en un nucleótido, nucleósido o polinucleótido (tal como los ácidos nucleicos de la descripción, por ejemplo, molécula de ARNm), los términos "modificación" o, según corresponda, "modificado" se refieren a la modificación con respecto a los ribonucleótidos A, G, U o C. Generalmente, en esta invención, estos términos no pretenden referirse a las modificaciones de ribonucleótidos en restos de tapa de ARNm 5'-terminal de origen natural.

45 En un polipéptido, el término "modificación" se refiere a una modificación en comparación con el conjunto canónico de 20 aminoácidos, resto)

Las modificaciones pueden ser varias modificaciones distintas. En algunos casos, cuando el ácido nucleico es un ARNm, la región codificante, las regiones flanqueantes y/o las regiones terminales pueden contener una, dos o más modificaciones de nucleósidos o nucleótidos (opcionalmente diferentes). En algunas realizaciones, un polinucleótido modificado introducido en una célula puede presentar una degradación reducida en la célula, en comparación con un polinucleótido no modificado.

Los polinucleótidos pueden incluir cualquier modificación útil, tal como al azúcar, la nucleobase o el enlace internucleósido (*por ejemplo*, a un fosfato de enlace/ a un enlace fosfodiéster / a la estructura principal de fosfodiéster).

55 Por ejemplo, el surco principal de un polinucleótido o la cara del surco principal de una nucleobase puede comprender una o más modificaciones. Uno o más átomos de una nucleobase de pirimidina (p. ej., en la cara del surco principal) se pueden reemplazar con amino opcionalmente sustituido, tiol opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido (p. ej., metilo o etilo) o halo (p. ej., cloro o fluoro). En determinados casos, las modificaciones (por ejemplo, una o más modificaciones) están presentes en cada uno del azúcar y el enlace internucleósido. Las modificaciones según la presente descripción pueden ser modificaciones de ácidos ribonucleicos (ARN) a ácidos desoxirribonucleicos (ADN), por ejemplo, la sustitución del 2'OH del anillo ribofuranisilo con 2'H, ácidos nucleicos de tresosa (TNA), ácidos nucleicos de glicol (GNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o híbridos de estos). En esta invención se describen modificaciones adicionales.

65 Tal como se describe en esta invención, los polinucleótidos de la descripción no inducen sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el polinucleótido (por ejemplo, ARNm). Las

características de una respuesta inmunitaria innata inducida incluyen 1) mayor expresión de citocinas proinflamatorias, 2) activación de PRR intracelulares (RIG-I, MDA5, etc., y/o 3) terminación o reducción en la traducción de proteínas.

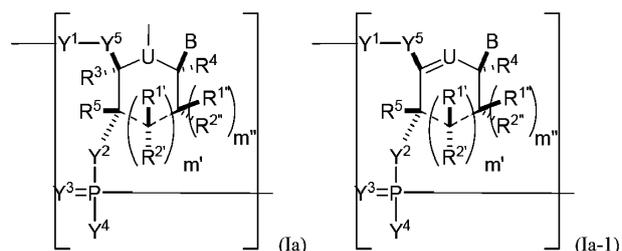
5 En determinados casos, puede ser deseable que una molécula de ácido nucleico modificado introducida en la célula se degrade intracelularmente. Por ejemplo, la degradación de una molécula de ácido nucleico modificado puede ser preferible si se desea un momento preciso de la producción de proteínas. Por lo tanto, en algunos aspectos, la descripción proporciona una molécula de ácido nucleico modificado que contiene un dominio de degradación, que es capaz de actuar de una manera dirigida dentro de una célula. En otro aspecto, la presente descripción proporciona polinucleótidos que comprenden un nucleósido o nucleótido que puede interrumpir la unión de un compañero que interactúa con el surco principal, por ejemplo, unión, con el polinucleótido (por ejemplo, donde el nucleótido modificado tiene menor afinidad de unión al compañero que interactúa con el surco principal, en comparación con un nucleótido no modificado).

15 Los polinucleótidos pueden incluir opcionalmente otros agentes (por ejemplo, agentes inductores de iARN, agentes de iARN, ARNsi, ARNsh, ARNmi, ARN antisentido, ribozimas, ADN catalítico, ARNt, ARN que inducen la formación de triple hélice, aptámeros, vectores, etc.). En algunos casos, los polinucleótidos pueden incluir uno o más ARN mensajeros (ARNm) que tienen uno o más nucleósidos o nucleótidos modificados (es decir, moléculas de ARNm modificadas). Los detalles de estos polinucleótidos se encuentran a continuación.

20 Polinucleótidos

Los polinucleótidos de la descripción incluyen una primera región de nucleósidos enlazados que codifican un polipéptido de interés, una primera región flanqueante ubicada en el extremo 5' de la primera región y una segunda región flanqueante ubicada en el extremo 3' de la primera región.

25 En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, primera región flanqueante o segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (Ia) o la Fórmula (Ia-1):



30 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde U es O, S, N(R^U)_{nu} o C(R^U)_{nu}, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido;

--- es un enlace sencillo o ausente;

35 cada uno de R^{1'}, R^{2'}, R^{1''}, R^{2''}, R³, R⁴ y R⁵, si están presentes, es, independientemente, H, halo, hidroxil, tior, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquiloiloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenoil opcionalmente sustituido, aminoalquiloil opcionalmente sustituido o están ausentes; donde la combinación de R³ con uno o más de R^{1'}, R^{1''}, R^{2'}, R^{2''} o R⁵ (por ejemplo, la combinación de R^{1'} y R³, la combinación de R^{1''} y R³, la combinación de R^{2'} y R³, la combinación de R^{2''} y R³ o la combinación de R⁵ y R³) pueden unirse para formar alquenoil opcionalmente sustituido o heteroalquenoil opcionalmente sustituido y, tomado junto con los carbonos a los que se encuentran unidos, proporcionar un heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclilo bicíclico, tricíclico o tetracíclico); donde la combinación de R⁵ con uno o más de R^{1'}, R^{1''}, R^{2'} o R^{2''} (por ejemplo, la combinación de R^{1'} y R⁵, la combinación de R^{1''} y R⁵, la combinación de R^{2'} y R⁵, o la combinación de R^{2''} y R⁵) pueden unirse para formar alquenoil opcionalmente sustituido o heteroalquenoil opcionalmente sustituido y, tomado junto con los carbonos a los que se encuentran unidos, proporcionar un heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclilo bicíclico, tricíclico o tetracíclico);

cada uno de m' y m'' es, independientemente, un entero de 0 a 3 (por ejemplo, de 0 a 2, de 0 a 1, de 1 a 3 o de 1 a 2);

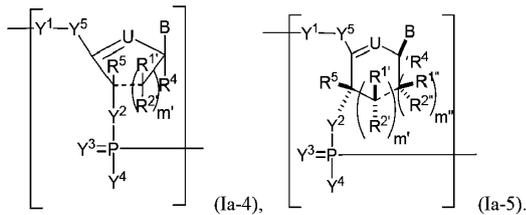
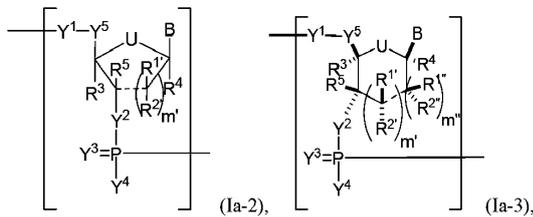
55 cada uno de Y¹, Y² e Y³ es, independientemente, O, S, Se, -NR^{N1}-, alquenoil opcionalmente sustituido o heteroalquenoil opcionalmente sustituido, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenoil opcionalmente sustituido, alquiloil opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o ausente;

cada Y^4 es, independientemente, H, hidroxilo, tior, boranilo, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoiloxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

5 cada Y^5 es, independientemente, O, S, Se, alqueno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalqueno opcionalmente sustituido;

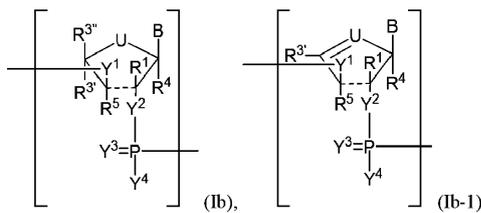
n es un entero de 1 a 100.000; y

10 B es una nucleobase (por ejemplo, una purina, una pirimidina o derivados de estas), donde la combinación de B y $R^{1'}$, la combinación de B y $R^{2'}$, la combinación de B y $R^{1''}$ o la combinación de B y $R^{2''}$ pueden, tomados junto con los carbonos a los que se encuentran unidos, formar opcionalmente un grupo bicíclico (por ejemplo, un heterociclilo bicíclico) o donde la combinación de B, $R^{1'}$ y R^3 o la combinación de B, $R^{2'}$ y R^3 pueden formar opcionalmente un grupo tricíclico o tetracíclico (por ejemplo, un heterociclilo tricíclico o tetracíclico, tal como en la Fórmula (Ilo)-(Ilp) en esta invención).



20 En algunos casos, el polinucleótido incluye una ribosa modificada. En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (Ia-2)-(Ia-5) o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de estos.

25 En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen Fórmula (Ib) o Fórmula (Ib-1):



30 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

U es O, S, $N(R^u)_{nu}$ o $C(R^u)_{nu}$, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^u es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido;

35 --- es un enlace sencillo o ausente;

40 cada uno de R^1 , R^3 , $R^{3'}$ y R^4 es, independientemente, H, halo, hidroxilo, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoiloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenoiloxi opcionalmente sustituido, aminoalquinoiloxi opcionalmente sustituido o ausente; y donde la combinación de R^1 y $R^{3'}$ o la combinación de R^1 y R^3 se pueden tomar juntos para formar alqueno opcionalmente sustituido o heteroalqueno opcionalmente sustituido (por ejemplo, para producir un ácido nucleico bloqueado);

45 cada R^5 es, independientemente, H, halo, hidroxilo, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido,

alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o está ausente;

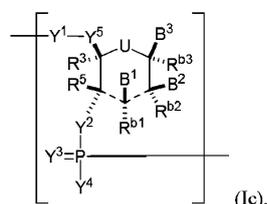
5 cada uno de Y^1 , Y^2 e Y^3 es, independientemente, O, S, Se, NR^{N1} -, alquileo opcionalmente sustituido o heteroalquileo opcionalmente sustituido, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido;

10 cada Y^4 es, independientemente, H, hidroxil, tiol, boranilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

n es un entero de 1 a 100.000; y

15 B es una nucleobase.

En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, primera región flanqueante o segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (Ic):



20 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

U es O, S, $N(R^U)_{nu}$ o $C(R^U)_{nu}$, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido;

25 --- es un enlace sencillo o ausente;

30 cada uno de B^1 , B^2 y B^3 es, independientemente, una nucleobase (por ejemplo, una purina, una pirimidina o derivados de estas, como se describe en esta invención), H, halo, hidroxil, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido, donde uno y solo uno de B^1 , B^2 y B^3 es una nucleobase;

35 cada uno de R^{b1} , R^{b2} , R^{b3} , R^3 y R^5 es, independientemente, H, halo, hidroxil, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido;

45 cada uno de Y^1 , Y^2 e Y^3 es, independientemente, O, S, Se, $-NR^{N1}$ -, alquileo opcionalmente sustituido o heteroalquileo opcionalmente sustituido, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido;

50 cada Y^4 es, independientemente, H, hidroxil, tiol, boranilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alqueniloxi opcionalmente sustituido, alquiniloxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

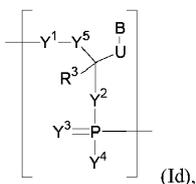
55 cada Y^5 es, independientemente, O, S, Se, alquileo opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalquileo opcionalmente sustituido;

n es un entero de 1 a 100.000; y

donde el anillo que incluye U puede incluir uno o más enlaces dobles.

En realizaciones particulares, el anillo que incluye U no tiene un enlace doble entre $U-CB^3R^{b3}$ o entre $CB^3R^{b3}-C^{B2}R^{b2}$.

En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, primera región flanqueante o segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (Id):



5 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde U es O, S, N(R^U)_{nu} o C(R^U)_{nu}, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido;

10 cada R³ es, independientemente, H, halo, hidroxilo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquinoxilo opcionalmente sustituido, alquinoxilo opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalqueno opcionalmente sustituido o aminoalquino opcionalmente sustituido;

15 cada uno de Y¹, Y² e Y³ es, independientemente, O, S, Se, -NR^{N1}-, alqueno opcionalmente sustituido o heteroalqueno opcionalmente sustituido, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido;

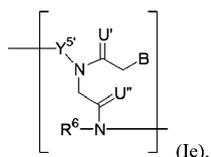
20 cada Y⁴ es, independientemente, H, hidroxilo, tiol, boronilo, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquinoxilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquinoxilo opcionalmente sustituido, alquinoxilo opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

25 cada Y⁵ es, independientemente, O, S, alqueno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalqueno opcionalmente sustituido;

n es un entero de 1 a 100.000; y

30 B es una nucleobase (por ejemplo, una purina, una pirimidina o derivados de estas).

En algunas realizaciones, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (Ie):



35 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

donde cada uno de U' y U'' es, independientemente, O, S, N(R^U)_{nu} o C(R^U)_{nu}, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido;

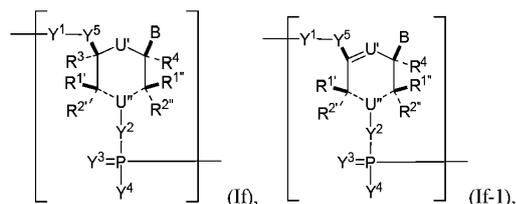
40 cada R⁶ es, independientemente, H, halo, hidroxilo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquinoxilo opcionalmente sustituido, alquinoxilo opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalqueno opcionalmente sustituido o aminoalquino opcionalmente sustituido;

45 cada Y^{5'} es, independientemente, O, S, alqueno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno o etileno) o heteroalqueno opcionalmente sustituido;

50 n es un entero de 1 a 100.000; y

B es una nucleobase (por ejemplo, una purina, una pirimidina o derivados de estas).

55 En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, primera región flanqueante o segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (If) o (If-1):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

5

donde cada uno de U' y U'' es, independientemente, O, S, N, N(R^u)_{nu} o C(R^u)_{nu}, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^u es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, U' es O y U'' es N);

--- es un enlace sencillo o ausente;

10

cada uno de R^{1'}, R^{2'}, R^{1''}, R^{2''}, R³ y R⁴ es, independientemente, H, halo, hidroxilo, tior, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoiloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenoiloxi opcionalmente sustituido, aminoalquinoiloxi opcionalmente sustituido o ausente; y donde la combinación de R^{1'} y R³, la combinación de R^{1''} y R³, la combinación de R^{2'} y R³, o la combinación de R^{2''} y R³ se pueden tomar juntos para formar alquenoiloxi opcionalmente sustituido o heteroalquenoiloxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, para producir un ácido nucleico bloqueado); cada uno de m' y m'' es, independientemente, un entero de 0 a 3 (por ejemplo, de 0 a 2, de 0 a 1, de 1 a 3, o de 1 a 2);

20

cada uno de Y¹, Y² e Y³ es, independientemente, O, S, Se, -NR^{N1}-, alquenoiloxi opcionalmente sustituido o heteroalquenoiloxi opcionalmente sustituido, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoiloxi opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o ausente;

25

cada Y⁴ es, independientemente, H, hidroxilo, tior, boranilo, alquilo opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoiloxi opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoiloxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

30

cada Y⁵ es, independientemente, O, S, Se, alquenoiloxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalquenoiloxi opcionalmente sustituido;

n es un entero de 1 a 100.000; y

35

B es una nucleobase (por ejemplo, una purina, una pirimidina o derivados de estas).

En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVi), y (IXa)-(IXr)), el anillo que incluye U tiene uno o dos enlaces dobles.

40

En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVi), y (IXa)-(IXr)), cada uno de R^{1'}, R^{1''}, y R^{1'''}, si está presente, es H. En realizaciones adicionales, cada uno de R^{2'}, R^{2''}, y R^{2'''}, si está presente, es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxilo, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi), o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, alcoxialcoxi es - (CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4 de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀). En algunos aspectos, s2 es 0, s1 es 1 o 2, s3 es 0 o 1 y R' es alquilo C₁₋₆.

45

En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVi), y (IXa)-(IXr)), cada uno de R^{2'}, R^{2''}, y R^{2'''}, si está presente, es H. En aspectos adicionales, cada uno de R^{1'}, R^{1''}, y R^{1'''}, si está presente, es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxilo, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi), o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, alcoxialcoxi es - (CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀). En algunos aspectos, s2 es 0, s1 es 1 o 2, s3 es 0 o 1 y R' es alquilo C₁₋₆.

55

En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVi), y (IXa)-(IXr)), cada uno de R³, R⁴, y R⁵ es, independientemente, H, halo (por

ejemplo, fluoro), hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi), o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aspectos particulares, R^3 es H, R^4 es H, R^5 es H o R^3 , R^4 y R^5 son todos H. En aspectos particulares, R^3 es alquilo C_{1-6} , R^4 es alquilo C_{1-6} , R^5 es alquilo C_{1-6} o R^3 , R^4 y R^5 son todos alquilo C_{1-6} . En aspectos particulares, R^3 y R^4 son ambos H y R^5 es alquilo C_{1-6} .

5 En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVl), y (IXa)-(IXr)), R^3 y R^5 se unen para formar alquileo opcionalmente sustituido o heteroalquileo opcionalmente sustituido y, junto con los carbonos a los que se unen, proporcionan un heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclilo bicíclico, tricíclico o tetracíclico, tal como análogos trans-3',4',
10 donde R^3 y R^5 se unen para formar heteroalquileo (por ejemplo, $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$, donde cada uno de $b1$, $b2$, $b3$ y $b3$ son independientemente un entero, 0 a 3).

15 En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVl), y (IXa)-(IXr)), R^3 y uno o más de $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, o R^5 se unen para formar alquileo opcionalmente sustituido o heteroalquileo opcionalmente sustituido y, tomados juntos con los carbonos a los que se unen, proporcionan un heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclilo bicíclico, tricíclico o tetracíclico, R^3 y uno o más de $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, $R^{2''}$, o R^5 se unen para formar heteroalquileo (por ejemplo, $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$, donde $b1$, $b2$ y $b3$ son, independientemente, un entero de 0 a 3).

20 En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVl), y (IXa)-(IXr)), R^5 y uno o más de $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, o $R^{2''}$ se unen para formar alquileo opcionalmente sustituido o heteroalquileo opcionalmente sustituido y, tomados juntos con los carbonos a los que se encuentran unidos, proporcionan un heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, un heterociclilo bicíclico, tricíclico o tetracíclico, R^5 y uno o más de $R^{1'}$, $R^{1''}$, $R^{2'}$, o $R^{2''}$ se unen para formar heteroalquileo (por ejemplo, $-(CH_2)_{b1}O(CH_2)_{b2}O(CH_2)_{b3}-$, donde cada uno de $b1$, $b2$ y $b3$ es, independientemente, un entero de 0 a 3).

25 En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVl), y (IXa)-(IXr)), cada Y^2 es, independientemente, O, S, o $-NR^{N1}-$, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido. En realizaciones particulares, Y^2 es $NR^{N1}-$, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C_{1-6} , tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo).

30 En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVl), y (IXa)-(IXr)), cada Y^3 es, independientemente, O o S.

35 En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVl), y (IXa)-(IXr)), R^1 es H; cada R^2 es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxi, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi) o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, donde $s1$ es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de $s2$ y $s3$, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C_{1-20} , tal como donde $s2$ es 0, $s1$ es 1 o 2, $s3$ es 0 o 1, y R' es alquilo C_{1-6}); cada Y^2 es, independientemente, O o $-NR^{N1}-$, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C_{1-6} , tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo)); y cada Y^3 es, independientemente, O o S (por ejemplo, S). En aspectos adicionales, R^3 es H, halo (p. ej., fluoro), hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido (p. ej., metoxi o etoxi) o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aun otros aspectos, cada Y^1 es, independientemente, O o $-NR^{N1}-$, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C_{1-6} , tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo)); y cada Y^4 es, independientemente, H, hidroxi, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido.

40 En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVl), y (IXa)-(IXr)), cada R^1 es, independientemente, H, halo (por ejemplo, fluoro), hidroxi, alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxi o etoxi) o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, donde $s1$ es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de $s2$ y $s3$, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C_{1-20} , tal como donde $s2$ es 0, $s1$ es 1 o 2, $s3$ es 0 o 1, y R' es alquilo C_{1-6}); R^2 es H; cada Y^2 es, independientemente, O o $-NR^{N1}-$, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, donde R^{N1} es
60 es

H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C_{1-6} , tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo)); y cada Y^3 es, independientemente, O o S (por ejemplo, S). En aspectos adicionales, R^3 es H, halo (p. ej., fluoro), hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido (p. ej., metoxi o etoxi) o alcoxialcoxi opcionalmente sustituido. En aun otros aspectos, cada Y^1 es, independientemente, O o $-NR^{N1}-$, donde R^{N1} es H, alquilo

opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, alquilo C_{1-6} , tal como metilo, etilo, isopropilo o n-propilo)); y cada Y^4 es, independientemente, H, hidroxil, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido.

En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVf), y (IXa)-(IXr)), el anillo que incluye U está en la configuración β -D (por ejemplo, β -D-ribo).

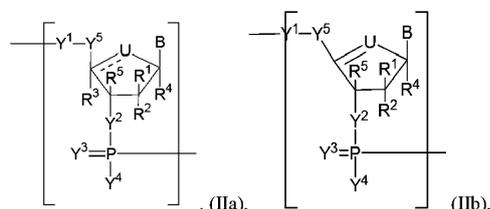
En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVf), y (IXa)-(IXr)), el anillo que incluye U está en la configuración α -L (por ejemplo, α -L-ribo).

En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVf), y (IXa)-(IXr)), uno o más B no es pseudouridina (ψ) o 5-metil-citidina (m^5C).

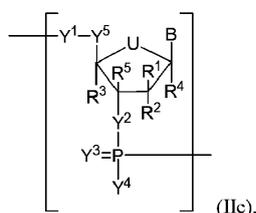
En algunos aspectos, aproximadamente del 10 % a aproximadamente el 100 % de la cantidad n de n nucleobases B no es ψ ni m^5C (por ejemplo, del 10 % al 20 %, del 10 % al 35 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 75 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 10 % al 98 %, del 10 % al 99 %, del 20 % al 35 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 75 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %, del 20 % al 98 %, del 20 % al 99 %, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 75 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 95 %, del 50 % al 98 %, del 50 % al 99 %, del 50 % al 100 %, del 75 % al 90 %, del 75 % al 95 %, del 75 % al 98 %, del 75 % al 99 % y del 75 % al 100 % de la cantidad n de B no es ψ ni m^5C). En algunos aspectos, B no es ψ ni m^5C .

En algunos aspectos de los polinucleótidos (por ejemplo, las Fórmulas (Ia)-(Ia-5), (Ib)-(Ib-1), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIIn-1), (IIIn-2), (IVa)-(IVf), y (IXa)-(IXr)), cuando B es una nucleobase no modificada seleccionada de citosina, guanina, uracilo y adenina, entonces al menos uno de Y^1 , Y^2 , o Y^3 no es O.

En algunos casos, el polinucleótido incluye una ribosa modificada. En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIa)-(IIc):



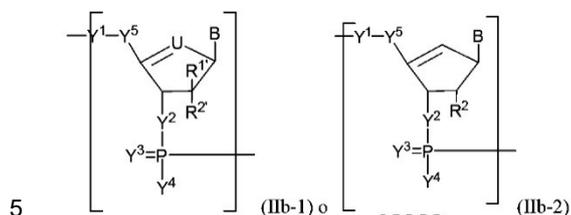
o



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo. En casos particulares, U es O o $C(R^U)_{nu}$, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, U es $-CH_2-$ o $-CH-$). En otras realizaciones, cada uno de R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y R^5 es, independientemente, H, halo, hidroxil, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquinoxil opcionalmente sustituido, alquiniloxil opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquinoxil opcionalmente sustituido, aminoalquiniloxil opcionalmente sustituido o ausente (por ejemplo, cada R^1 y R^2 es, independientemente, H, halo, hidroxil, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido; cada R^3 y R^4 es, independientemente, H u alquilo opcionalmente sustituido; y R^5 es H o hidroxil), y

es un enlace sencillo o enlace doble.

En casos particulares, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIb-1)-(IIb-2):

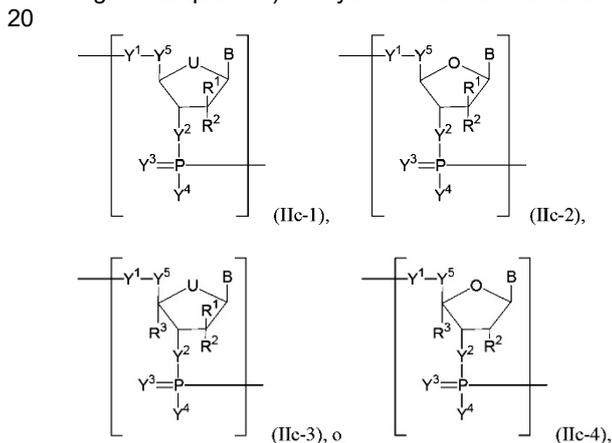


o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo. En algunos casos, U es O o $C(R^U)_{nu}$, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, U es $-CH_2-$ o $-CH-$). En otros casos, cada uno de R^1 y R^2 es, independientemente, H, halo, hidroxil, tior, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoiloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenoil opcionalmente sustituido, aminoalquinoil opcionalmente sustituido o ausente (por ejemplo, cada R^1 y R^2 es, independientemente, H, halo, hidroxil, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, por ejemplo, H, halo, hidroxil, alquilo o alcoxi). En casos particulares, R^2 es hidroxil o alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxil, etoxil o cualquiera descrito en esta invención).

10

15

En casos particulares, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIc-1)-(IIc-4):



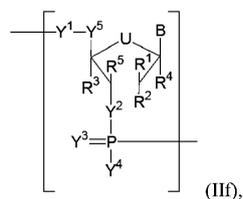
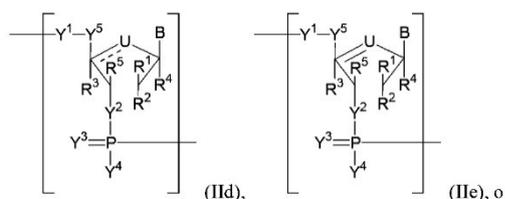
25 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

En algunos casos, U es O o $C(R^U)_{nu}$, donde nu es un número entero de 0 a 2 y cada R^U es, independientemente, H, halo o alquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, U es $-CH_2-$ o $-CH-$). En algunos casos, cada uno de R^1 , R^2 y R^3 es, independientemente, H, halo, hidroxil, tior, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoiloxi opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, hidroxialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, azido, arilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenoil opcionalmente sustituido, aminoalquinoil opcionalmente sustituido o ausente (por ejemplo, cada R^1 y R^2 es, independientemente, H, halo, hidroxil, alquilo opcionalmente sustituido u alcoxi opcionalmente sustituido, por ejemplo, H, halo, hidroxil, alquilo o alcoxi; y cada R^3 es, independientemente, H o alquilo opcionalmente sustituido). En casos particulares, R^2 es alcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, metoxil o etoxil, o cualquiera descrito en esta invención). En casos particulares, R^1 es alquilo opcionalmente sustituido, y R^2 es hidroxil. En otros casos, R^1 es hidroxil, y R^2 es alquilo opcionalmente sustituido. En casos adicionales, R^3 es alquilo opcionalmente sustituido.

30

35

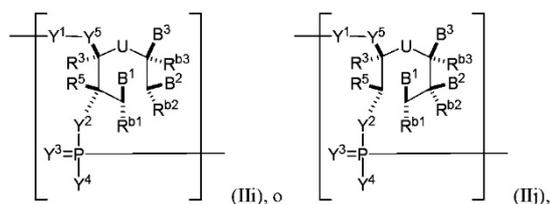
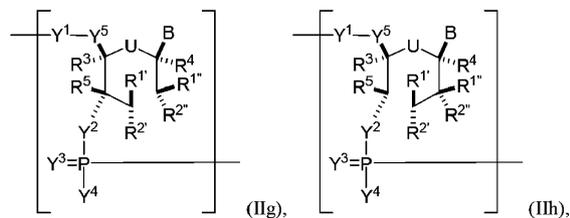
40 En algunos casos, el polinucleótido incluye una ribosa modificada acíclica. En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIe)-(IIf):



5 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

En algunos casos, el polinucleótido incluye un hexitol modificado acíclico. En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIg)-(IIj):

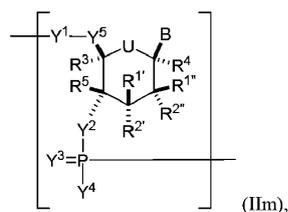
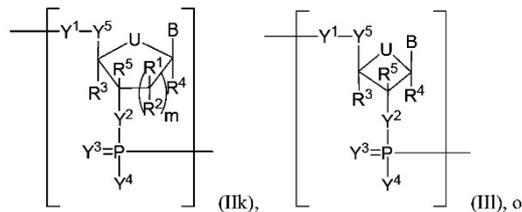
10



15 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo.

En algunos casos, el polinucleótido incluye un resto de azúcar que tiene un anillo de ribosa contraído o expandido. En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (IIk)-(IIm):

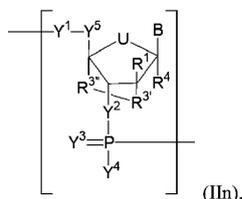
20



25 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada uno de R^{1'}, R^{1''}, R^{2'} y R^{2''} es, independientemente, H, halo, hidroxi, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinoxio opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi

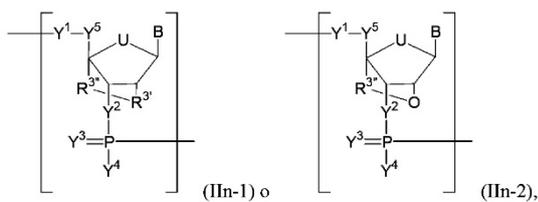
opcionalmente sustituido o ausente; y donde la combinación de R^{2'} y R³ o la combinación de R^{2''} y R³ se pueden tomar juntos para formar alquileo opcionalmente sustituido o heteroalquileo opcionalmente sustituido.

5 En algunos casos, el polinucleótido incluye una ribosa modificada bloqueada. En algunas realizaciones, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (II_n):



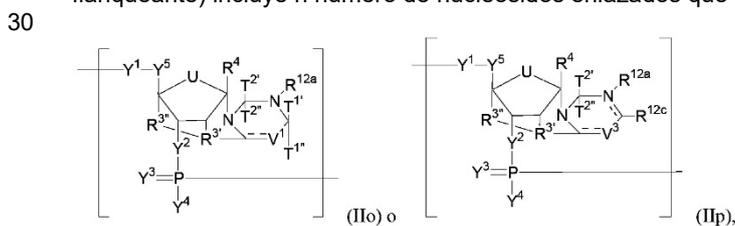
10 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde R^{3'} es O, S, o -NR^{N1}-, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido y R^{3''} es alquileo opcionalmente sustituido (por ejemplo, -CH₂-, -CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂-) o heteroalquileo opcionalmente sustituido (por ejemplo, -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂OCH₂-, o -CH₂CH₂OCH₂-) (por ejemplo, R^{3'} es O y R^{3''} es alquileo opcionalmente sustituido (por ejemplo, -CH₂-, -CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂-)).

15 En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (II_{n-1})-(II_{n-2}):



20 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde R^{3'} es O, S, o -NR^{N1}-, donde R^{N1} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, o arilo opcionalmente sustituido y R^{3''} es alquileo opcionalmente sustituido (por ejemplo, -CH₂-, -CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂-) o heteroalquileo opcionalmente sustituido (por ejemplo, -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂OCH₂-, o -CH₂CH₂OCH₂-) (por ejemplo, R^{3'} es O y R^{3''} es alquileo opcionalmente sustituido (por ejemplo, -CH₂-, -CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂-)).

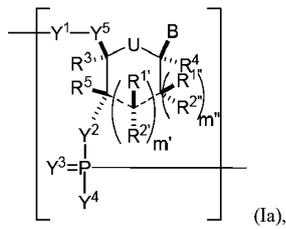
25 En algunos casos, el polinucleótido incluye una ribosa modificada bloqueada que forma un heterociclilo tetracíclico. En algunos casos, el polinucleótido (por ejemplo, la primera región, la primera región flanqueante o la segunda región flanqueante) incluye n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (II_o):



35 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde R^{12a}, R^{12c}, T^{1'}, T^{1''}, T^{2'}, T^{2''}, V¹ y V³ son como se describe en esta invención.

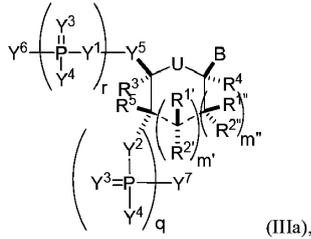
Cualquiera de las fórmulas para los polinucleótidos puede incluir una o más nucleobases descritas en esta invención (por ejemplo, Fórmulas (b1)-(b43)).

40 En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para preparar un polinucleótido que comprende al menos un nucleótido que interrumpe la unión de un compañero que interactúa con el surco principal con el ácido nucleico, donde el polinucleótido comprende n número de nucleósidos que tienen Fórmula (Ia), tal como se define en esta invención:



el procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa), tal como se define en esta invención:

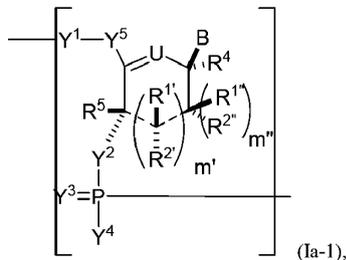
5



con una polimerasa de ARN y una plantilla de ADNc.

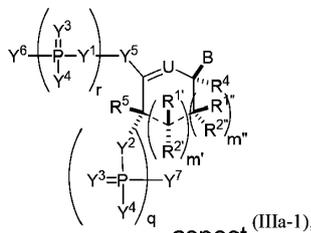
10 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona procedimientos para amplificar un polinucleótido que comprende al menos un nucleótido que interrumpe la unión de un compañero de unión de surco principal con la secuencia de polinucleótidos, donde el procedimiento comprende: hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa), como se define en esta invención, con un cebador, una plantilla de ADNc y una polimerasa de ARN.

15 En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para preparar un polinucleótido que comprende al menos un nucleótido que interrumpe la unión de un compañero que interactúa con el surco principal con el ácido nucleico, donde el polinucleótido comprende n número de nucleósidos que tienen la Fórmula (Ia-1), tal como se define en esta invención:



20

el procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa-1), tal como se define en esta invención:



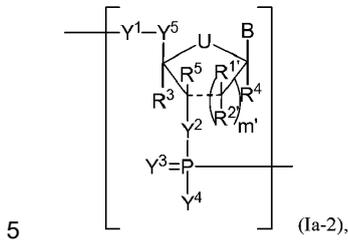
25

con una polimerasa de ARN y una plantilla de ADNc.

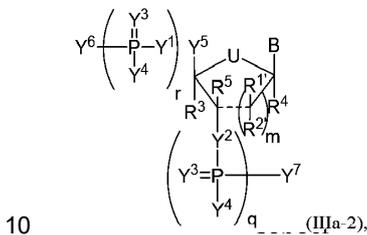
30 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona procedimientos para amplificar un polinucleótido que comprende al menos un nucleótido (por ejemplo, molécula de ARNm modificado) que interrumpe la unión de un compañero de unión de surco principal con la secuencia de polinucleótidos, comprendiendo el procedimiento: hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa-1), tal como se define en esta invención, con un cebador, una plantilla de ADNc y una polimerasa de ARN.

35 En un aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para preparar un polinucleótido que comprende al

menos un nucleótido que interrumpe la unión de un compañero de interacción de surco principal con la secuencia de ácido nucleico, donde el polinucleótido comprende n número de nucleósidos que tienen la Fórmula (Ia-2), tal como se define en esta invención:



el procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa-2), como se define en esta invención:



con una polimerasa de ARN y una plantilla de ADNc.

15 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona procedimientos para amplificar un polinucleótido que comprende al menos un nucleótido (por ejemplo, molécula de ARNm modificado) que interrumpe la unión de un compañero de unión de surco principal con el polinucleótido, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar un compuesto de Fórmula (IIIa-2), como se define en esta invención, con un cebador, una plantilla de ADNc y una polimerasa de ARN.

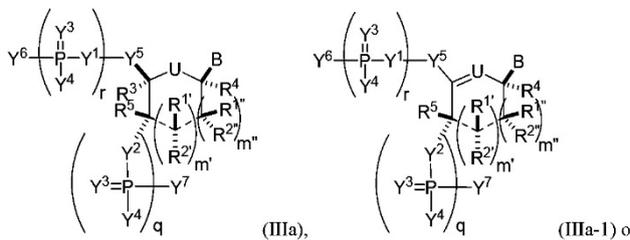
20 En algunos aspectos, la reacción se puede repetir de 1 a aproximadamente 7.000 veces. En cualquiera de los aspectos de esta invención, B puede ser una nucleobase de Fórmula (b1)-(b43).

Los polinucleótidos pueden incluir opcionalmente regiones flanqueantes 5' y/o 3', que se describen en esta invención.

25 **Nucleótidos y nucleósidos modificados**

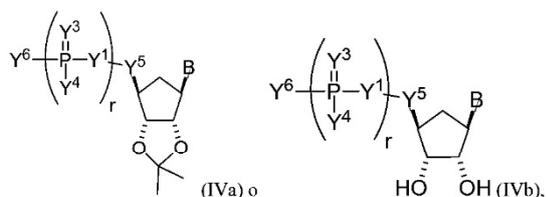
La presente descripción también incluye los bloques de construcción, por ejemplo, ribonucleósidos modificados, ribonucleótidos modificados, de los polinucleótidos, por ejemplo, moléculas de ARN (o ARNm) modificadas. Por ejemplo, estos bloques de construcción pueden ser útiles para preparar los polinucleótidos de la descripción.

30 En algunos casos, la molécula de bloque de construcción tiene la Fórmula (IIIa) o (IIIa-1):



35 sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde los sustituyentes son como se describe en esta invención (por ejemplo, para la Fórmula (Ia) y (Ia-1)), y donde cuando B es una nucleobase no modificada seleccionada de citosina, guanina, uracilo y adenina, entonces al menos uno de Y¹, Y² o Y³ no es O.

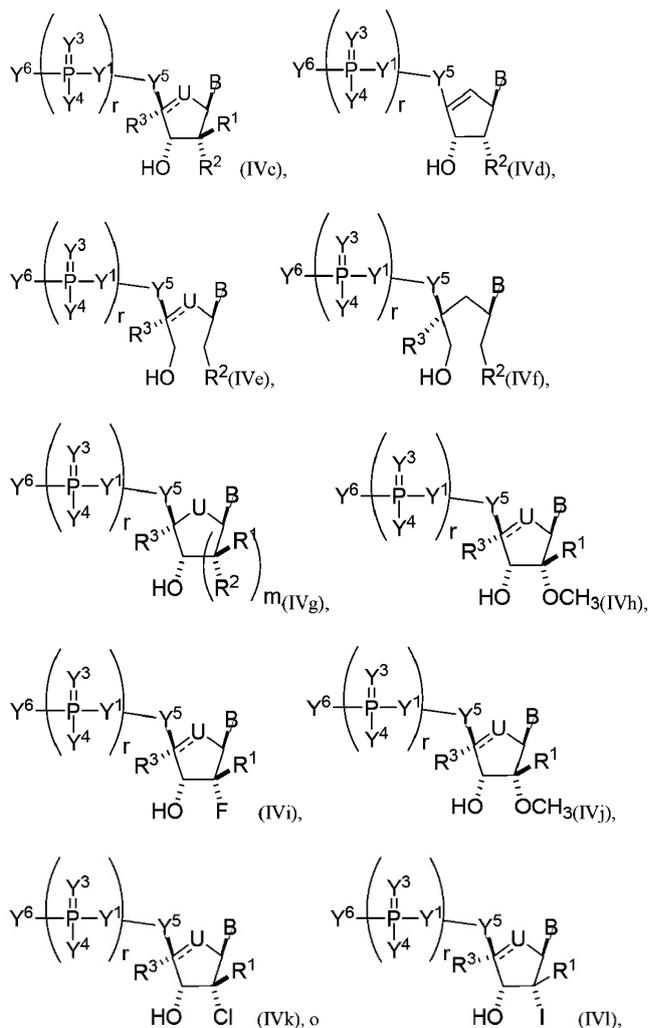
40 En algunos casos, la molécula de bloque de construcción, que puede incorporarse en un polinucleótido, tiene la Fórmula (IVa)-(IVb):



o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).

5 En casos particulares, la Fórmula (IVa) o (IVb) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23), y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29), o (b30)). En casos particulares, la Fórmula (IVa) o (IVb) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como los casos de fórmula (b10) o (b32)). En casos particulares, la Fórmula (IVa) o (IVb) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)). En casos particulares, la Fórmula (IVa) o (IVb) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

15 En algunos casos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido, tiene la Fórmula (IVc)-(IVk):



o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).

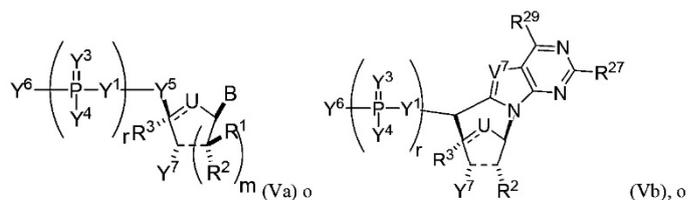
30 En casos particulares, una de las Fórmulas (IVc)-(IVk) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)).

En casos particulares, una de las Fórmulas (IVc)-(IVk) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).

5 En casos particulares, una de las Fórmulas (IVc)-(IVk) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)).

En casos particulares, una de las Fórmulas (IVc)-(IVk) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

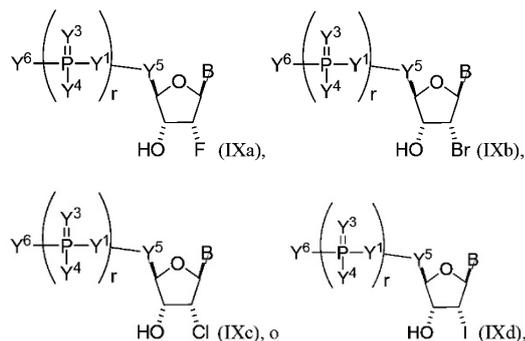
10 En otros casos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido tiene la fórmula (Va) o (Vb):



15 sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).

En otros casos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido tiene la fórmula (IXa)-(IXd):

20



25 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)). En casos particulares, una de las Fórmulas (IXa)-(IXd) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)). En casos particulares, una de las Fórmulas (IXa)-(IXd) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).

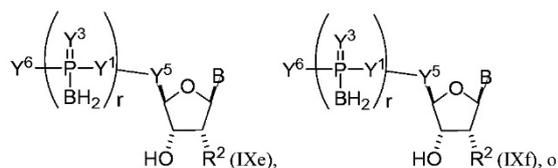
30

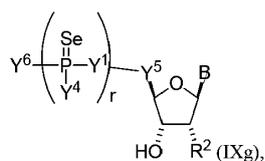
En casos particulares, una de las Fórmulas (IXa)-(IXd) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)).

35 En casos particulares, una de las Fórmulas (IXa)-(IXd) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

En otros casos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido tiene la fórmula (IXe)-(IXg):

40





o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).

5 En casos particulares, una de las Fórmulas (IXe)-(IXg) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)).

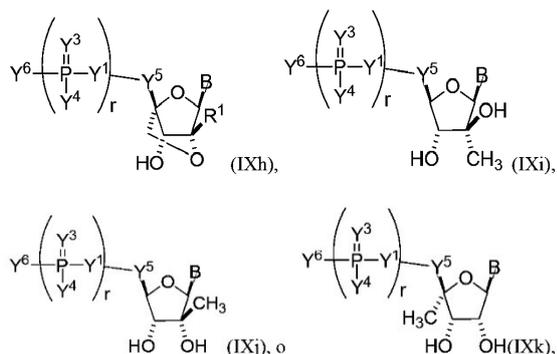
10 En casos particulares, una de las Fórmulas (IXe)-(IXg) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).

En casos particulares, una de las Fórmulas (IXe)-(IXg) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)).

15 En casos particulares, una de las Fórmulas (IXe)-(IXg) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

En otros casos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido tiene la fórmula (IXh)-(IXk):

20



25 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)). En casos particulares, una de las Fórmulas (IXh)-(IXk) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)). En casos particulares, una de las Fórmulas (IXh)-(IXk) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).

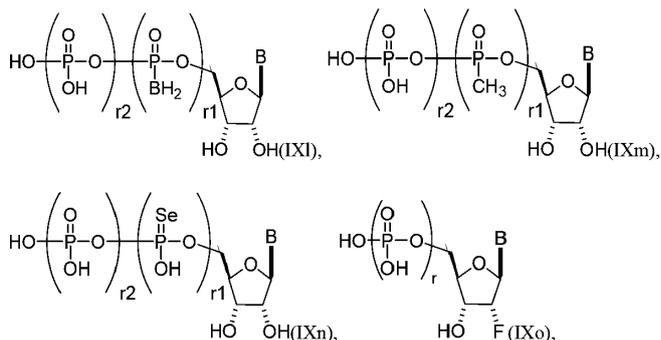
30

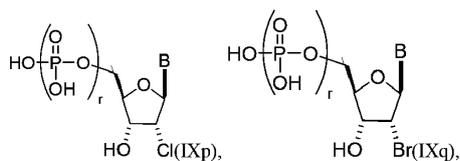
En casos particulares, una de las Fórmulas (IXh)-(IXk) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)). En casos particulares, una de las Fórmulas (IXh)-(IXk) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

35

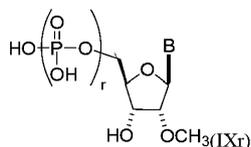
En otros casos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido tiene la fórmula (IXl)-(IXr):

40





o



5

o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r1 y r2 es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5) y B es como se describe en esta invención (por ejemplo, cualquiera de (b1)-(b43)).

10

En casos particulares, una de las Fórmulas (IXI)-(IXr) se combina con un uracilo modificado (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b1)-(b9), (b21)-(b23) y (b28)-(b31), tal como la fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)).

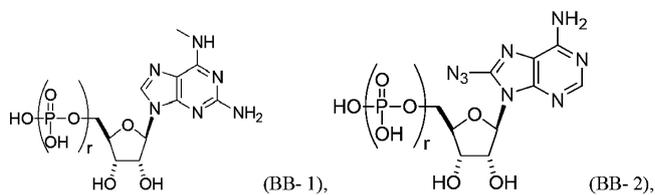
15

En casos particulares, una de las Fórmulas (IXI)-(IXr) se combina con una citosina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b10)-(b14), (b24), (b25) y (b32)-(b36), tal como la fórmula (b10) o (b32)).

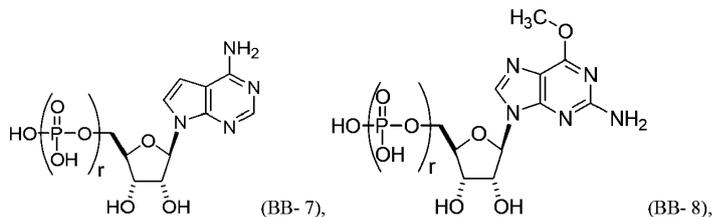
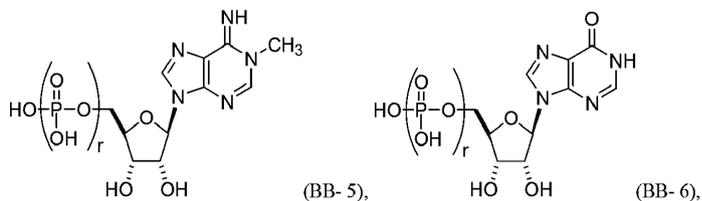
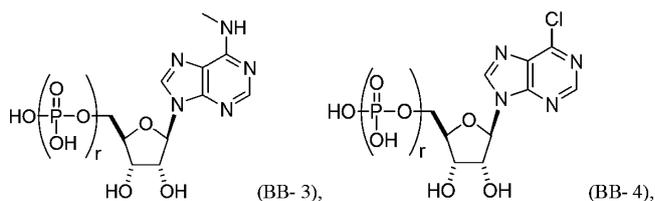
20

En casos particulares, una de las Fórmulas (IXI)-(IXr) se combina con una guanina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b15)-(b17) y (b37)-(b40)). En casos particulares, una de las Fórmulas (IXI)-(IXr) se combina con una adenina modificada (por ejemplo, cualquiera de las fórmulas (b18)-(b20) y (b41)-(b43)).

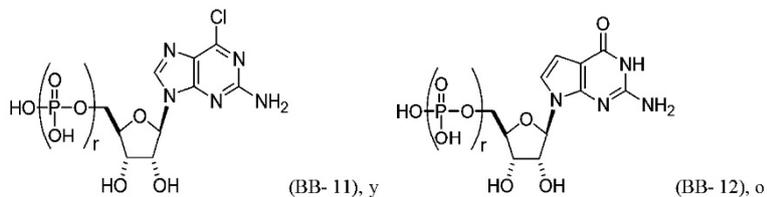
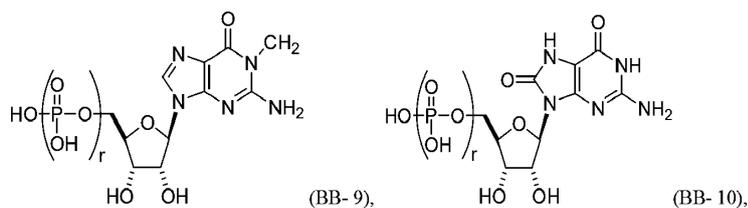
En algunos casos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido, se puede seleccionar del grupo que consiste en:



25



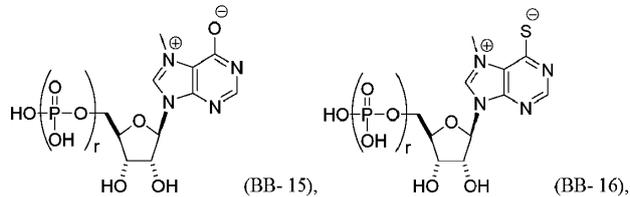
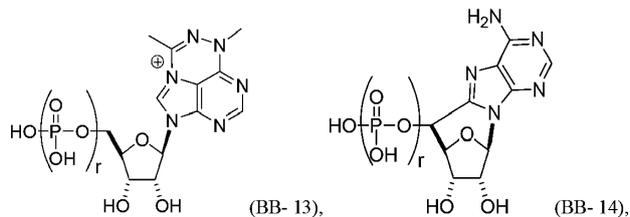
30



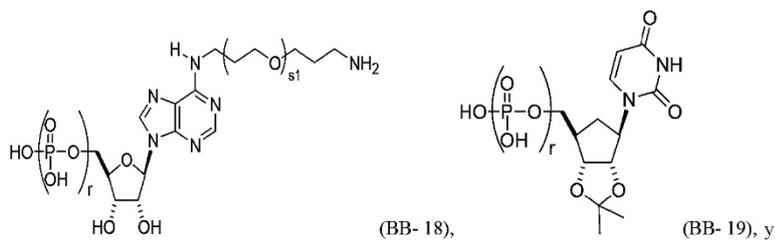
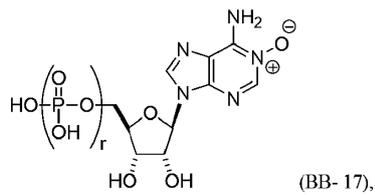
5 sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

En algunos casos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido, se puede seleccionar del grupo que consiste en:

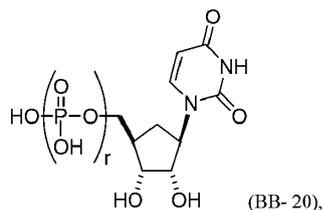
10



15



20

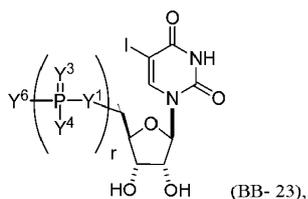
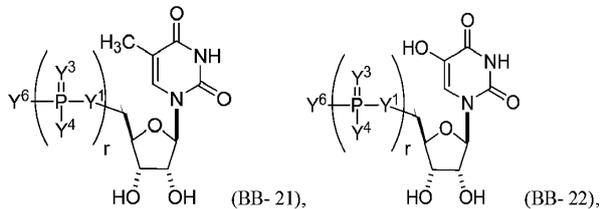


o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número

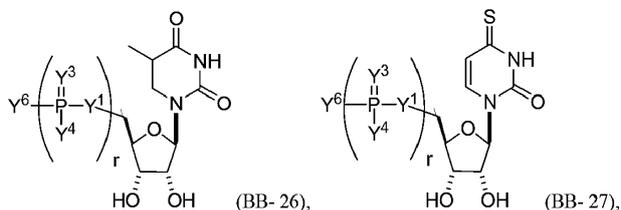
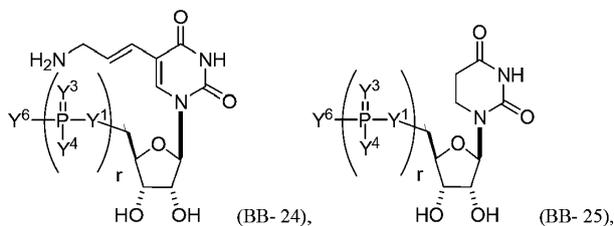
entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5) y s1 es como se describe en esta invención.

En algunos casos, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un ácido nucleico (por ejemplo, ARN, ARNm, polinucleótido), es una uridina modificada (por ejemplo, que se selecciona del grupo que consiste en:

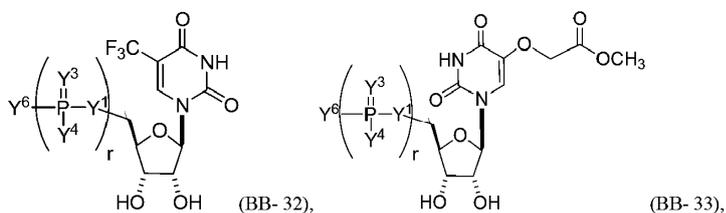
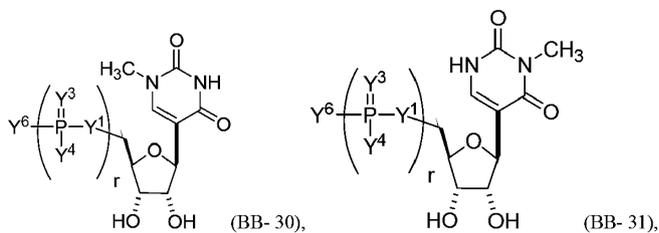
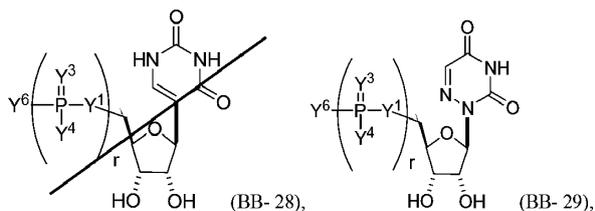
5

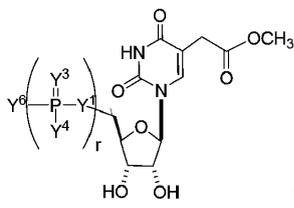


10

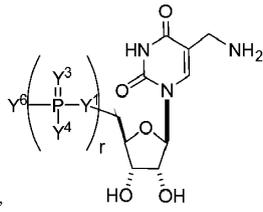


15

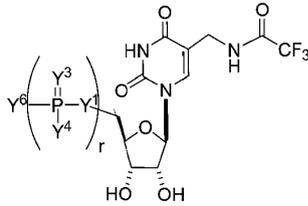




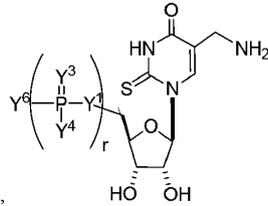
(BB-34),



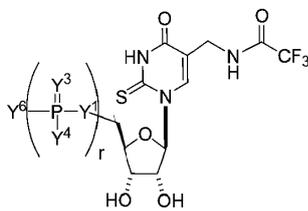
(BB-35),



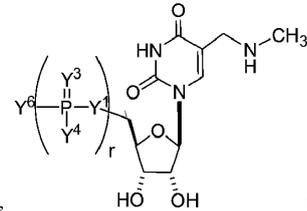
(BB-36),



(BB-37),

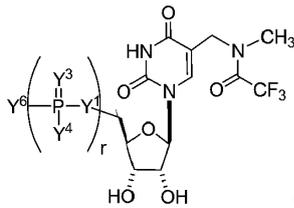


(BB-38),

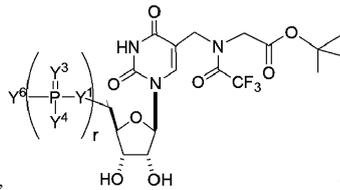


(BB-39),

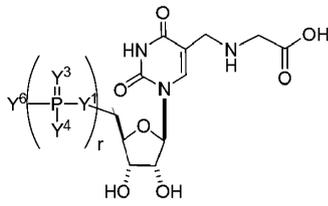
5



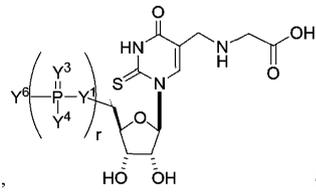
(BB-40),



(BB-41),

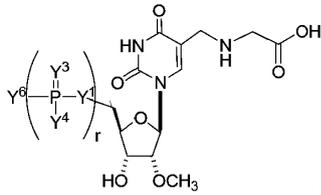


(BB-42),

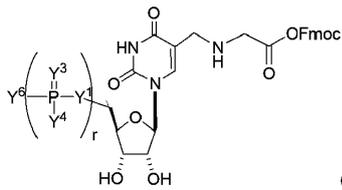


(BB-43),

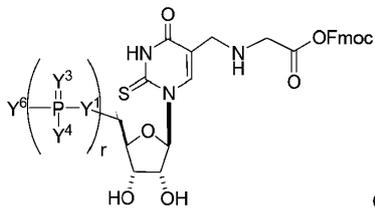
10



(BB-44),

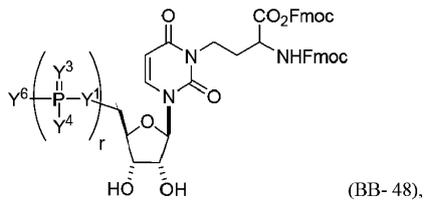
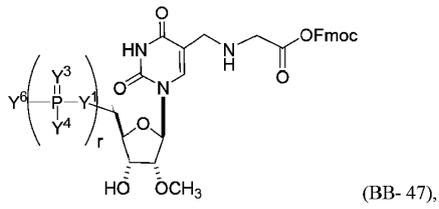


(BB-45),

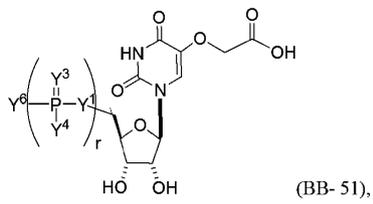
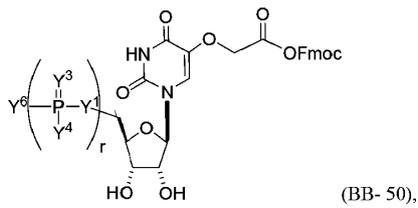
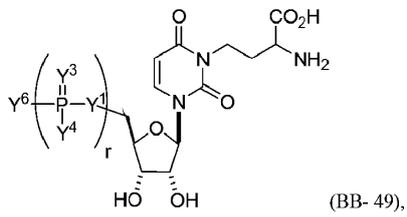


(BB-46),

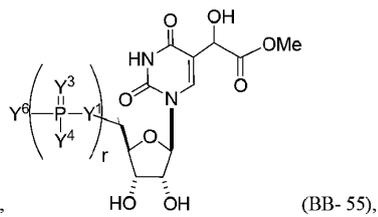
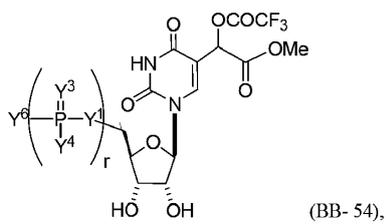
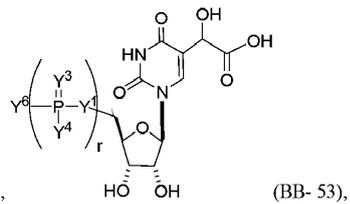
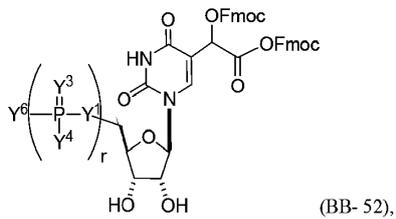
15



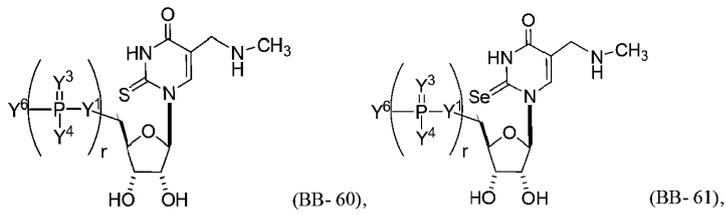
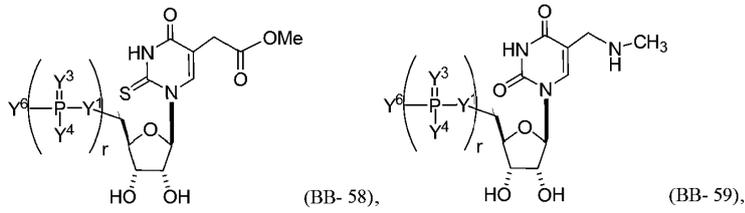
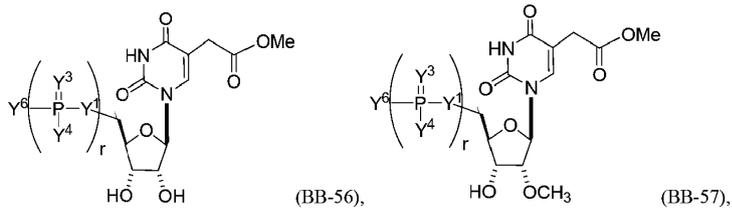
5



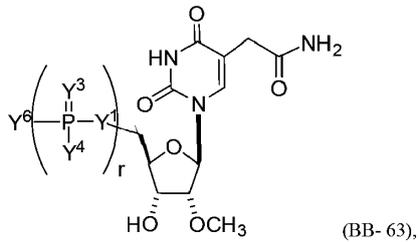
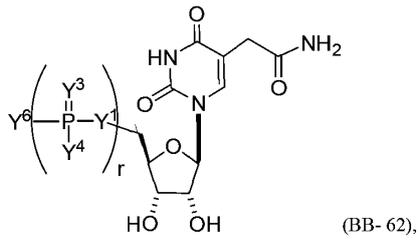
10



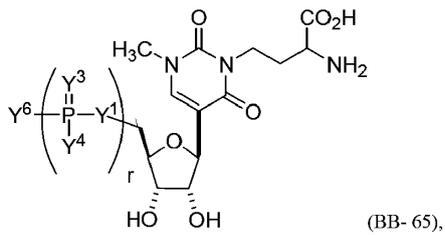
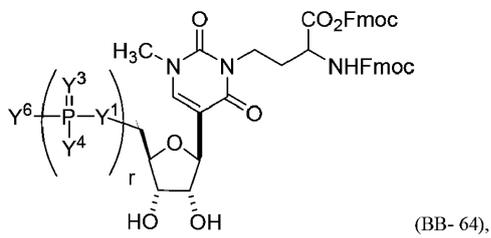
15

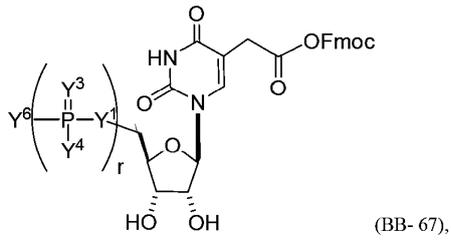
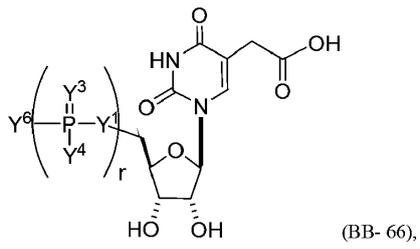


5

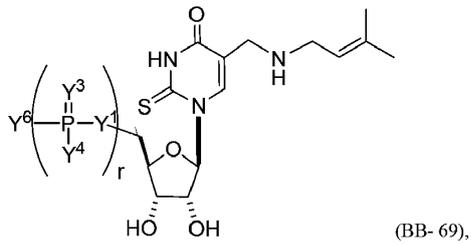
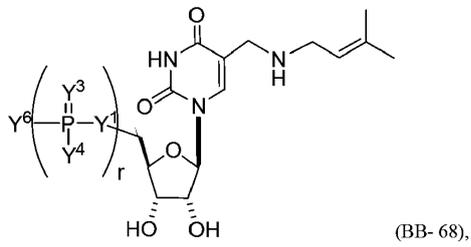


10

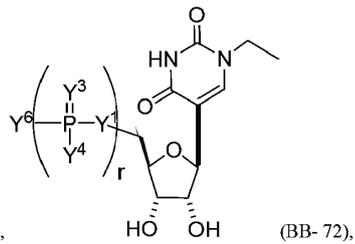
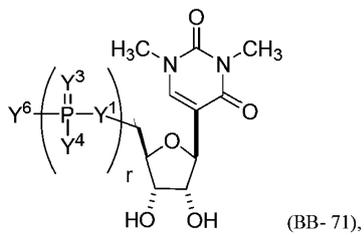
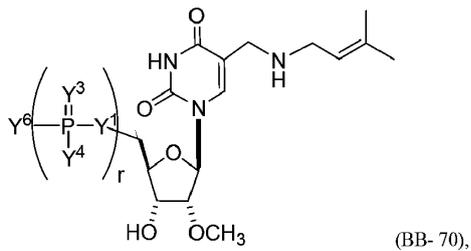


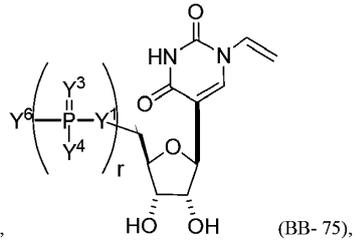
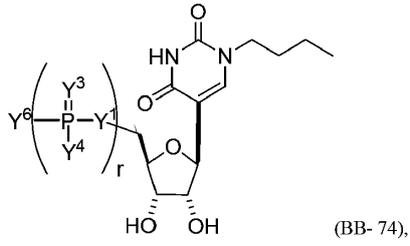
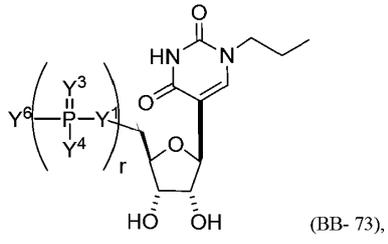


5

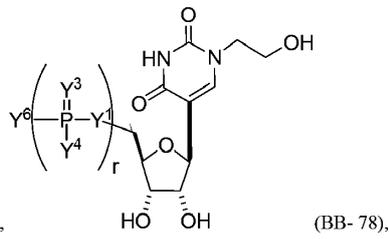
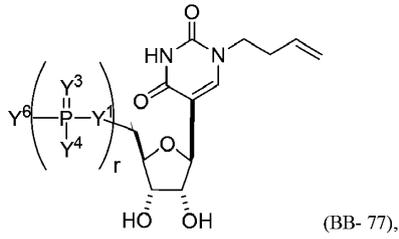
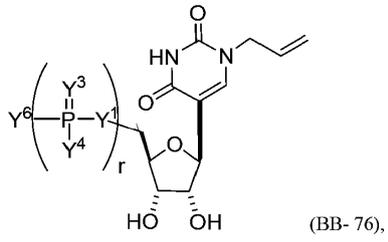


10

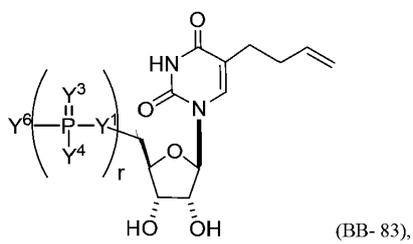
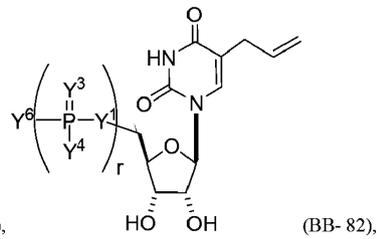
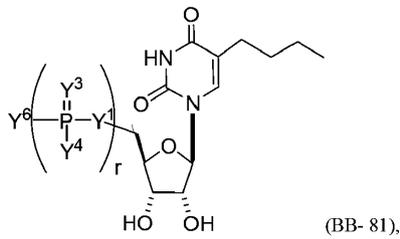
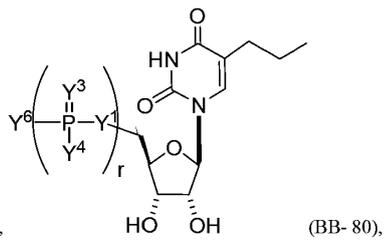
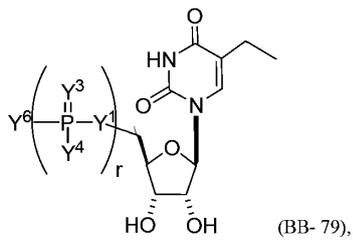


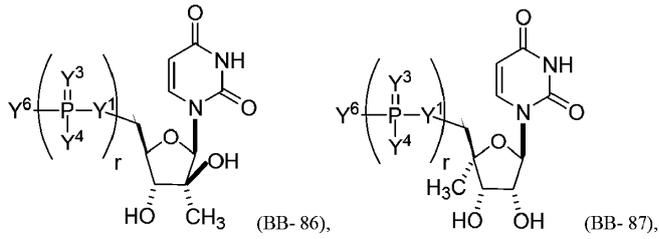
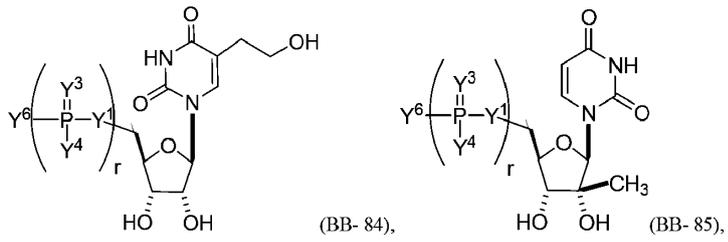


5

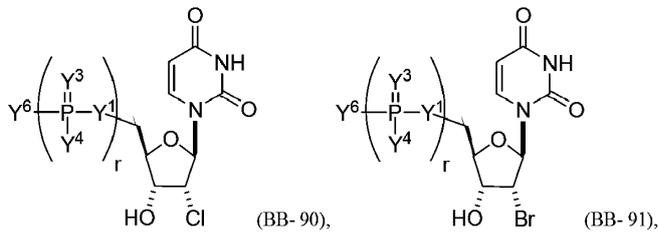
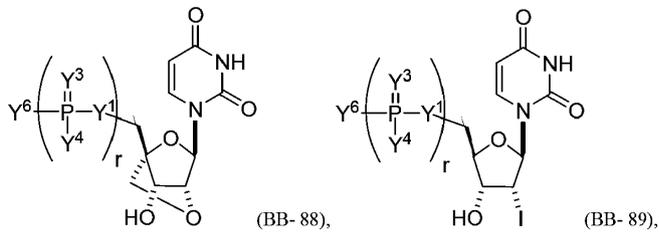


10

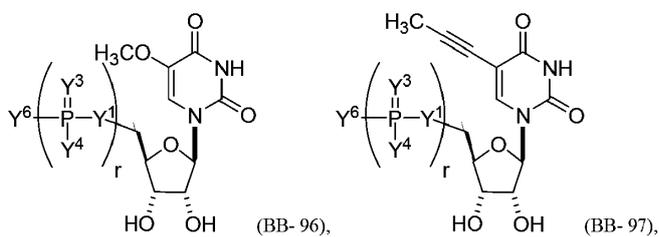
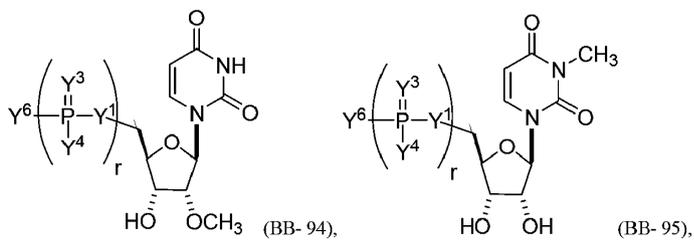
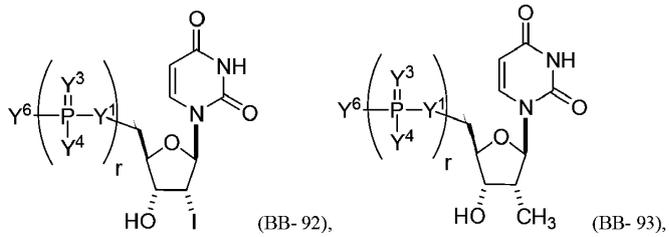


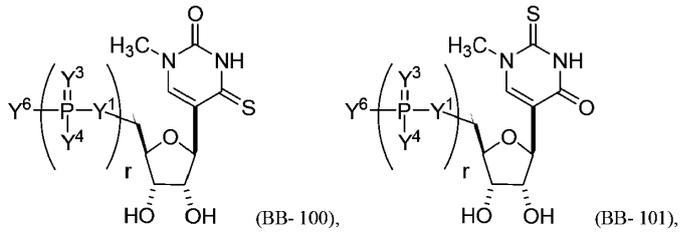
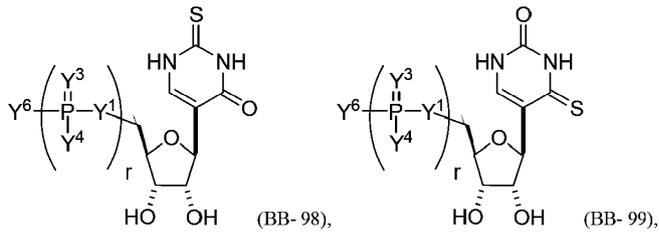


5

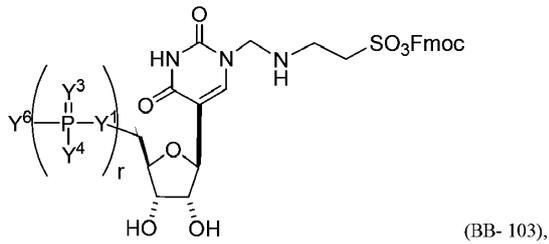
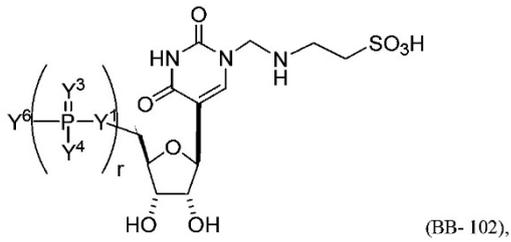


10

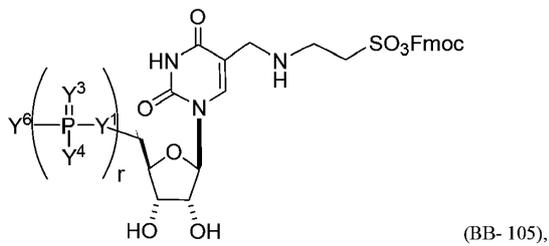
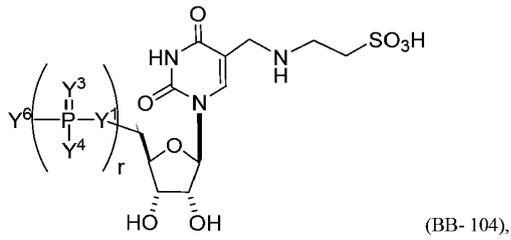


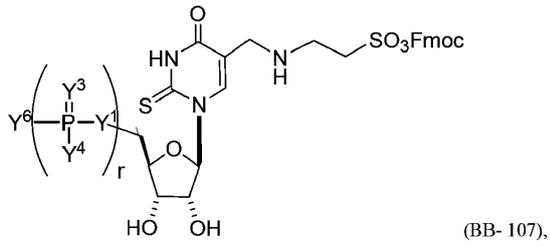
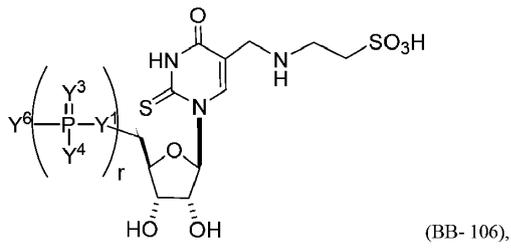


5

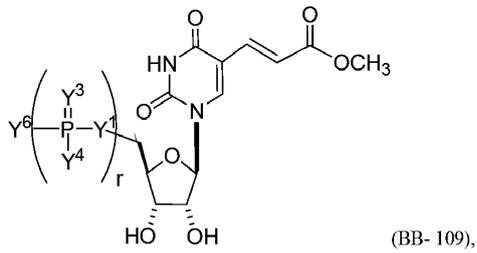
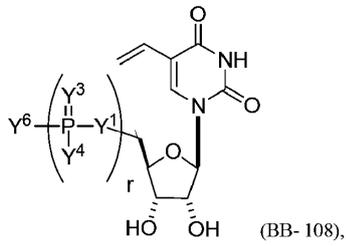


10

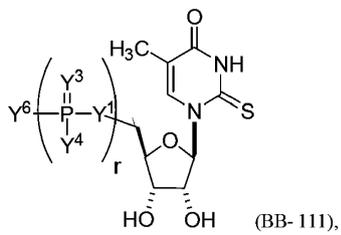
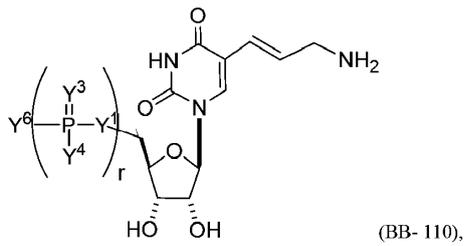


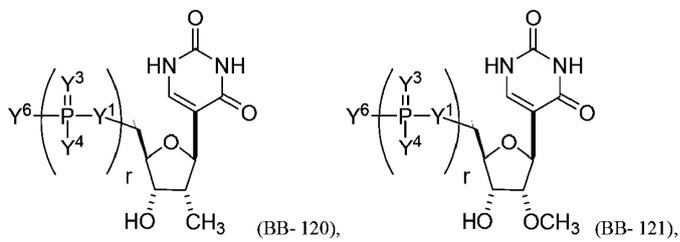
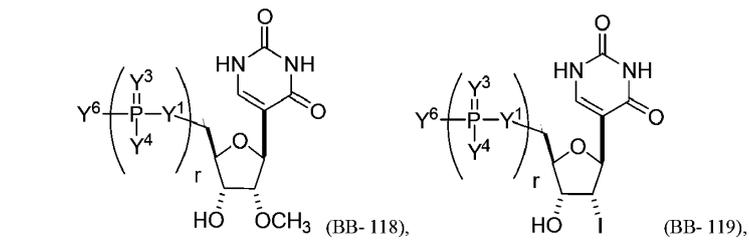
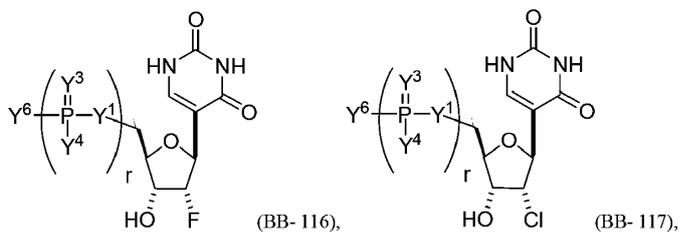
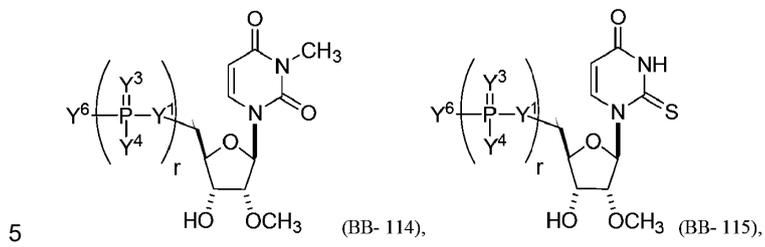
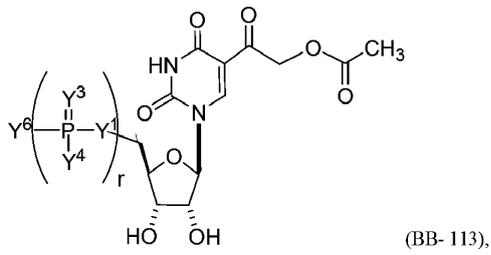
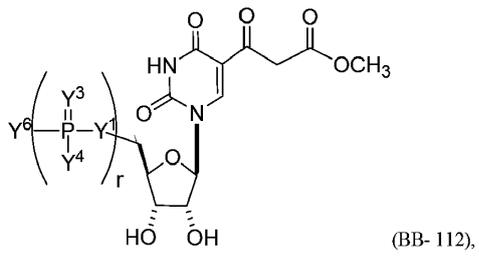


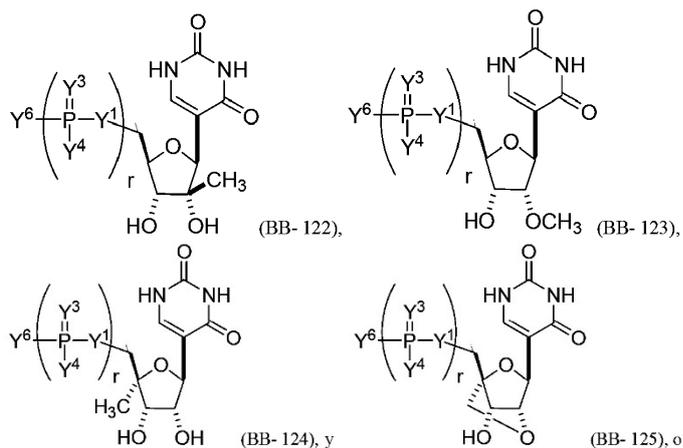
5



10



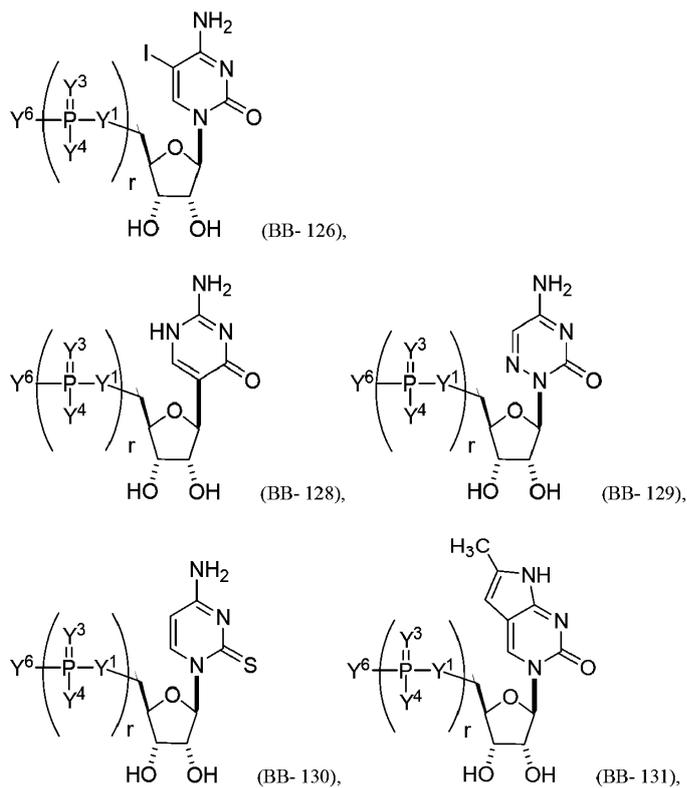




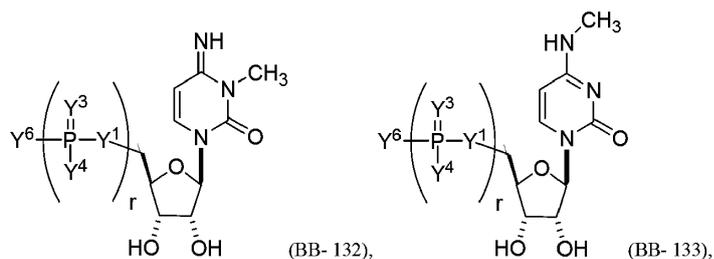
5 sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶ y r son como se describe en esta invención (por ejemplo, cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5, tal como de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5)).

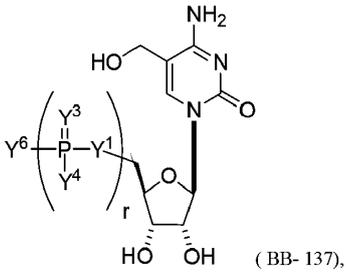
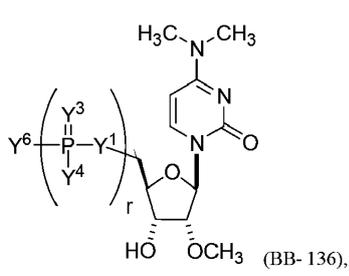
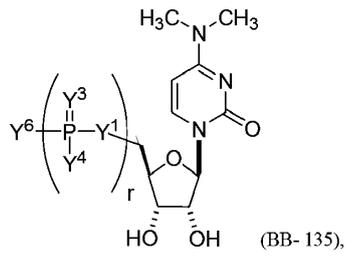
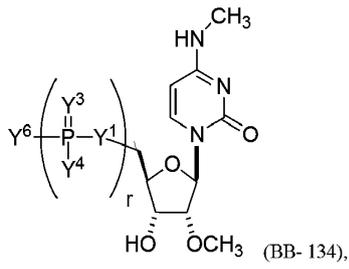
En algunos casos, la molécula de bloque de construcción, que puede incorporarse en un polinucleótido, es una citidina modificada (por ejemplo, seleccionada de entre el grupo que consiste en:

10

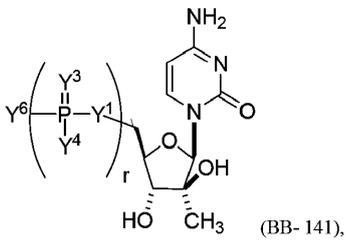
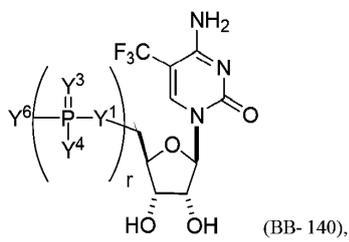
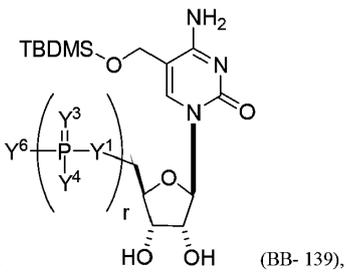
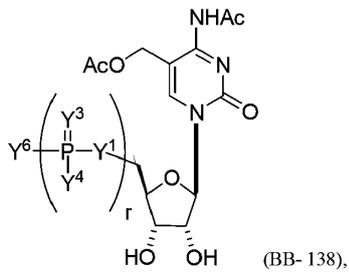


15

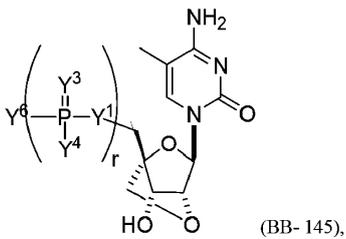
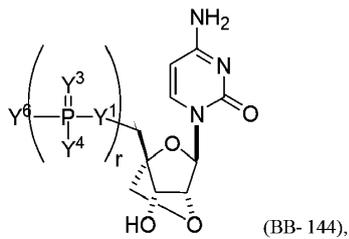
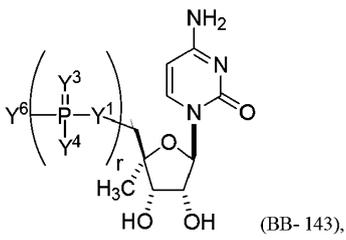
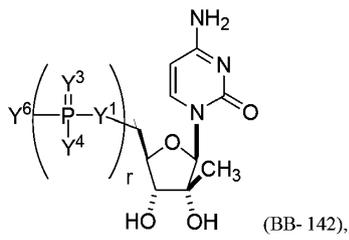


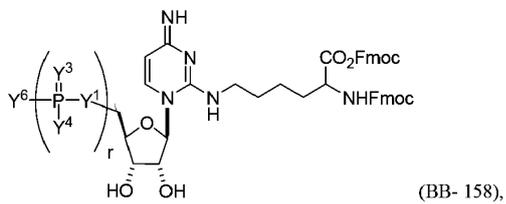
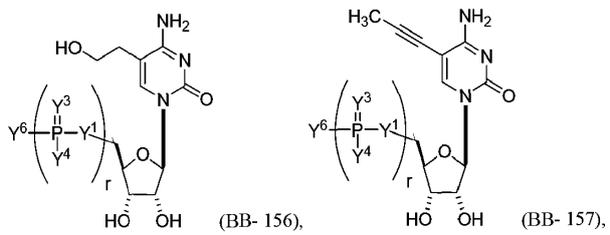
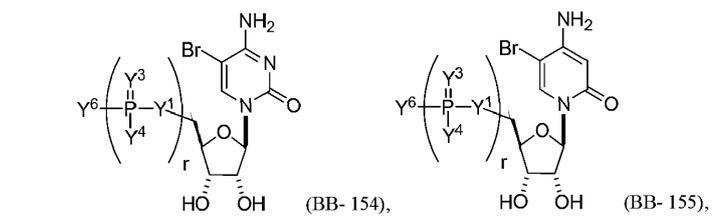
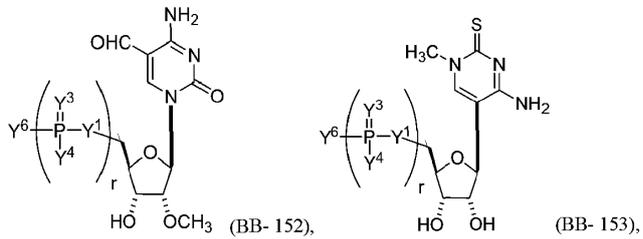
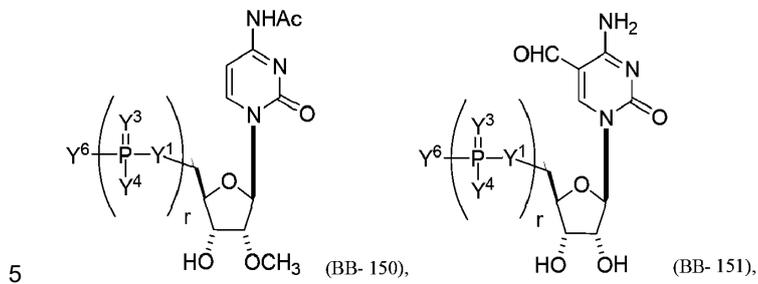
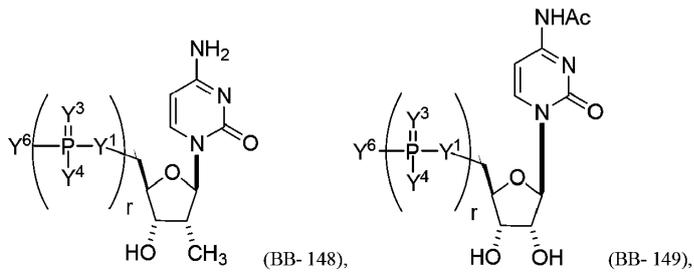
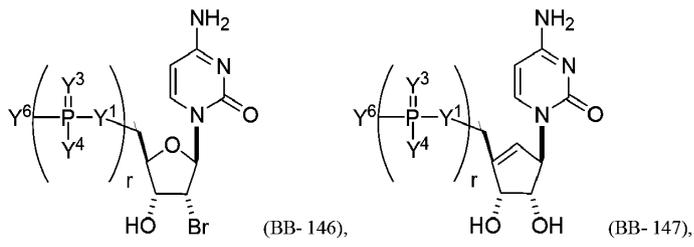


5

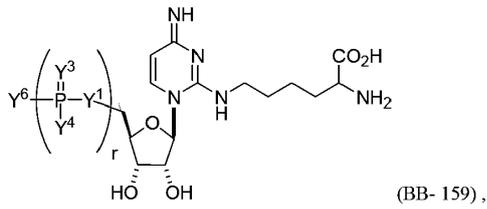


10



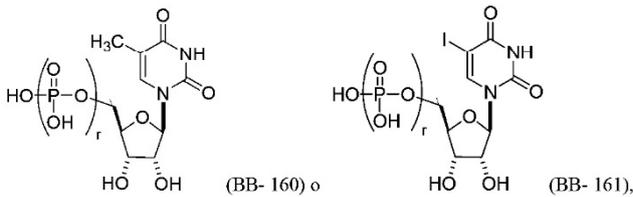


y



5 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶ y r son como se describe en esta invención (por ejemplo, cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5, tal como de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5)). Por ejemplo, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido puede ser:

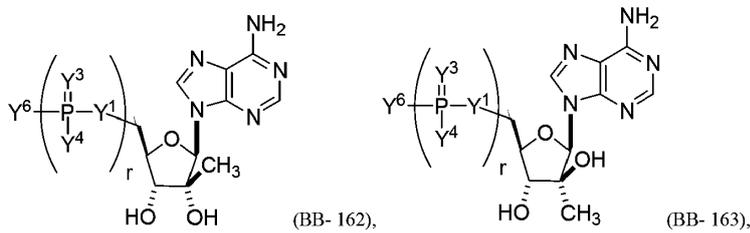
10



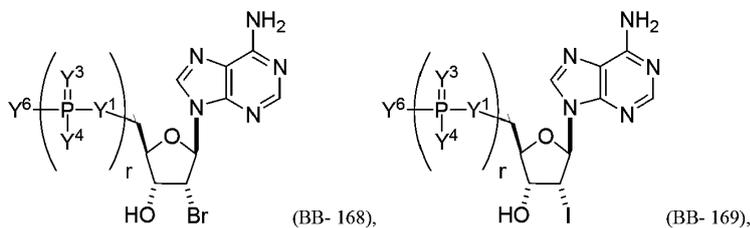
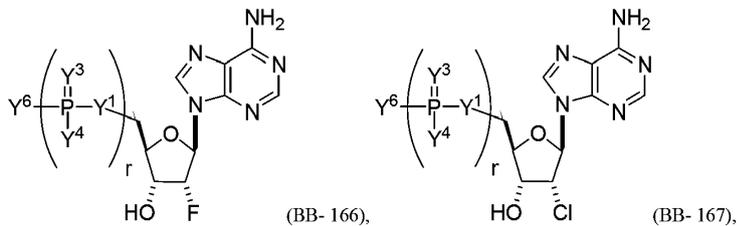
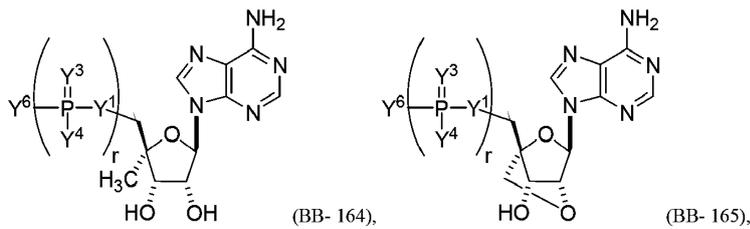
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

15

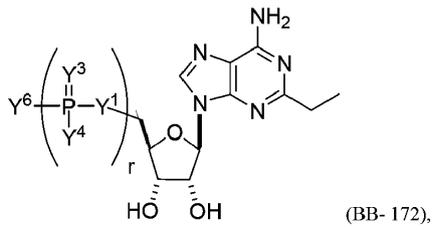
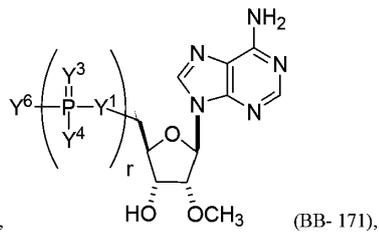
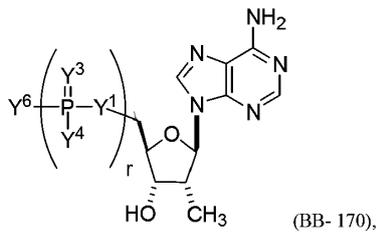
En algunos casos, la molécula de bloque de construcción, que puede incorporarse en un polinucleótido, es una adenosina modificada (por ejemplo, que se selecciona del grupo que consiste en:



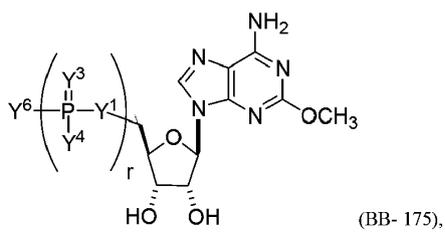
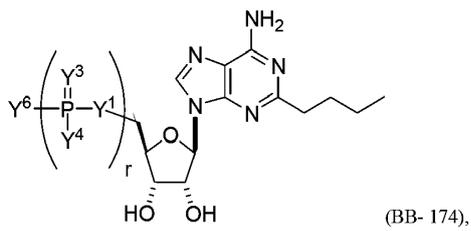
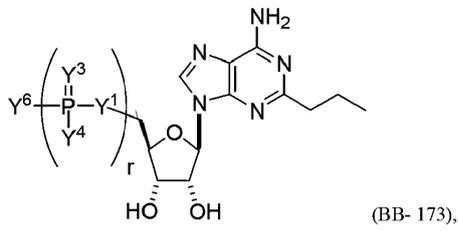
20



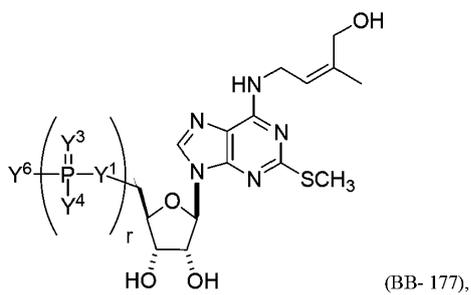
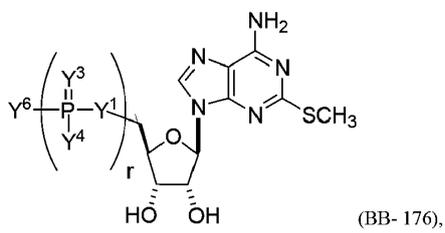
25

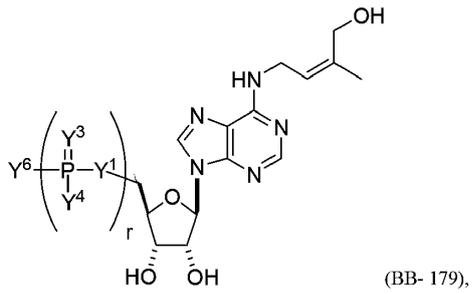
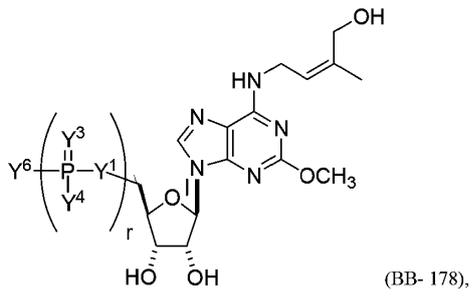


5

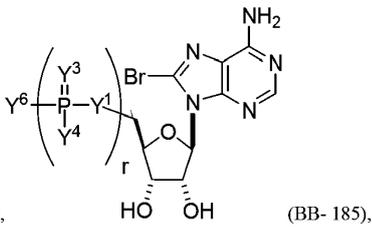
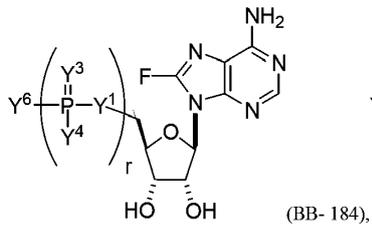
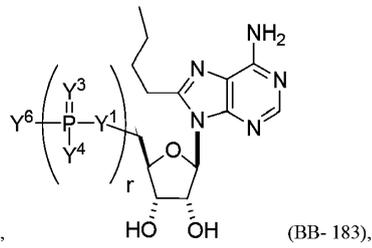
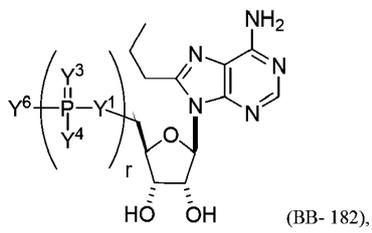
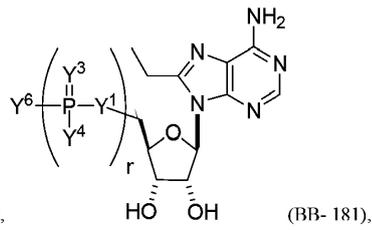
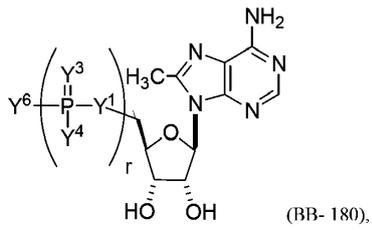


10

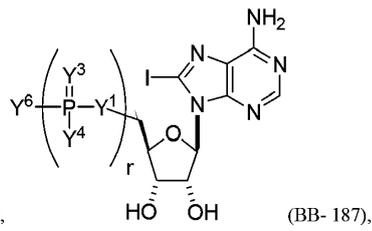
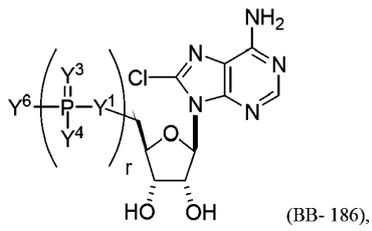


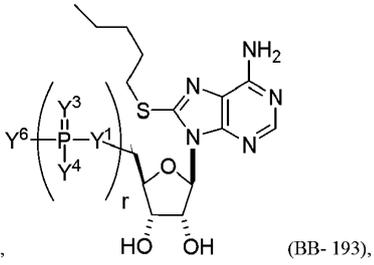
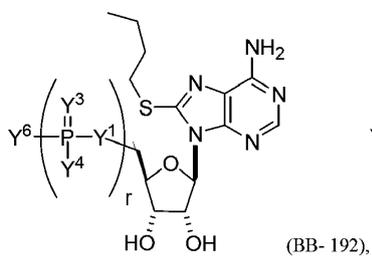
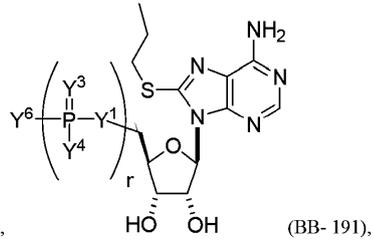
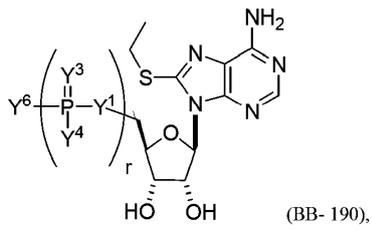
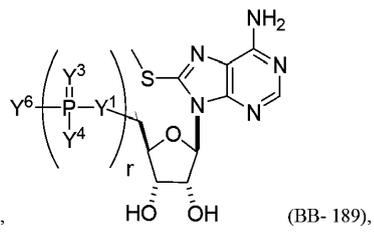
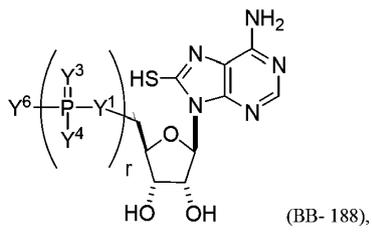


5

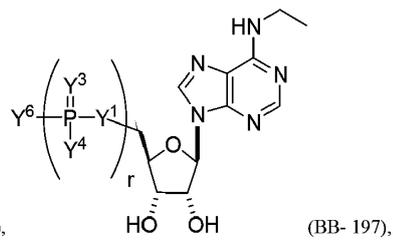
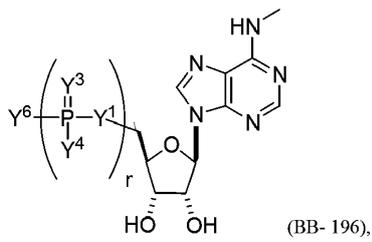
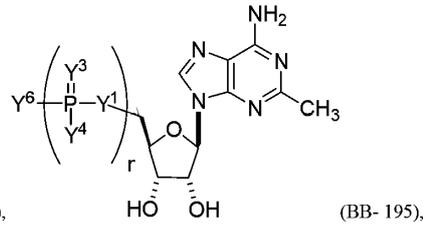
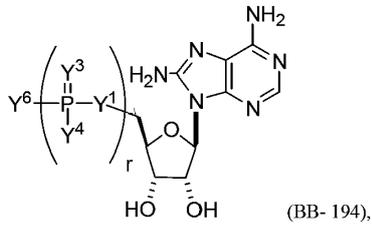


10

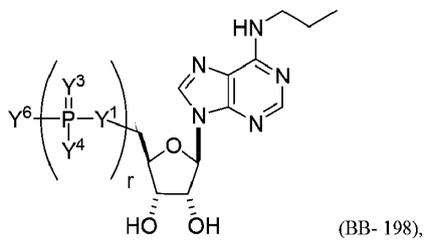


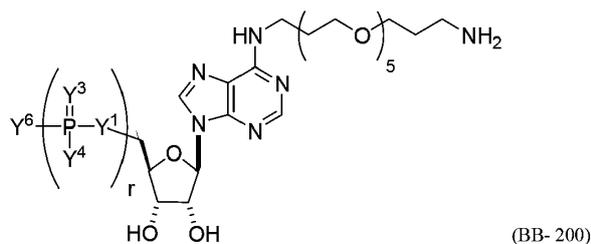
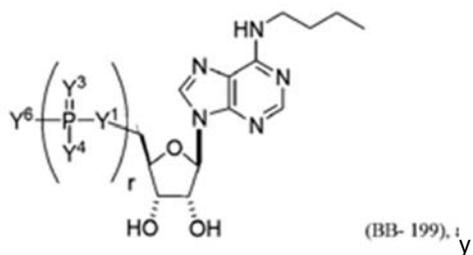


5



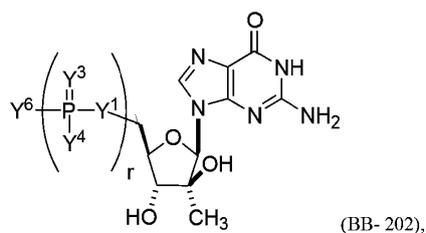
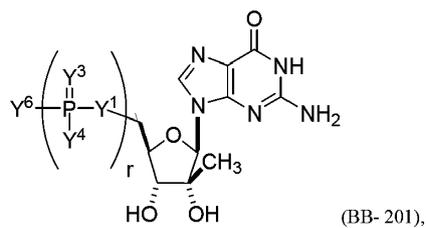
10



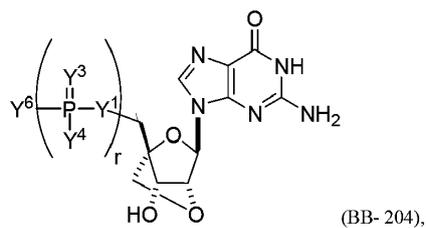
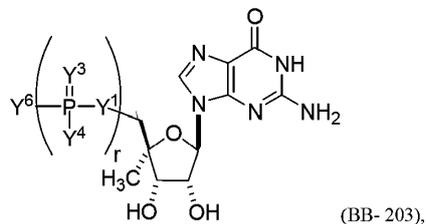


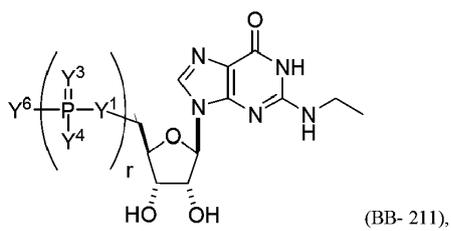
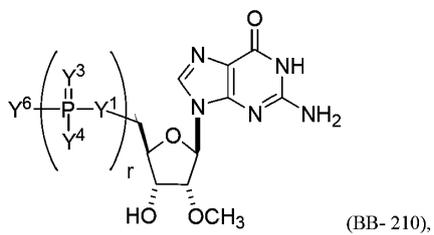
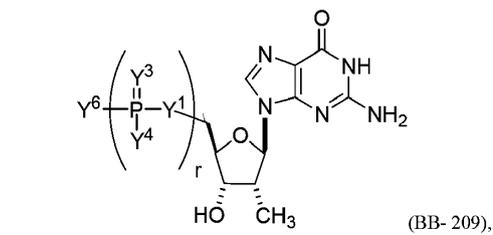
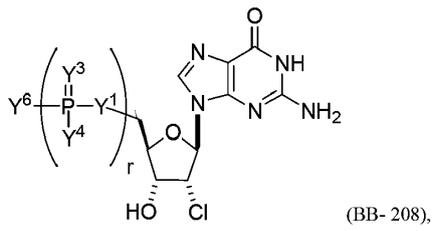
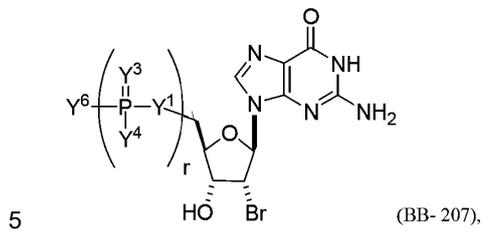
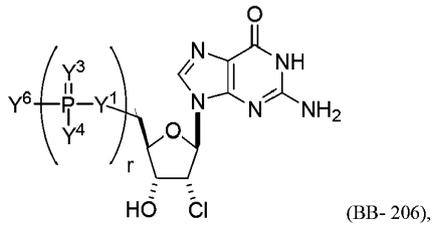
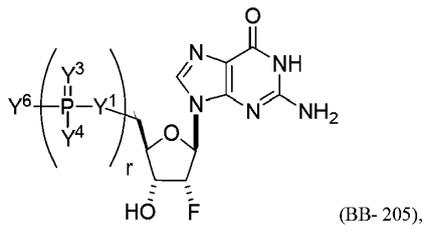
5 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶ y r son como se describe en esta invención (por ejemplo, cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5, tal como de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5)).

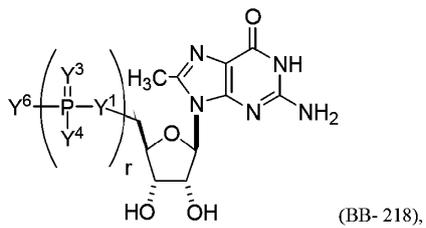
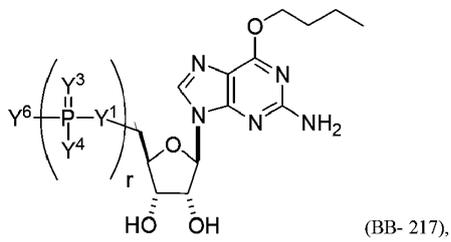
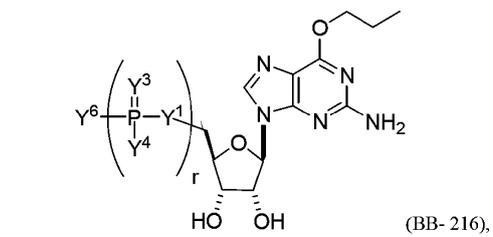
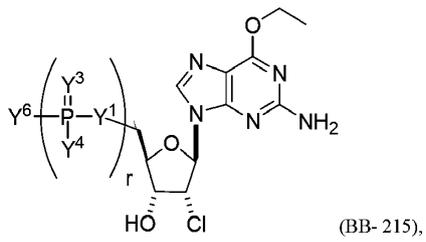
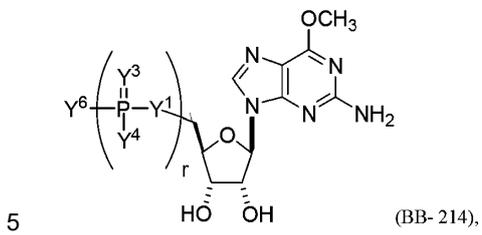
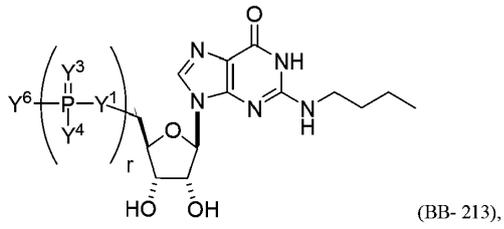
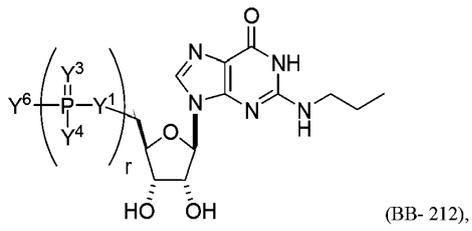
10 En algunos casos, la molécula de bloque de construcción, que puede incorporarse en un polinucleótido, es una guanosina modificada (por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste en:

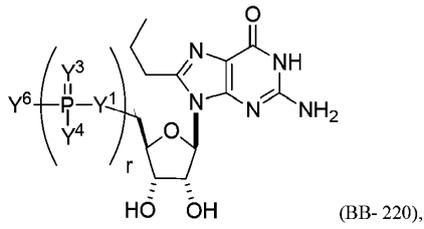
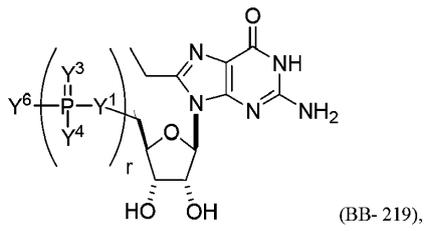


15

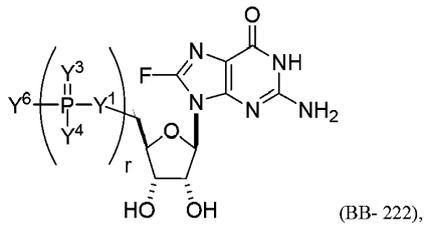
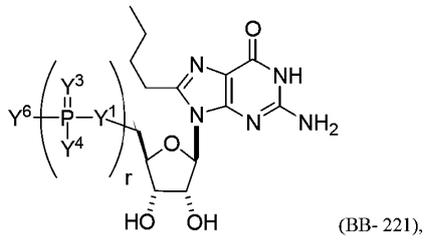




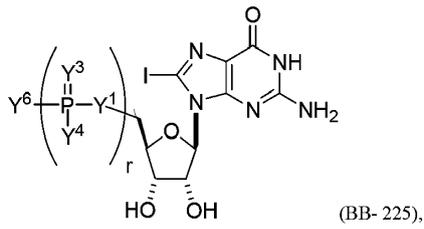
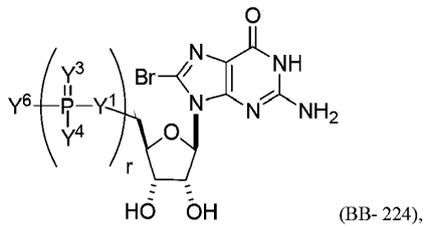
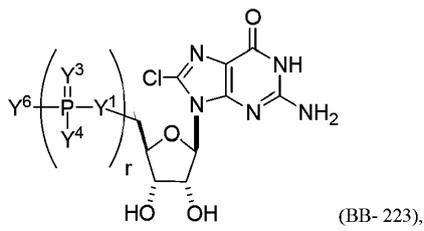


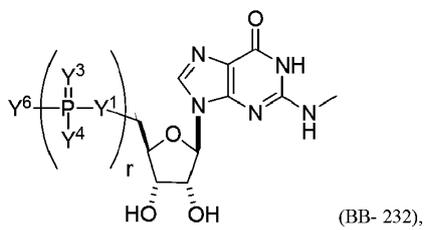
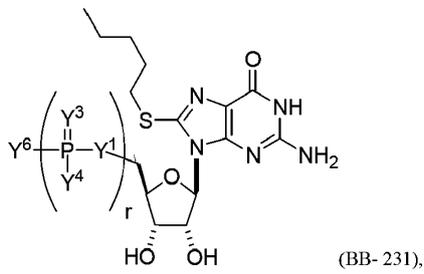
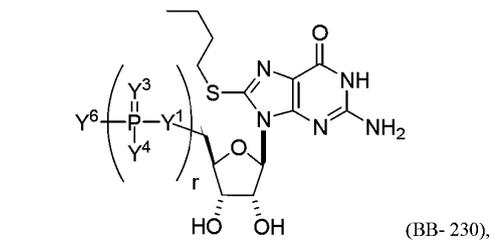
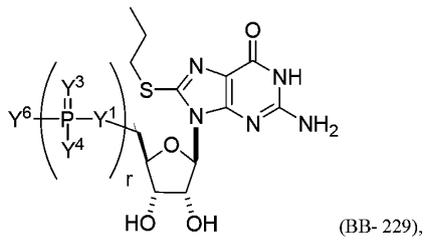
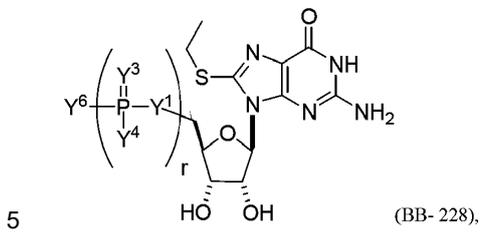
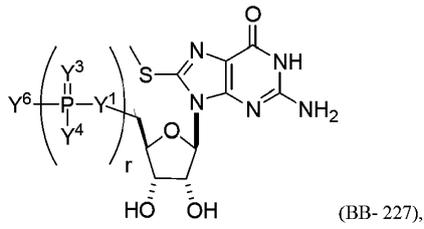
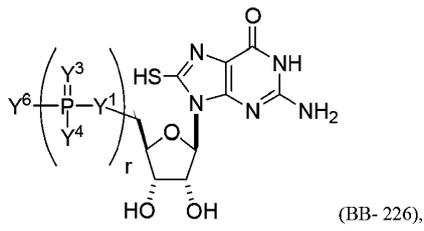


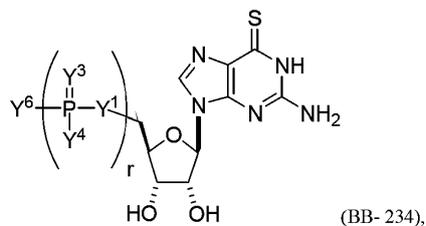
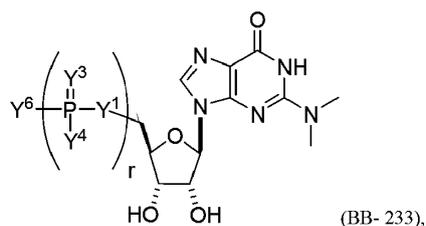
5



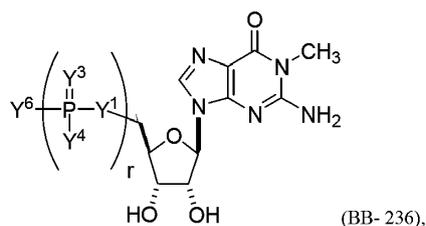
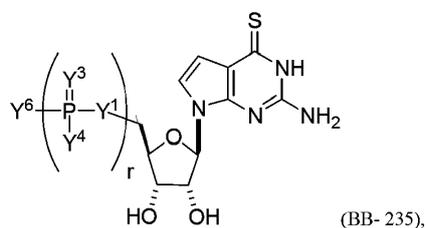
10





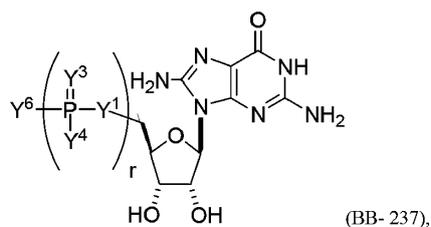


5



10

y

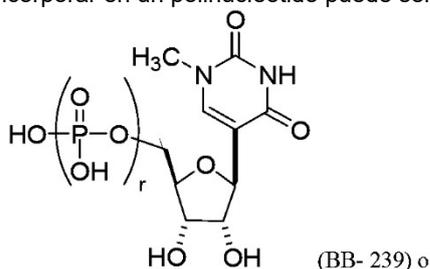
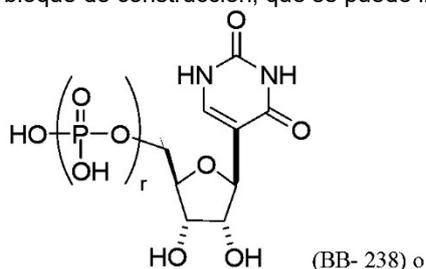


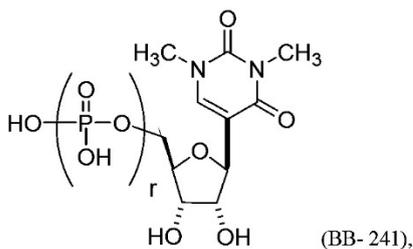
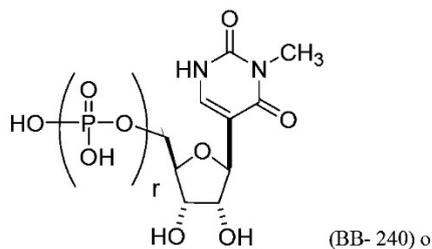
15

o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde Y¹, Y³, Y⁴, Y⁶ y r son como se describe en esta invención (por ejemplo, cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5, tal como de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5)).

20

En algunos casos, la modificación química de surco principal puede incluir el reemplazo del grupo C en C-5 del anillo (por ejemplo, para un nucleósido de pirimidina, tal como citosina o uracilo) con N (por ejemplo, el reemplazo del grupo >CH en C-5 con un grupo >NR^{N1}, donde R^{N1} es H o alquilo opcionalmente sustituido). Por ejemplo, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido puede ser:

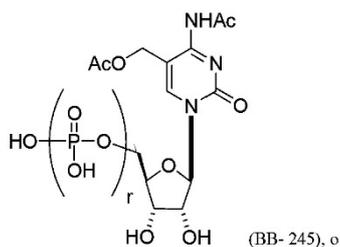
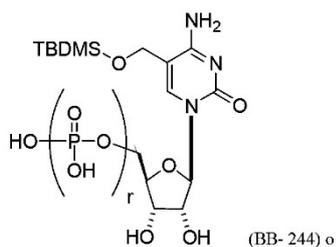
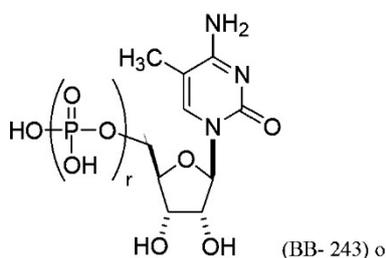
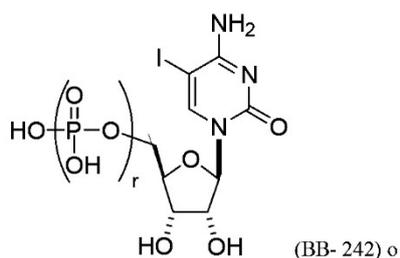




5 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

En otro caso, la modificación química de surco principal puede incluir el reemplazo del hidrógeno en C-5 de citosina con halo (p. ej., Br, Cl, F o I) o alquilo opcionalmente sustituido (p. ej., metilo). Por ejemplo, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido puede ser:

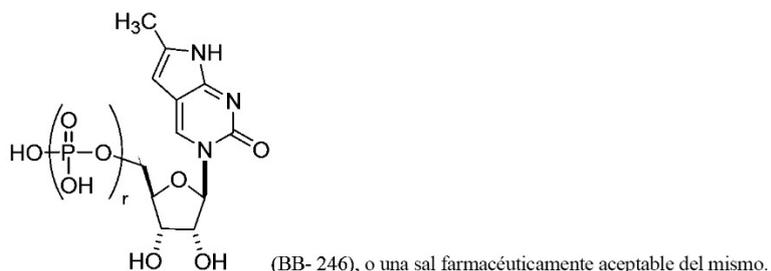
10



15 sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

En aun otro caso, la modificación química de surco principal puede incluir un anillo fusionado que está formado por el NH₂ en la posición C-4 y el átomo de carbono en la posición C-5. Por ejemplo, la molécula de bloque de construcción, que se puede incorporar en un polinucleótido puede ser:

20



de este, donde cada r es, independientemente, un número entero de 0 a 5 (por ejemplo, de 0 a 3, de 1 a 3 o de 1 a 5).

25

Modificaciones relativas al azúcar

Los nucleósidos y nucleótidos modificados (por ejemplo, moléculas de bloque de construcción), que se pueden incorporar en un polinucleótido (por ejemplo, ARN o ARNm, tal como se describe en esta invención), se pueden modificar en el azúcar del ácido ribonucleico. Por ejemplo, el grupo hidroxilo 2' (OH) se puede modificar o reemplazar con una cantidad de sustituyentes diferentes. Los ejemplos de sustituciones en la posición 2' incluyen, de modo no taxativo, H, halo, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido; ariloxi C₆₋₁₀ opcionalmente

30

sustituido; cicloalquilo C₃₋₈ opcionalmente sustituido; cicloalcoxi C₃₋₈ opcionalmente sustituido; ariloxi C₆₋₁₀ opcionalmente sustituido; arilalcoxi C₆₋₁₀-C₁₋₆ opcionalmente sustituido, (heterocicli)oxi C₁₋₁₂ opcionalmente sustituido; un azúcar (por ejemplo, ribosa, pentosa o cualquiera descrito en esta invención); un polietilenglicol (PEG), -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR, donde R es H o alquilo opcionalmente sustituido, y n es un número entero de 0 a 20 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 8, de 0 a 10, de 0 a 16, de 1 a 4, de 1 a 8, de 1 a 10, de 1 a 16, de 1 a 20, de 2 a 4, de 2 a 8, de 2 a 10, de 2 a 16, de 2 a 20, de 4 a 8, de 4 a 10, de 4 a 16 y de 4 a 20); ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) en los que el 2'-hidroxilo está conectado por un puente alquileo C₁₋₆ o heteroalquileo C₁₋₆ al carbono 4' del mismo azúcar de ribosa, donde los ejemplos de puentes incluyen metileno, propileno, éter o puentes amino; aminoalquilo, como se define en esta invención; aminoalcoxi, como se define en esta invención; amino como se define en esta invención; y aminoácido, como se define en esta invención

Generalmente, el ARN incluye la ribosa del grupo de azúcar, que es un anillo de 5 miembros que tiene un oxígeno. Los ejemplos de nucleótidos modificados no taxativos incluyen remplazo del oxígeno en ribosa (por ejemplo, con S, Se u alquileo, tal como metileno u etileno); adición de un enlace doble (por ejemplo, para remplazar ribosa con ciclopentenilo o ciclohexenilo); contracción anular de ribosa (por ejemplo, para formar un anillo de 4 miembros de ciclobutano u oxetano); expansión anular de ribosa (por ejemplo, para formar un anillo de 6 o 7 miembros que tiene un carbono o heteroátomo adicional, tal como para anhidrohexitol, altritol, manitol, ciclohexanilo, ciclohexenilo y morfolino que también tiene una estructura principal de fosforamidata); formas multicíclicas (por ejemplo, triciclo; y formas "desbloqueadas", tal como ácido nucleico de glicol (GNA) (por ejemplo, R-GNA o S-GNA, donde la ribosa se reemplaza por unidades de glicol unidas a enlaces fosfodiéster), ácido nucleico (TNA, donde la ribosa se reemplaza con α-L-treofuranosil-(3'→2')), y ácido nucléico peptídico, (PNA, donde los enlaces 2-amino-etil-glicina reemplazan la ribosa y la estructura principal de fosfodiéster). El grupo azúcar puede contener también uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica opuesta a la del carbono correspondiente en ribosa. Por lo tanto, una molécula de polinucleótido puede incluir nucleótidos que contienen, por ejemplo, arabinosa, como el azúcar.

Modificaciones a la Nucleobase

La presente descripción proporciona nucleósidos y nucleótidos modificados. 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 esta (también denominada en esta invención "nucleobase"). Tal como se describe en esta invención, "nucleótido" se define como un nucleósido que incluye un grupo fosfato. En algunos casos, los nucleósidos y nucleótidos descritos en esta invención generalmente se modifican químicamente en la cara del surco principal. Los ejemplos de modificaciones no taxativas incluyen un grupo amino, un grupo tiol, un grupo alquilo, un grupo halo o cualquiera descrito en esta invención. Los nucleótidos modificados se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento útil, como se describe en esta invención (por ejemplo, química, enzimática o recombinantemente para incluir uno o más nucleósidos modificados o no naturales).

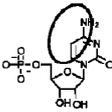
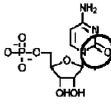
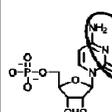
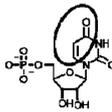
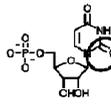
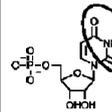
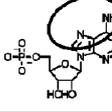
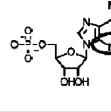
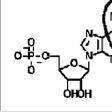
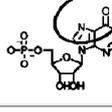
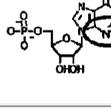
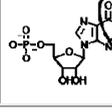
El emparejamiento de bases de nucleótidos modificados comprende no solo los pares de bases de adenosina-timina, adenosina-uracilo o guanosina-citosina estándar, sino también pares de bases formados entre nucleótidos y/o nucleótidos modificados que comprenden bases no estándar o modificadas, donde la disposición de donantes de enlace de hidrógeno y aceptores de enlace de hidrógeno permite la unión de hidrógeno entre una base no estándar y una base estándar o entre dos estructuras de base no estándar complementarias. Un ejemplo de tal emparejamiento de bases no estándar es el emparejamiento de bases entre la inosina de nucleótido modificado y adenina, citosina o uracilo.

Los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir una nucleobase modificada. Los ejemplos de nucleobases que se encuentran en el ARN incluyen, pero no se limitan a, adenina, guanina, citosina y uracilo. Los ejemplos de nucleobases que se encuentran en el ADN incluyen, pero no se limitan a, adenina, guanina, citosina y timina. Estas nucleobases se pueden modificar o reemplazar completamente para proporcionar moléculas de polinucleótidos que tienen propiedades mejoradas, por ejemplo, resistencia a las nucleasas, estabilidad, y estas propiedades se pueden manifestar a través de la interrupción de la unión de un compañero de unión de surco principal. Por ejemplo, los nucleósidos y nucleótidos descritos pueden modificarse químicamente en la cara del surco principal. En algunos casos, las modificaciones químicas de surco principales pueden incluir un grupo amino, un grupo tiol, un grupo alquilo o un grupo halo.

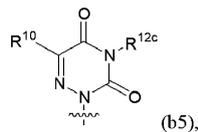
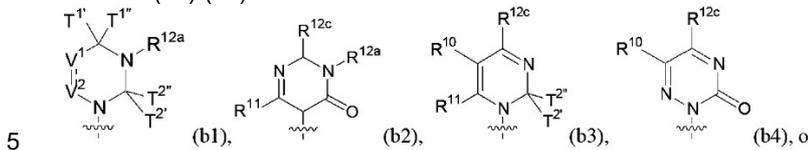
La Tabla 1 a continuación identifica las caras químicas de cada nucleótido canónico. Los círculos identifican los átomos que comprenden las regiones químicas respectivas.

Tabla 1

	Cara de surco principal	Cara de surco secundaria	Cara de emparejamiento de la base de Watson-Crick
Pirimidinas	Citidina:		

		Cara de surco principal	Cara de surco secundaria	Cara de emparejamiento de la base de Watson-Crick
				
	Uridina:			
Purinas	Adenosina:			
	Guanosina:			

En algunos casos, B es un uracilo modificado. Los uracilos modificados de ejemplo incluyen aquellos que tienen la Fórmula (b1)-(b5):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde



es un enlace simple o doble;

15 cada uno de T^{1'}, T^{1''}, T^{2'} y T^{2''} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido, o la combinación de T^{1'} y T^{1''} o la combinación de T^{2'} y T^{2''} se unen (por ejemplo, como en T^{2'}) para formar O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

20 cada uno de V¹ y V² es, independientemente, O, S, N(R^{Vb})_{nv}, o C(R^{Vb})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Vb} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoilo opcionalmente sustituido, alquinoilo opcionalmente sustituido, hidroalquilo opcionalmente sustituido, hidroalquenoilo opcionalmente sustituido, hidroalquinoilo opcionalmente sustituido, aminoalquinoilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo), aminoalquenoilo opcionalmente sustituido, aminoalquinoilo

25 opcionalmente sustituido, acilaminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo N-protector, tal como se describe en esta invención, trifluoroacetilo), alcóxicarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcóxicarbonilalquinoilo opcionalmente sustituido o alcóxicarbonilalcoxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituidos con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como los seleccionados en (1)-(21) para alquilo);

30

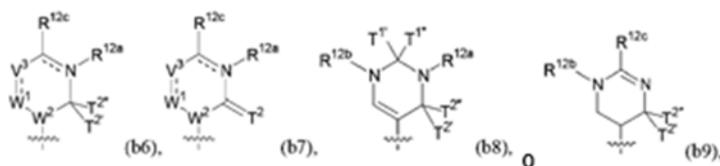
R^{1°} es H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, hidroxilo, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialqueno opcionalmente sustituido, hidroxialquino opcionalmente sustituido, aminoalqueno
 5 opcionalmente sustituido, aminoalquino opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalqueno opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquino opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido;

10 R¹¹ es H o alquilo opcionalmente sustituido;

R^{12a} es H, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialqueno opcionalmente sustituido, hidroxialquino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalqueno
 15 opcionalmente sustituido o aminoalquino opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido; y

R^{12c} es H, halo, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialqueno opcionalmente sustituido,
 20 hidroxialquino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalqueno opcionalmente sustituido o aminoalquino opcionalmente sustituido.

Otros uracilos modificados de ejemplo incluyen aquellos que tienen la Fórmula (b6)-(b9):



25 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

≡

30 es un enlace simple o doble;

cada uno de T¹, T^{1'}, T² y T^{2'} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido, o la combinación de T¹ y T^{1'} se unen (por ejemplo, como en T¹) o la
 35 combinación de T² y T^{2'} se unen (por ejemplo, como en T²) para formar O (oxo), S (tio) o Se (seleno), o cada T¹ y T² es, independientemente, O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

cada uno de W¹ y W² es, independientemente, N(R^{Wa})_{nw} o C(R^{Wa})_{nw}, donde nw es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Wa} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido;

40 cada V³ es, independientemente, O, S, N(R^{Va})_{nv} o C(R^{Va})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Va} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo
 45 opcionalmente sustituido, hidroxialqueno opcionalmente sustituido, hidroxialquino opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, alheterociclilo
 50 opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido o alquinoiloxi opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo, o sulfoalquilo), aminoalqueno
 55 opcionalmente sustituido, aminoalquino opcionalmente sustituido, acilaminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo), alcoxycarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalqueno opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquino
 60 opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con hidroxilo y/o un grupo protector O), carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo
 opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como aquellos seleccionados de (1)-(21) para alquilo), y donde R^{Va} y R^{12c} tomados junto con los átomos de carbono a los que están unidos pueden formar cicloalquilo
 opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, un anillo de 5 o 6 miembros);

R^{12a} es H, alquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialqueno opcionalmente sustituido, hidroxialquino opcionalmente sustituido, aminoalquilo
 60 opcionalmente sustituido, aminoalqueno opcionalmente sustituido, aminoalquino opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido (por

ejemplo, opcionalmente sustituido con hidroxilo y/o un grupo protector O), carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido, carbamoilalquilo opcionalmente sustituido o ausente;

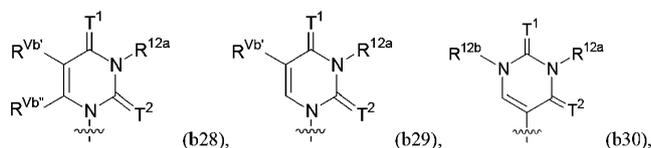
5 R^{12b} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, alcarilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, alqheterociclilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilacilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquenilo

10 opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con hidroxycarbonilo y/o un grupo O-protector), carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido,

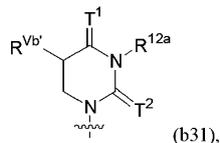
15 donde la combinación de R^{12b} y T^1 o la combinación de R^{12b} y R^{12c} pueden unirse para formar heterociclilo opcionalmente sustituido; y

20 R^{12c} es H, halo, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido.

Los uracilos modificados de ejemplo adicionales incluyen aquellos que tienen la Fórmula (b28)-(b31):



o



25 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

30 cada uno de T^1 y T^2 es, independientemente, O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

35 cada $R^{Vb'}$ y $R^{Vb''}$ es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo N-protector, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo), aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, acilaminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo N-protector, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo), alcoxycarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con hidroxilo y/o un grupo O-protector), carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, como los seleccionados de (1)-(21) para alquilo) (por ejemplo, $R^{Vb'}$ es alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, o aminoalquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera de los descritos en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo);

50 R^{12a} es H, alquilo opcionalmente sustituido, carboxiaminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo), aminoalquenilo opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido; y

55 R^{12b} es H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialquenilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo), alcoxycarbonilalcoxi

opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquenilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxicarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido.

5 En casos particulares, T¹ es O (oxo), y T² es S (tio) o Se (seleno). En otras realizaciones, T¹ es S (tio), y T² es O (oxo) o Se (seleno). En algunos casos, R^{Vb'} es H, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido.

10 En otros casos, cada R^{12a} y R^{12b} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido o hidroxialquilo opcionalmente sustituido. En casos particulares, R^{12a} es H. En otros casos, tanto R^{12a} como R^{12b} son H.

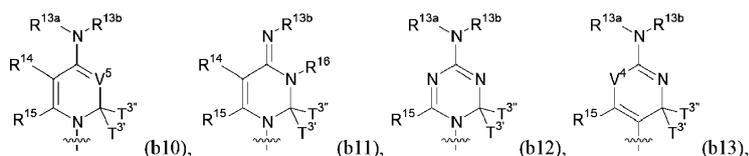
15 En algunos casos, cada R^{Vb'} de R^{12b} es, independientemente, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo o sulfoalquilo), aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido o acilaminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector N, tal como cualquiera descrito en esta invención, por ejemplo, trifluoroacetilo). En algunos casos, el amino y/o alquilo del aminoalquilo opcionalmente sustituido se sustituye con uno o más de alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, sulfoalquilo opcionalmente sustituido, carboxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de O), hidroxil opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de O), carboxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de O), alcoxicarbonilalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector de O) o grupo protector de N. En algunos casos, el aminoalquilo opcionalmente sustituido se sustituye con un sulfoalquilo opcionalmente sustituido o un alquenilo opcionalmente sustituido. En casos particulares, R^{12a} y R^{Vb'} son ambos H. En casos particulares, T¹ es O (oxo), y T² es S (tio) o Se (seleno).

En algunos casos, R^{Vb'} es alcoxicarbonilalquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido.

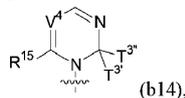
casos

30 En casos particulares, el sustituyente opcional para R^{12a}, R^{12b}, R^{12c} o R^{Va} es un grupo polietilenglicol (por ejemplo, - (CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀); o un grupo amino-polietilenglicol (por ejemplo, - NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido).

40 En algunos casos, B es una citosina modificada. Los ejemplos de citosinas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b10)-(b14):



O



45 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

50 cada uno de T^{3'} y T^{3''} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido, o la combinación de T^{3'} y T^{3''} se unen (por ejemplo, como en T³) para formar O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

55 cada V⁴ es, independientemente, O, S, N(R^{Vc})_{nv} o C(R^{Vc})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Vc} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, alheterociclilo opcionalmente sustituido o alquinilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como aquellos seleccionados de (1)-(21) para alquilo), donde la combinación de R^{13b} y R^{Vc} se puede tomar juntos para formar heterociclilo opcionalmente sustituido;

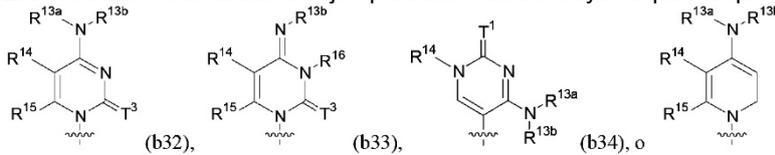
cada V^5 es, independientemente, $N(R^{Vd})_{nv}$ o $C(R^{Vd})_{nv}$, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Vd} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, alheterociclilo opcionalmente sustituido o alquinoilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como aquellos seleccionados de (1)-(21) para alquilo) (por ejemplo, V^5 es $-CH$ o N);

cada uno de R^{13a} y R^{13b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, donde la combinación de R^{13b} y R^{14} se puede tomar juntos para formar heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada R^{14} es, independientemente, H, halo, hidroxil, tiol, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, alquenoilo opcionalmente sustituido, alquinoilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector O), hidroxialquenoilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinoilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloilo opcionalmente sustituido, alquinoiloilo opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-NHR$, donde R es H, alquilo, arilo o fosforilo), azido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, alheterociclilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenoilo opcionalmente sustituido o aminoalquinoilo opcionalmente sustituido; y

cada uno de R^{15} y R^{16} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenoilo opcionalmente sustituido o alquinoilo opcionalmente sustituido.

Las citosinas modificadas de ejemplo adicionales incluyen aquellas que tienen la Fórmula (b32)-(b35):



(b35), o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

cada uno de T^1 y T^3 es, independientemente, O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

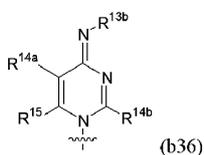
cada uno de R^{13a} y R^{13b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, donde la combinación de R^{13b} y R^{14} se puede tomar juntos para formar heterociclilo opcionalmente sustituido;

cada R^{14} es, independientemente, H, halo, hidroxil, tiol, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, alquenoilo opcionalmente sustituido, alquinoilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector O), hidroxialquenoilo opcionalmente sustituido, hidroxialquinoilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloilo opcionalmente sustituido, alquinoiloilo opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, $-NHR$, donde R es H, alquilo, arilo o fosforilo), azido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, alheterociclilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, hidroxialquilo, alquilo, alquenoilo o alquinoilo), aminoalquenoilo opcionalmente sustituido, o aminoalquinoilo opcionalmente sustituido; y

cada uno de R^{15} y R^{16} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenoilo opcionalmente sustituido o alquinoilo opcionalmente sustituido (p. ej., R^{15} es H y R^{16} es H o alquilo opcionalmente sustituido).

En algunos casos, R^{15} es H y R^{16} es H o alquilo opcionalmente sustituido. En casos particulares, R es H, acilo o hidroxialquilo. En algunos casos, R es halo. En algunos casos, tanto R^{14} como R^{15} son H. En algunos casos, tanto R^{15} como R^{16} son H. En algunos casos, cada uno de R^{14} y R^{15} y R^{16} es H. En casos adicionales, cada uno de R^{13a} y R^{13b} es independientemente, H o alquilo opcionalmente sustituido.

Otros ejemplos no taxativos de citosinas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b36):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

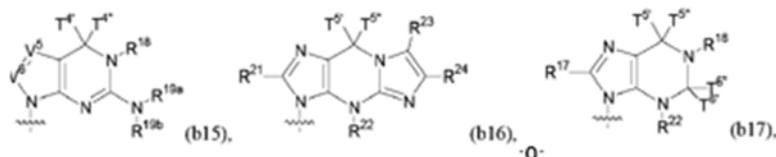
5 cada R^{13b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, donde la combinación de R^{13b} y R^{14b} puede tomarse en conjunto para formar heterociclilo opcionalmente sustituido;

10 cada R^{14a} y R^{14b} es, independientemente, H, halo, hidroxil, tiol, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, haloalquilo opcionalmente sustituido, alquenoil opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, sustituido con un grupo protector O), hidroxialquenoil opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoxil opcionalmente sustituido, aminoalcoxi opcionalmente sustituido, alcoxialcoxi opcionalmente sustituido, aciloxialquilo opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido (por ejemplo, -NHR, donde R es H, alquilo, arilo, fosforilo, aminoalquilo opcionalmente sustituido o carboxiaminoalquilo
15 opcionalmente sustituido), azido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, alheterociclilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenoil opcionalmente sustituido o aminoalquinilo opcionalmente sustituido; y

20 cada uno de R¹⁵ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alquenoil opcionalmente sustituido o alquinilo opcionalmente sustituido.

En casos particulares, R^{14b} es un aminoácido opcionalmente sustituido (p. ej., lisina opcionalmente sustituida). En algunos casos, R es H.

25 En algunos casos, B es una guanina modificada. Los ejemplos de guaninas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b15)-(b17):



30 o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

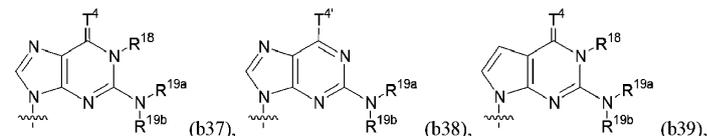
35 Cada uno de T^{4'}, T^{4''}, T^{5'}, T^{5''}, T^{6'} y T^{6''} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, y donde la combinación de T^{4'} y T^{4''} (por ejemplo, como en T^{4'}) o la combinación de T^{5'} y T^{5''} (por ejemplo, como en T^{5'}) o la combinación de T^{6'} y T^{6''} se unen (por ejemplo, como en T^{6'}) forman O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

40 cada uno de V⁵ y V⁶ es, independientemente, O, S, N(R^{Vd})_{nv} o C(R^{Vd})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Vd} es, independientemente, H, halo, tiol, aminoácido opcionalmente sustituido, ciano, amidina, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenoil opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, alquilo
45 opcionalmente sustituido, alquenoil opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido, alquinoxil opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como los seleccionados de (1)-(21) para alquilo), tialcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido; y

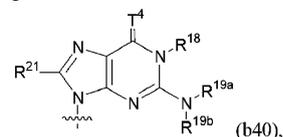
45 cada uno de R¹⁷, R¹⁸, R^{19a}, R^{19b}, R²¹, R²², R²³ y R²⁴ es, independientemente, H, halo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alquenoil opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, tialcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido o aminoácido opcionalmente sustituido.

Los ejemplos de guanosinas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b37)-(b40):

50



O



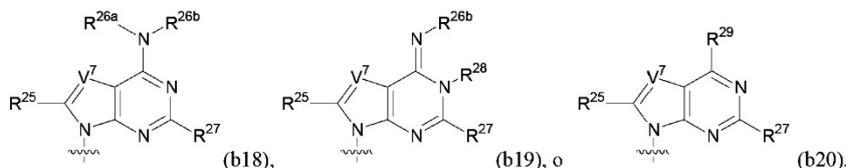
o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

5 cada uno de T⁴ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido o alcoxi opcionalmente sustituido, y cada T⁴ es, independientemente, O (oxo), S (tio) o Se (seleno);

cada uno de R¹⁸, R^{19a}, R^{19b} y R²¹ es, independientemente, H, halo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido, amino opcionalmente sustituido o aminoácido opcionalmente sustituido.

10 En algunos casos, R¹⁸ es H o alquilo opcionalmente sustituido. En casos adicionales, T⁴ es oxo. En algunos casos, cada uno de R^{19a} y R^{19b} es, independientemente, H o alquilo opcionalmente sustituido.

15 En algunos casos, B es una adenina modificada. Los ejemplos de adeninas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b18)-(b20):



o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

20 cada V⁷ es, independientemente, O, S, N(R^{Ve})_{nv} o C(R^{Ve})_{nv}, donde nv es un número entero de 0 a 2 y cada R^{Ve} es, independientemente, H, halo, aminoácido opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alquenoiloxi opcionalmente sustituido o alquinoiloxi opcionalmente sustituido (por ejemplo, opcionalmente sustituido con cualquier sustituyente descrito en esta invención, tal como aquellos seleccionados de (1)-(21) para alquilo);

25 cada R²⁵ es, independientemente, H, halo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

30 cada uno de R^{26a} y R^{26b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, carbamoilalquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialqueno opcionalmente sustituido, hidroxialquino opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o grupo polietilenglicol (por ejemplo, -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4),

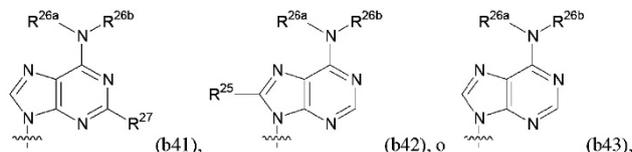
35 cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀); o un grupo amino-polietilenglicol (por ejemplo, -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido);

40 cada R²⁷ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

45 cada R²⁸ es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido o alquino opcionalmente sustituido; y

50 cada R²⁹ es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, carbamoilalquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialqueno opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido.

Los ejemplos de adeninas modificadas incluyen compuestos de la Fórmula (b41)-(b43):



55

o una sal farmacéuticamente aceptable o estereoisómero del mismo, donde

cada R^{25} es, independientemente, H, halo, tiol, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido;

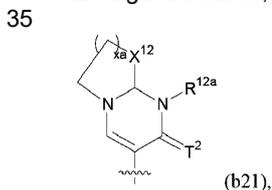
5 cada uno de R^{26a} y R^{26b} es, independientemente, H, acilo opcionalmente sustituido, aminoácido opcionalmente sustituido, carbamoilalquilo opcionalmente sustituido, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, hidroxialquilo opcionalmente sustituido, hidroxialqueno opcionalmente sustituido, hidroxialquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o grupo polietilenglicol (por ejemplo, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, donde $s1$ es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de $s2$ y $s3$, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C_{1-20}); o un grupo amino-polietilenglicol (por ejemplo, $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, donde $s1$ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de $s2$ y $s3$, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido); y

cada R^{27} es, independientemente, H, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, tioalcoxi opcionalmente sustituido o amino opcionalmente sustituido.

20 En algunos casos, R^{26a} es H y R^{26b} es alquilo opcionalmente sustituido. En algunos casos, cada uno de R^{26a} y R^{26b} es, independientemente, alquilo opcionalmente sustituido. En casos particulares, R^{27} es alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido. En otros casos, R^{25} es alquilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido o tioalcoxi opcionalmente sustituido.

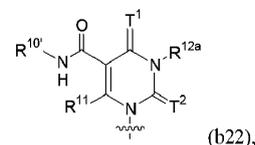
25 En casos particulares, el sustituyente opcional para R^{26a} , R^{26b} o R^{29} es un grupo polietilenglicol (por ejemplo, $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$, donde $s1$ es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de $s2$ y $s3$, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C_{1-20}); o un grupo amino-polietilenglicol (por ejemplo, $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$, donde $s1$ es un número entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de $s2$ y $s3$, independientemente, es un número entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido).

En algunos casos, B puede tener la Fórmula (b21):



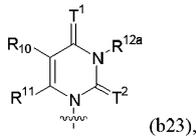
donde X^{12} es, independientemente, O, S, alqueno opcionalmente sustituido (por ejemplo, metileno) o heteroalqueno opcionalmente sustituido, xa es un número entero de 0 a 3 y R^{12a} y T^2 son como se describe en esta invención.

40 En algunos casos, B puede tener la Fórmula (b22):



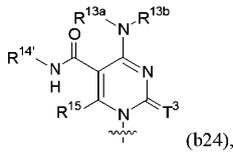
45 donde R^{10} es, independientemente, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalqueno opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalqueno opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido, y R^{11} , R^{12a} , T^1 y T^2 se describen en esta invención.

En algunos casos, B puede tener la Fórmula (b23):



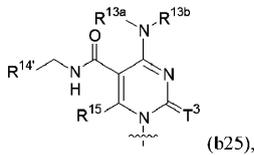
donde R¹⁰ es heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, furilo opcionalmente sustituido, tienilo opcionalmente sustituido o pirrolilo opcionalmente sustituido), arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido o naftilo opcionalmente sustituido) o cualquier sustituyente descrito en esta invención (por ejemplo, para R¹⁰); y donde R¹¹ (por ejemplo, H o cualquier sustituyente descrito en esta invención), R^{12a} (por ejemplo, H o cualquier sustituyente descrito en esta invención), T¹ (por ejemplo, oxo o cualquier sustituyente descrito en esta invención) y T² (por ejemplo, oxo o cualquier sustituyente descrito en esta invención) son como se describe en esta invención.

10 En algunos casos, B puede tener la Fórmula (b24):



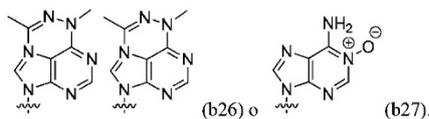
donde R^{14'} es, independientemente, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, alcarilo opcionalmente sustituido, alqheterociclilo opcionalmente sustituido, aminoalquilo opcionalmente sustituido, aminoalquenilo opcionalmente sustituido, aminoalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxi opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquenilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalquinilo opcionalmente sustituido, alcoxycarbonilalcoxi opcionalmente sustituido, carboxialcoxi opcionalmente sustituido, carboxialquilo opcionalmente sustituido o carbamoilalquilo opcionalmente sustituido, y R^{13a}, R^{13b}, R¹⁵ y T³ como se describe en esta invención.

En algunos casos, B puede tener la Fórmula (b25):



donde R^{14'} es heterociclilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, furilo opcionalmente sustituido, tienilo opcionalmente sustituido o pirrolilo opcionalmente sustituido), arilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, fenilo opcionalmente sustituido o naftilo opcionalmente sustituido) o cualquier sustituyente descrito en esta invención (por ejemplo, para R^{14'}); y donde R^{13a} (por ejemplo, H o cualquier sustituyente descrito en esta invención), R^{13b} (por ejemplo, H o cualquier sustituyente descrito en esta invención), R¹⁵ (por ejemplo, H o cualquier sustituyente descrito en esta invención) y T³ (por ejemplo, oxo o cualquier sustituyente descrito en esta invención) son como se describe en esta invención.

35 En algunos casos, B es una nucleobase que se selecciona del grupo que consiste en citosina, guanina, adenina y uracilo. En algunos casos, B puede ser:



40 En algunos casos, la nucleobase modificada es un uracilo modificado. Los ejemplos de nucleobases y nucleósidos que tienen un uracilo modificado incluyen ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 6-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tio-uridina (s²U), 4-tio-uridina (s⁴U), 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxi-uridina (ho⁵U), 5-aminoalil-uridina, 5-halo-uridina (por ejemplo, éster 5-yodo-uridina o 5-bromo-uridina), 3-metil-uridina (m³U), 5-metoxi-uridina (mo⁵U), ácido uridina 5-oxiacético (cmo⁵U), ácido uridina 5-oxiacético éster de metilo (mcmo⁵U), 5-carboximetiluridina (cm⁵U), 1-carboximetil-pseudouridina, 5-carboximetiluridina (chm⁵U), 5-carboxihidroximetil-éster de metil uridina (mchm⁵U), 5-metoxycarbonilmetil-uridina (mcm⁵U), 5-metoxycarbonilmetil-2-tio-uridina (mcm⁵s²U), 5-aminometil-2-tio-uridina (nm⁵s²U), 5-metilaminometil-uridina (mnm⁵U), 5-metilaminometil-2-tio-uridina (mnm⁵s²U), 5-metilaminometil-2-seleno-uridina (mnm⁵se²U), 5-carbamoilmetil-uridina (ncm⁵U), 5-carboximetilaminometil-uridina (cmnm⁵U), 5-carboximetilaminometil-2-tio-uridina (cmnm⁵s²U), 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometil-uridina (tm⁵U), 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina (tm⁵s²U), 1-taurinometil-4-tio-

pseudouridina, 5-metil-uridina (m⁵U, i.e., que tiene la desoxitimina de nucleobase), 1-metil-pseudouridina (m¹ψ), 5-metil-2-tio-uridina (m⁵s²U), 1-metil-4-tio-pseudouridina (m¹s⁴ψ), 4-tio-1-metil-pseudouridina, 3-metil-pseudouridina (m³ψ), 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 (m⁵D), 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 (acp³U), 1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouridina (acp³ψ), 5-(isopentenilaminometil)uridina (inm⁵U), 5-(isopentenilaminometil)-2-tio-uridina (inm⁵s²U), α-tio-uridina, 2'-O-metil-uridina (Um), 5,2'-O-dimetil-uridina (m⁵Um), 2'-O-metil-pseudouridina (ψm), 2-tio-2'-O-metil-uridina (s²Um), 5-metoxycarbonilmetil-2'-O-metil-uridina (mcm⁵Um), 5-carbamoilmetil-2'-O-metil-uridina (ncm⁵Um), 5-carboximetilaminometil-2'-O-metil-uridina (cmnm⁵Um), 3,2'-O-dimetil-uridina (m³Um), y 5-(isopentenilaminometil)-2'-O-metil-uridina (inm⁵Um), 1-tio-uridina, desoxitimidina, 2'-F-ara-uridina, 2'-F-uridina, 2'-OH-ara-uridina, 5-(2-carbometoxivinil) uridina, y 5-[3-(1-E-propenilamino)uridina.

En algunos casos, la nucleobase modificada es una citosina modificada. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una citosina modificada incluyen 5-aza-citidina, 6-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina (m³C), N4-acetil-citidina (ac⁴C), 5-formil-citidina (f⁵C), N4-metil-citidina (m⁴C), 5-halo-citidina (por ejemplo, 5-yodo-citidina), 5-hidroximetil-citidina (hm⁵C), 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina (s²C), 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-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 (k₂C), α-tio-citidina, 2'-O-metil-citidina (Cm), 5,2'-O-dimetil-citidina (m⁵Cm), N4-acetil-2'-O-metil-citidina (ac⁴Cm), N4,2'-O-dimetil-citidina (m⁴Cm), 5-formil-2'-O-metil-citidina (f⁵Cm), N4,N4,2'-O-trimetil-citidina (m⁴₂Cm), 1-tio-citidina, 2'-F-ara-citidina, 2'-F-citidina, y 2'-OH-ara-citidina.

En algunos casos, la nucleobase modificada es una adenina modificada. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares 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-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 (m¹A), 2-metil-adenina (m²A), N6-metil-adenosina (m⁶A), 2-metil-N6-metil-adenosina (ms²m⁶A), N6-isopentenil-adenosina (i⁶A), 2-metil-N6-isopentenil-adenosina (ms²i⁶A), N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina (io⁶A), 2-metil-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adenosina (ms²io⁶A), N6-glicinilcarbamoil-adenosina (g⁶A), N6-treonilcarbamoil-adenosina (t⁶A), N6-metil-N6-treonilcarbamoil-adenosina (m⁶t⁶A), 2-metil-N6-treonilcarbamoil-adenosina (ms²g⁶A), N6,N6-dimetil-adenosina (m⁶₂A), N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenosina (hn⁶A), 2-metil-N6-hidroxinorvalilcarbamoil-adenosina (ms²hn⁶A), N6-acetil-adenosina (ac⁶A), 7-metil-adenina, 2-metil-tio-adenina, 2-metoxi-adenina, α-tio-adenosina, 2'-O-metil-adenosina (Am), N6,2'-O-dimetil-adenosina (m⁶Am), N6,N6,2'-O-trimetil-adenosina (m⁶₂Am), 1,2'-O-dimetil-adenosina (m¹Am), 2'-O-ribosiladenosina (fosfato) (Ar(p)), 2-amino-N6-metil-purina, 1-tio-adenosina, 8-azido-adenosina, 2'-F-ara-adenosina, 2'-F-adenosina, 2'-OH-ara-adenosina, y N6-(19-amino-pentaoxanonadecil)-adenosina.

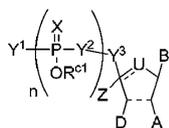
En algunos casos, la nucleobase modificada es una guanina modificada. Las nucleobases y nucleósidos ejemplares que tienen una guanina modificada incluyen inosina (I), 1-metil-inosina (m¹I), wiosina (imG), metilwiosina (mimG), 4-demetil-wiosina (imG-14), isowiosina (imG2), wibutosina (yW), peroxiwibutosina (o₂yW), hidroxiwibutosina (OHyW), hidroxiwibutosina submodificada (OHyW*), 7-deaza-guanosina, queuosina (Q), epoxiqueuosina (oQ), galactosil-queuosina (galQ), manosil-queuosina (manQ), 7-ciano-7-deaza-guanosina (preQ₀), 7-aminometil-7-deaza-guanosina (preQ₁), arqueosina (G*), 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina (m⁷G), 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metil-inosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metil-guanosina (m¹G), N2-metil-guanosina (m²G), N2,N2-dimetil-guanosina (m²₂G), N2,7-dimetil-guanosina (m²,7G), N2, N2,7-dimetil-guanosina (m²,2,7G), 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 (m²Gm), N2,N2-dimetil-2'-O-metil-guanosina (m²₂Gm), 1-metil-2'-O-metil-guanosina (m¹Gm), N2,7-dimetil-2'-O-metil-guanosina (m²,7Gm), 2'-O-metil-inosina (Im), 1,2'-O-dimetil-inosina (m¹Im), 2'-O-ribosilguanina (fosfato) (Gr(p)), 1-tio-guanosina, O6-metil-guanosina, 2'-F-ara-guanosina, y 2'-F-guanosina.

En algunos casos, el nucleótido se puede modificar en la cara del surco principal. Por ejemplo, tales modificaciones incluyen reemplazar hidrógeno en C-5 de uracilo o citosina con alquilo (por ejemplo, metilo) o halo.

La nucleobase del nucleótido se puede seleccionar independientemente de una purina, una pirimidina, un análogo de purina o pirimidina. Por ejemplo, la nucleobase se puede seleccionar independientemente de adenina, citosina, guanina, uracilo o hipoxantina. En otra realización, la nucleobase también puede incluir, por ejemplo, derivados sintéticos y de origen natural de una base, que incluyen pirazolo[3,4-d]pirimidinas, 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 4-tiouracilo, 8-halo (por ejemplo, 8-bromo), 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8 adeninas y guaninas sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otras 5 uracilo y citosinas sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, deazaguanina, 7-deazaguanina, 3-deazaguanina, deazaadenina, 7-deazaadenina, 3-deazaadenina, pirazolo[3,4-d]pirimidina, imidazo[1,5-a]1,3,5 triazinonas, 9-deazapurinas,

imidazo[4,5-d]pirazinas, tiazolo[4,5-d]pirimidinas, pirazin-2-onas, 1,2,4-triazina, piridazina; y 1,3,5 triazina. Cuando los nucleótidos se representan usando la abreviatura A, G, C, T o U, cada letra se refiere a la base representativa y/o derivados de esta, *por ejemplo*, A incluye adenina o análogos de adenina, *por ejemplo*, 7-deaza adenina).

5 En algunos casos, el nucleótido modificado es un compuesto de la Fórmula XI:



XI

donde:

10



denota un enlace simple o doble;

--- denota un enlace sencillo opcional;

15

U es O, S, -NR^a- o -CR^aR^b- cuando



20 denota un enlace sencillo, o U es -CR^a- cuando denota un enlace doble;

Z es H, alquilo C₁₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀, o Z está ausente cuando



25

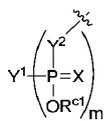
denota un enlace doble; y

Z puede ser -CR^aR^b- y formar un enlace con A;

30 A es H, OH, NHR donde R= alquilo o arilo o fosforilo, sulfato, -NH₂, N₃, azido, -SH, N un aminoácido o un péptido que comprende 1 a 12 aminoácidos;

D es H, OH, NHR, donde R= alquilo o arilo o fosforilo, -NH₂, -SH, un aminoácido, un péptido que comprende 1 a 12 aminoácidos o un grupo de la Fórmula XII:

35



XII

o A y D junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un anillo de 5 miembros;

40 X es O o S;

cada uno de Y¹ se selecciona independientemente de -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} y -SR^{a1};

45 cada uno de Y² e Y³ se selecciona independientemente de O, -CR^aR^b, NR^c, S o un enlazador que comprende uno o más átomos seleccionados del grupo que consiste en C, O, N y S;

n es 0, 1, 2, o 3;

m es 0, 1, 2 o 3;

50

B es nucleobase;

R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, alquinilo C₂₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀;

55 R^c es H, alquilo C₁₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol;

R^{a1} y R^{b1} son cada uno independientemente H o un contraión; y

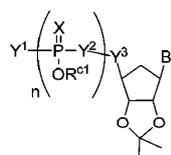
—OR^{c1} es OH a un pH de aproximadamente 1 o —OR^{c1} es O⁻ a pH fisiológico;

5 siempre que el anillo que abarca las variables A, B, D, U, Z, Y² e Y³ no pueda ser ribosa.

En algunos casos, B es una nucleobase que se selecciona del grupo que consiste en citosina, guanina, adenina y uracilo.

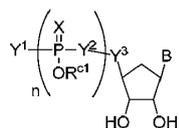
10 En algunos casos, la nucleobase es una pirimidina o un derivado de esta.

En algunos casos, los nucleótidos modificados son un compuesto de la Fórmula XI-a:



15 XI-a.

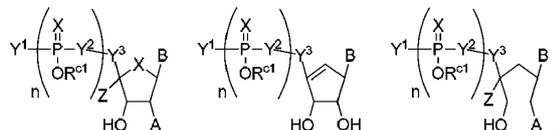
En algunos casos, los nucleótidos modificados son un compuesto de la Fórmula XI-b:



XI-b. -----

20

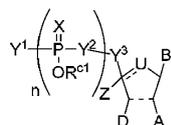
En algunos casos, los nucleótidos modificados son un compuesto de la Fórmula XI-c1, XI-c2 o XI-c3:



25 XI-c1 ----- XI-c2

XI-c3

En algunos casos, los nucleótidos modificados son un compuesto de la Fórmula XI:



XI

30

donde:



35 denota un enlace simple o doble;

--- denota un enlace sencillo opcional;

U es O, S, -NR^a- o -CR^aR^b- cuando

40



denota un enlace sencillo, o U es -CR^a- cuando

45



denota un enlace doble;

Z es H, alquilo C₁₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀, o Z está ausente cuando

5



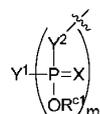
denota un enlace doble; y

10 Z puede ser -CR^aR^b- y formar un enlace con A;

A es H, OH, sulfato, -NH₂, -SH, un aminoácido o un péptido que comprende 1 a 12 aminoácidos;

D es H, OH, -NH₂, -SH, un aminoácido, un péptido que comprende 1 a 12 aminoácidos o un grupo de la Fórmula XII:

15



XII

o A y D junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un anillo de 5 miembros;

20 X es O o S;

cada uno de Y¹ se selecciona independientemente de -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} y -SR^{a1};

cada uno de Y² e Y³ se selecciona independientemente de O, -CR^aR^b-, NR^c, S o un enlazador que comprende uno o más átomos seleccionados del grupo que consiste en C, O, N y S;

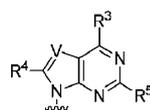
25

n es 0, 1, 2, o 3;

m es 0, 1, 2 o 3;

30

B es una nucleobase de la Fórmula XIII:



XIII

35 donde:

V es N o NR^c cargado positivamente;

R³ es NR^cR^d, -OR^a o -SR^a;

40

R⁴ es H u opcionalmente puede formar un enlace con Y³;

R⁵ es H, -NR^cR^d o -OR^a;

45 R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₁₂, alqueno C₂₋₁₂, alquino C₂₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀;

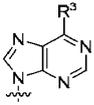
R^c es H, alquilo C₁₋₁₂, alqueno C₂₋₁₂, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol;

R^{a1} y R^{b1} son cada uno independientemente H o un contraión; y

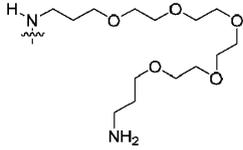
50

—OR^{c1} es OH a un pH de aproximadamente 1 o —OR^{c1} es O⁻ a pH fisiológico.

En algunos casos, B es:

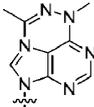


donde R³ es —OH, —SH, o



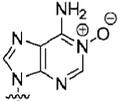
5

En algunos casos, B es:



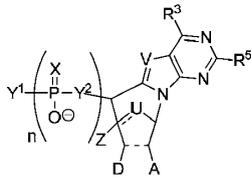
10

En algunos casos, B es:



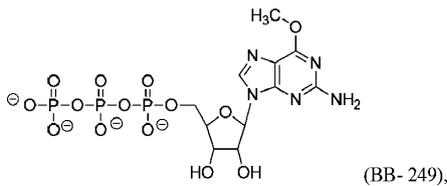
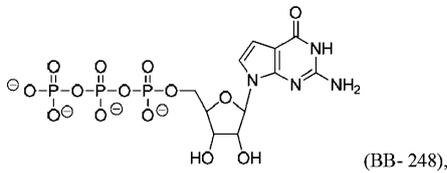
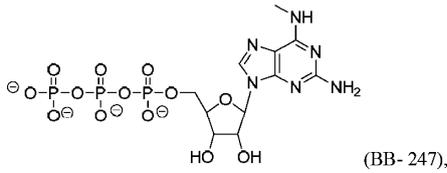
15

En algunos casos, los nucleótidos modificados son un compuesto de la Fórmula I-d:

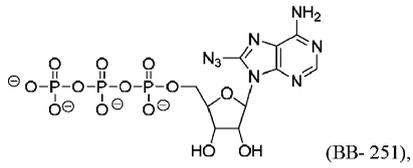
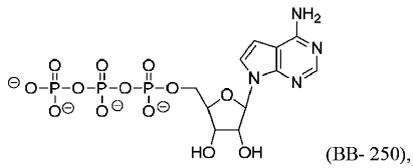


20

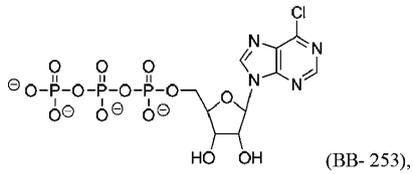
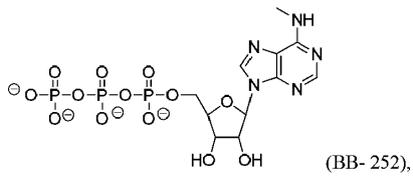
En algunos casos, los nucleótidos modificados son un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



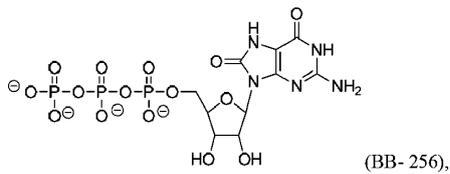
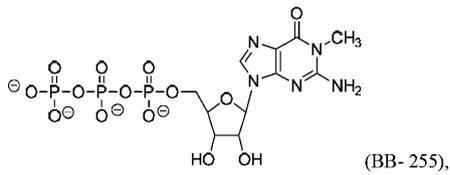
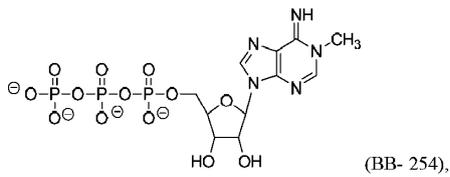
25



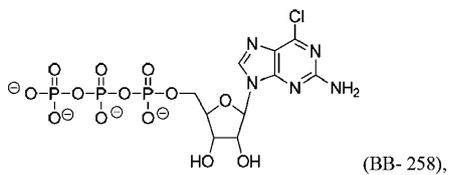
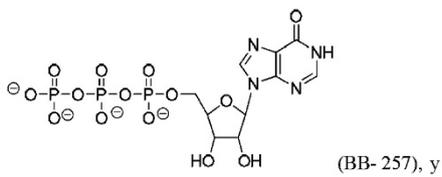
5



10

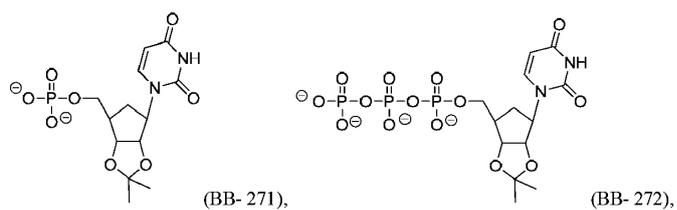
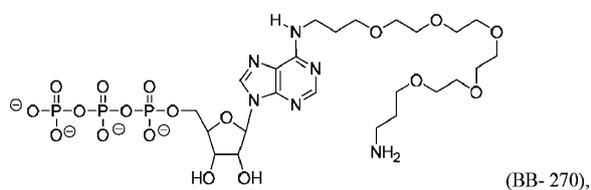
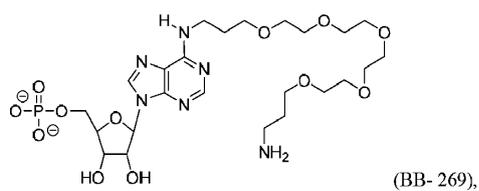
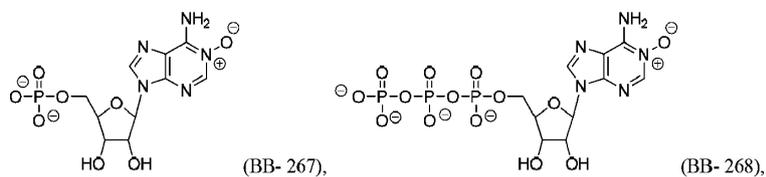
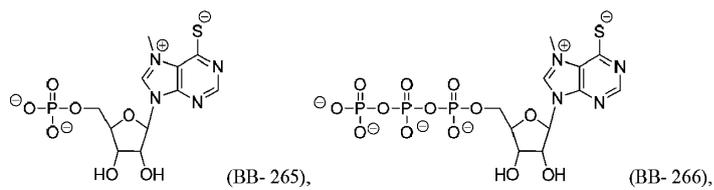
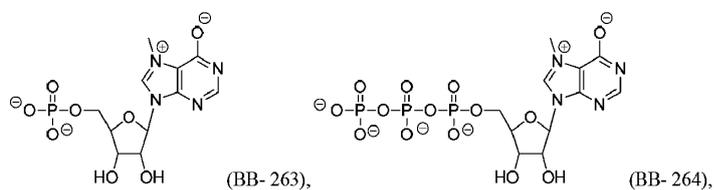
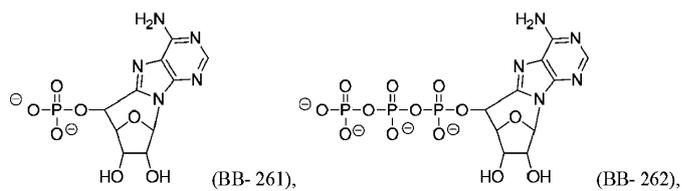
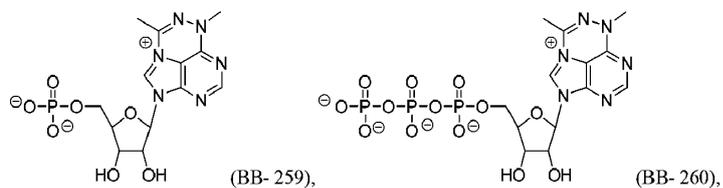


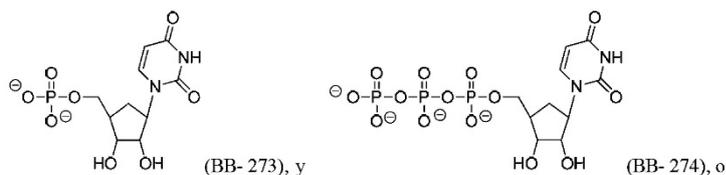
15



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunos casos, los nucleótidos modificados son un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:





o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 **Modificaciones en el enlace internucleósido**

Los nucleótidos modificados, que pueden incorporarse en una molécula de polinucleótido, pueden modificarse en la unión internucleósido (por ejemplo, estructura principal de fosfato). En esta invención, en el contexto de la estructura principal del polinucleótido, las frases "fosfato" y "fosfodiéster" se usan indistintamente. Los grupos fosfato de la estructura principal se pueden modificar reemplazando uno o más de los átomos de oxígeno con un sustituyente diferente. Además, los nucleósidos y nucleótidos modificados pueden incluir el reemplazo al por mayor de un resto fosfato no modificado con otro enlace internucleósido como se describe en esta invención. Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, fosfortioato, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfato, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosforodiamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no ligantes reemplazados por azufre. El enlazador de fosfato también se puede modificar mediante el reemplazo de un oxígeno de enlace con nitrógeno (fosforamidatos unidos), azufre (fosfortioatos unidos) y carbono (metileno-fosfonatos unidos).

El resto de fosfato sustituido con α -tio se proporciona para conferir estabilidad a los polímeros de ARN y ADN a través de los enlaces de estructura principal de fosfortioato no naturales. El ADN y el ARN de fosfortioato han aumentado la resistencia a las nucleasas y, posteriormente, una vida media más larga en un entorno celular. Aunque no desean limitarse a la teoría, se espera que las moléculas de polinucleótidos unidas a fosfortioato también reduzcan la respuesta inmunitaria innata a través de una unión/activación más débil de moléculas inmunitarias innatas celulares.

En casos específicos, un nucleósido modificado incluye un alfa-tionucleósido (por ejemplo, 5'-O-(1-ftiofosfato)-adenosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-citidina (α -tio-citidina), 5'-O-(1-tiofosfato)-guanosina, 5'-O-(1-tiofosfato)-uridina o 5'-O-(1-tiofosfato)-pseudouridina).

A continuación se describen en esta invención otros enlaces entre nucleósidos que pueden emplearse de acuerdo con la presente descripción, incluyendo enlaces entre nucleósidos que no contienen un átomo de fósforo.

Combinaciones de azúcares modificados, nucleobases y enlaces entre nucleósidos

Los polinucleótidos de la descripción pueden incluir una combinación de modificaciones al azúcar, la nucleobase y/o el enlace internucleósido. Estas combinaciones pueden incluir cualquiera de una o más modificaciones descritas en esta invención. Por ejemplo, cualquiera de los nucleótidos descritos en esta invención en las Fórmulas (Ia), (Ia-1)-(Ia-3), (Ib)-(Ic), (IIa)-(IIp), (IIb-1), (IIb-2), (IIc-1)-(IIc-2), (IIn-1), (IIn-2), (IVa)-(IVi), y (IXa)-(IXr) puede combinarse con cualquiera de las nucleobases descritas en esta invención (por ejemplo, en las Fórmulas (b1)-(b43) o cualquier otra descripción en esta invención).

Síntesis de moléculas de polinucleótidos

Las moléculas de polinucleótidos para su uso de acuerdo con la descripción se pueden preparar de acuerdo con cualquier técnica útil, tal como se describe en esta invención. Los nucleósidos y nucleótidos modificados utilizados en la síntesis de moléculas de polinucleótidos descritos en esta invención se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes métodos y procedimientos generales. Cuando se proporcionan condiciones de proceso típicas o preferidas (por ejemplo, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, solventes, presiones, etc.), un experto en la técnica sería capaz de optimizar y desarrollar condiciones de proceso adicionales. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o solvente particular usados, pero tales condiciones pueden determinarse por un experto en la materia mediante procedimientos de optimización rutinarios.

Los procesos descritos en esta invención se pueden monitorear de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto se puede monitorear por medios espectroscópicos, tal como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ^1H o ^{13}C) espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (por ejemplo, visible por UV), o espectrometría de masas, o por cromatografía tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía de capa fina.

La preparación de moléculas de polinucleótidos de la presente descripción puede implicar la protección y desprotección de varios grupos químicos. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores adecuados. La química de los grupos protectores se

puede encontrar, por ejemplo, en Greene, y col., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991,

Las reacciones de los procesos descritos en esta invención se pueden llevar a cabo en solventes adecuados, que se pueden seleccionar fácilmente por un experto en la materia de la síntesis orgánica. Los solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermedios o los productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del solvente hasta la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción dada se puede llevar a cabo en un solvente o una mezcla de más de un solvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, se pueden seleccionar solventes adecuados para una etapa de reacción particular.

La resolución de mezclas racémicas de polinucleótidos o ácidos nucleicos modificados (por ejemplo, polinucleótidos o moléculas de ARNm modificado) se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica. Un ejemplo de procedimiento incluye la recrystalización fraccionada usando un "ácido de resolución quiral" que es un ácido orgánico ópticamente activo que forma sal. Los agentes de resolución adecuados para los procedimientos de recrystalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L de ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos alcanforsulfónicos ópticamente activos. La resolución de mezclas racémicas también se puede llevar a cabo mediante elución en una columna rellena con un agente de resolución ópticamente activo (*p. ej.*, dinitrobenzoilfenilglicina). Un experto en la materia puede determinar la composición de solvente de elución adecuada.

Los nucleósidos y nucleótidos modificados (por ejemplo, moléculas de bloque de construcción) se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos sintéticos descritos en Ogata y col., *J. Org. Chem.* 74:2585-2588 (2009); Purnal y col., *Res. ácidos nucl.* 22(1): 72-78, (1994); Fukuhara y col., *Biochemistry*, 1(4): 563-568 (1962); y Xu y col., *Tetrahedron*, 48(9): 1729-1740 (1992),

Los polinucleótidos de la descripción pueden modificarse o no de manera uniforme a lo largo de toda la longitud de la molécula. Por ejemplo, uno o más o todos los tipos de nucleótidos (por ejemplo, purina o pirimidina, o cualquiera o más o la totalidad de A, G, U, C) pueden modificarse o no uniformemente en un polinucleótido de la descripción, o en una región de secuencia predeterminada dada de este. En algunos casos, todos los nucleótidos X en un polinucleótido de la descripción (o en una región de secuencia dada de este) se modifican, donde X puede ser cualquiera de los nucleótidos A, G, U, C o cualquiera de las combinaciones A+G, A+U, A+C, G+U, G+C, U+C, A+G+U, A+G+C, G+U+C o A+G+C.

Pueden existir diferentes modificaciones de azúcar, modificaciones de nucleótidos y/o enlaces internucleósidos (por ejemplo, estructuras de estructura principal) en diversas posiciones en el polinucleótido. Un experto en la materia apreciará que los análogos de nucleótidos u otras modificaciones se pueden ubicar en cualquier posición o posiciones de un polinucleótido de modo que la función del polinucleótido no disminuya sustancialmente. Una modificación también puede ser una modificación de terminal 5' o 3'. El polinucleótido puede contener de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 100 % de nucleótidos modificados (ya sea en relación con el contenido de nucleótidos general, o en relación con uno o más tipos de nucleótidos, es decir, uno o más de A, G, U o C) o cualquier porcentaje intermedio (por ejemplo, del 1 % al 20 %, del 1 % al 25 %, del 1 % al 50 %, del 1 % al 60 %, del 1 % al 70 %, del 1 % al 80 %, del 1 % al 90 %, del 1 % al 95 %, del 10 % al 20 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 70 %, del 10 % al 80 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 70 %, del 20 % al 80 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 70 %, del 50 % al 80 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 95 %, del 50 % al 100 %, del 70 % al 80 %, del 70 % al 90 %, del 70 % al 95 %, del 70 % al 100 %, del 80 % al 90 %, del 80 % al 95 %, del 80 % al 100 %, del 90 % al 95 %, del 90 % al 100 % y del 95 % al 100 %).

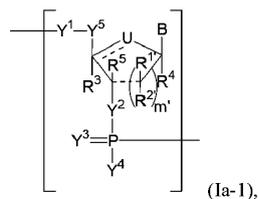
En algunos casos, el polinucleótido incluye una pirimidina modificada (por ejemplo, un uracilo/uridina/U modificado o citosina/citidina/C modificada). En algunas realizaciones, el uracilo o uridina (generalmente: U) en la molécula de polinucleótido se puede reemplazar con aproximadamente del 1 % a aproximadamente el 100 % de un uracilo modificado o uridina modificada (por ejemplo, del 1 % al 20 %, del 1 % al 25 %, del 1 % al 50 %, del 1 % al 60 %, del 1 % al 70 %, del 1 % al 80 %, del 1 % al 90 %, del 1 % al 95 %, del 10 % al 20 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 70 %, del 10 % al 80 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 10 % al 100 %, del 20 % al 25 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 70 %, del 20 % al 80 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 70 %, del 50 % al 80 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 95 %, del 50 % al 100 %, del 70 % al 80 %, del 70 % al 90 %, del 70 % al 95 %, del 70 % al 100 %, del 80 % al 90 %, del 80 % al 95 %, del 80 % al 100 %, y del 95 % al 100 % de un uracilo modificado o uridina modificada). El uracilo o uridina modificado se puede reemplazar por un compuesto que tiene una única estructura o por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas, como se describe en esta invención). En algunos casos, la citosina o citidina (generalmente: C) en la molécula de polinucleótido se puede reemplazar con aproximadamente del 1 % a aproximadamente el 100 % de una citosina modificada o citidina modificada (por ejemplo, del 1 % al 20 %, del 1 % al 25 %, del 1 % al 50 %, del 1 % al 60 %, del 1 % al 70 %, del 1 % al 80 %, del 1 % al 90 %, del 1 % al 95 %, del 10 % al 20 %, del 10 % al 25 %, del 10 % al 50 %, del 10 % al 60 %, del 10 % al 70 %, del 10 % al 80 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 95 %, del 10 % al 100 %, del 20 % al 25 %, del 20 % al 50 %, del 20 % al 60 %, del 20 % al 70 %, del 20 % al 80 %, del 20 % al 90 %, del 20 % al 95 %

%, del 20 % al 100 %, del 50 % al 60 %, del 50 % al 70 %, del 50 % al 80 %, del 50 % al 90 %, del 50 % al 95 %, del 50 % al 100 %, del 70 % al 80 %, del 70 % al 90 %, del 70 % al 95 %, del 70 % al 100 %, del 80 % al 90 %, del 80 % al 95 %, del 80 % al 100 %, del 90 % al 95 %, del 90 % al 100 %, y del 95 % al 100 % de una citosina modificada o citidina modificada). La citosina o citidina modificada se puede reemplazar por un compuesto que tiene una única estructura o por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas, como se describe en esta invención).

5

En algunos casos, la presente descripción proporciona procedimientos para sintetizar un polinucleótido (por ejemplo, la primera región, primera región flanqueante o segunda región flanqueante) que incluyen n número de nucleósidos enlazados que tienen la Fórmula (Ia-1):

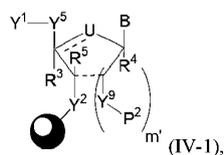
10



que comprende:

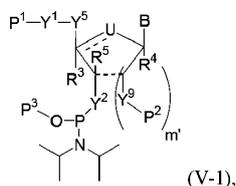
15

1. a) hacer reaccionar un nucleótido de la Fórmula (IV-1):



20

con un compuesto de fosforamidita de la Fórmula (V-1):



donde Y⁹ es H, hidroxilo, fosforilo, pirofosfato, sulfato, amino, tiol, aminoácido opcionalmente sustituido o un péptido (por ejemplo, que incluye de 2 a 12 aminoácidos); y cada P¹, P² y P³ es, independientemente, un grupo protector adecuado;

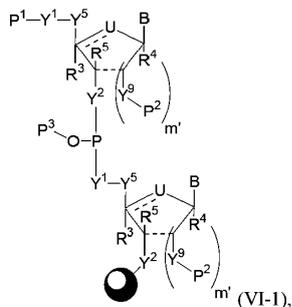
25

y



30 denota un soporte sólido;

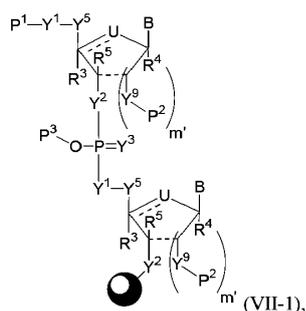
para proporcionar un polinucleótido de la Fórmula (VI-1):



35

y

2. b) oxidar o sulfurar el polinucleótido de la Fórmula (V) para proporcionar un polinucleótido de la Fórmula (VII-1):



y

5 3. c) retirar los grupos protectores para proporcionar el polinucleótido de la Fórmula (Ia).

En algunos casos, las etapas a) y b) se repiten de 1 a aproximadamente 10.000 veces. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en adenosina A, C, G y U, citosina, guanosina y uracilo. En algunas realizaciones, la nucleobase puede ser una pirimidina o un derivado de esta.

10 En algunos casos, el polinucleótido se puede traducir.

Otros componentes de polinucleótidos son opcionales y son beneficiosos en algunas realizaciones. Por ejemplo, se proporciona una región no traducida (UTR) 5' y/o una UTR 3', donde cualquiera o ambas pueden contener independientemente una o más modificaciones de nucleótidos diferentes. En tales casos, las modificaciones de nucleótidos también pueden estar presentes en la región traducible. También se proporcionan polinucleótidos que contienen una secuencia de Kozak.

15

Combinaciones de nucleótidos

20 Otros ejemplos de nucleótidos modificados y combinaciones de nucleótidos modificados se proporcionan a continuación en la Tabla 2. Estas combinaciones de nucleótidos modificados se pueden utilizar para formar los polinucleótidos de la descripción. A menos que se indique lo contrario, los nucleótidos modificados pueden estar completamente sustituidos por los nucleótidos naturales de los polinucleótidos de la descripción. A modo de ejemplo no taxativo, la uridina de nucleótido natural puede sustituirse con un nucleósido modificado descrito en esta invención.

25 En otro ejemplo no taxativo, la uridina de nucleótido natural puede estar parcialmente sustituida (por ejemplo, aproximadamente un 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 %) con al menos uno del nucleósido modificado descrito en esta invención.

Tabla 2

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>
α-tio-citidina	α-tio-citidina/5-yodo-uridina
	α-tio-citidina/N1-metil-pseudo-uridina
	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
pseudoisocitidina	pirrolo-citidina/5-yodo-uridina
	pseudoisocitidina/N1-metil-pseudouridina
	pseudoisocitidina/α-tio-uridina
	pseudoisocitidina/5-metil-uridina
	aproximadamente el 25 % de las citosinas son pseudoisocitidina
pirrolo-citidina	pirrolo-citidina + 5-yodo-uridina
	pirrolo-citidina/N1-metil-pseudouridina
	pirrolo-citidina/ α-tio-uridina
	pirrolo-citidina/5-metil-uridina

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>
	aproximadamente el 50 % de las citosinas son pirrolocitidina
N4-acetil-citidina	N4-acetil-citidina /5-yodo-uridina
	N4-acetil-citidina /N1-metil-pseudouridina
	N4-acetil-citidina /a-tio-uridina
	N4-acetil-citidina /5-metil-uridina
	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
	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-uridina

Ciertos nucleótidos modificados y combinaciones de nucleótidos han sido explorados por los inventores actuales. Estos hallazgos se describen en la solicitud provisional de EE. UU. n. ° 61/404.413, presentada el 1 de octubre de 2010, titulada Ácidos nucleicos diseñados y procedimientos de uso de los mismos, solicitud de patente de EE. UU. n. ° 13/251.840, presentada el 3 de octubre de 2011, titulada Nucleótidos modificados, y ácidos nucleicos, y usos de los mismos, ahora abandonada, solicitud de patente de EE. UU. n. ° 13/481.127, presentada el 25 de mayo de 2012, titulada Nucleótidos modificados, y ácidos nucleicos, y usos de los mismos, publicación de patente internacional n. ° WO2012045075, presentada el 3 de octubre de 2011, titulada Nucleósidos modificados, nucleótidos y ácidos nucleicos, y ácidos nucleicos, y usos de los mismos, publicación de patente de EE. UU. n. ° US20120237975 presentada el 3 de octubre de 2011, titulada Ácidos nucleicos diseñados y procedimiento de uso del mismo, y publicación de patente internacional n. ° WO2012045082,

Otros ejemplos de combinaciones de nucleótidos modificados se proporcionan a continuación en la Tabla 3. Estas combinaciones de nucleótidos modificados se pueden utilizar para formar los polinucleótidos de la descripción.

Tabla 3

<u>Nucleótido modificado</u>	<u>Combinación de nucleótidos modificados</u>
citidina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b10)	citidina modificada con (b10)/N1-metil-pseudouridina
	citidina modificada con (b10)/5-metoxi-uridina
	citidina modificada con (b10)/5-metil-uridina
	citidina modificada con (b10)/5-bromo-uridina
	citidina modificada con (b10)/2-tio-uridina
	aproximadamente el 50 % de la citidina sustituida con citidina modificada (b10)/ aproximadamente el 50 % de las uridinas son 2-tio-uridina
citidina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b32)	citidina modificada con (b32)/N1-metil-pseudouridina
	citidina modificada con (b32)/5-metoxi-uridina
	citidina modificada con (b32)/5-metil-uridina
	citidina modificada con (b32)/5-bromo-uridina
	citidina modificada con (b32)/2-tio-uridina
	aproximadamente el 50 % de la citidina sustituida con citidina modificada (b32)/ aproximadamente el 50 % de las uridinas son 2-tio-uridina
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b1)	uridina modificada con (b1)/ N4-acetil-citidina
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b8)	uridina modificada con (b8)/ N4-acetil-citidina

Nucleótido modificado	Combinación de nucleótidos modificados
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b28)	uridina modificada con (b28)/ N4-acetil-citidina
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b29)	uridina modificada con (b29)/ N4-acetil-citidina
uridina modificada que tiene una o más nucleobases de Fórmula (b30)	uridina modificada con (b30)/ N4-acetil-citidina

5 En algunos casos, al menos 25 % de las citosinas se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b10)- (b14), (b24), (b25) o (b32) - (b35) (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 100 % de, por ejemplo, un compuesto de Fórmula (b10) o (b32)).

10 En algunos casos, al menos el 25 % de los uracilos se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b1)- (b9), (b21) - (b23) o (b28) - (b31) (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 100 % de, por ejemplo, un compuesto de Fórmula (b1), (b8), (b28), (b29) o (b30)).

20 En algunos casos, al menos el 25 % de las citosinas se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b10)-(b14), (b24), (b25), o (b32) - (b35) (por ejemplo, Fórmula (b10) o (b32)), y al menos el 25 % de los uracilos se reemplazan por un compuesto de Fórmula (b1)- (b9), (b21) - (b23), o (b28) - (b31) (por ejemplo, Fórmula (b1), (b8), (b28), (b29), o (b30)) (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 100 %).

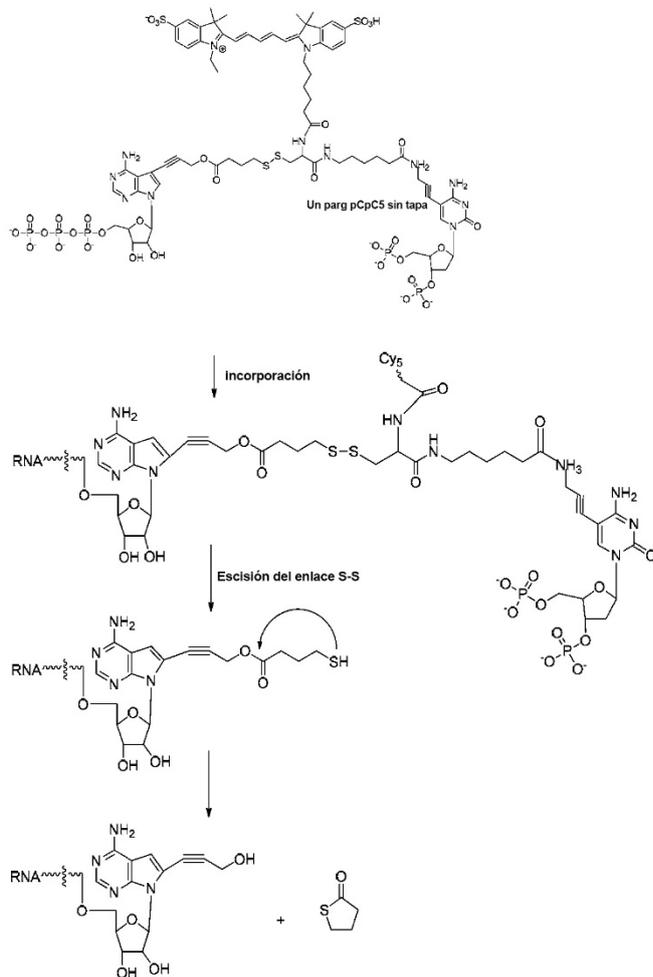
Modificaciones que incluyen un enlazador y una carga útil

30 La nucleobase del nucleótido puede estar unida de forma covalente en cualquier posición químicamente apropiada a una carga útil, por ejemplo, agente detectable o agente terapéutico. Por ejemplo, la nucleobase puede ser deaza-adenosina o deaza-guanosina y el enlazador se puede unir en las posiciones C-7 o C-8 de la deaza-adenosina o deaza-guanosina. En otros casos, la nucleobase puede ser citosina o uracilo y el enlazador se puede unir a las posiciones N-3 o C-5 de citosina o uracilo. El esquema 1 a continuación representa un nucleótido modificado de ejemplo donde la nucleobase, adenina, está unida a un enlazador en el carbono C-7 de 7-deaza adenina. Además, el

35 Esquema 1 ilustra el nucleótido modificado con el enlazador y la carga útil, por ejemplo, un agente detectable, incorporado en el extremo 3' del ARNm. La escisión de disulfuro y la adición de 1,2 del grupo tiol en el éster de propargilo libera el agente detectable. La estructura restante (representada, por ejemplo, como pApC5Parg en el Esquema 1) es el inhibidor. La justificación de la estructura de los nucleótidos modificados es que el inhibidor ligado interfiere estéricamente con la capacidad de la polimerasa para incorporar una segunda base. Por lo tanto, es

40 fundamental que el anclaje sea lo suficientemente largo como para afectar a esta función y que el inhibidor esté en una orientación estereoquímica que inhiba o prohíba el segundo y siga a los nucleótidos en la cadena de polinucleótidos en crecimiento.

Esquema 1



Conector

- 5 El término "enlazador", tal como se usa en esta invención, se refiere a un grupo de átomos, *por ejemplo*, 10-1.000 átomos, y puede comprender los átomos o grupos tales como, pero no limitado a, carbono, amino, alquilamino, oxígeno, azufre, sulfóxido, sulfonilo, carbonilo e imina. El enlazador se puede unir a un nucleósido o nucleótido modificado en la nucleobase o resto de azúcar en un primer extremo, y a una carga útil, *por ejemplo*, agente detectable o terapéutico, en un segundo extremo. El enlazador es de longitud suficiente para no interferir con la incorporación en una secuencia de ácido nucleico.

15 Los ejemplos de grupos químicos que se pueden incorporar en el enlazador incluyen, pero no se limitan a, un grupo alquilo, alqueno, alquino, amido, éter, tioéter, o éster. La cadena enlazadora también puede comprender parte de un anillo saturado, insaturado o aromático, que incluye anillos policíclicos y heteroaromáticos donde el anillo heteroaromático es un grupo arilo que contiene de uno a cuatro heteroátomos, N, O o S. Los ejemplos específicos de enlazadores incluyen, pero no se limitan a, alcanos insaturados, polietilenglicoles y polímeros de dextrano.

20 Por ejemplo, el enlazador puede incluir unidades monoméricas de etileno o propilenglicol, *por ejemplo*, dietilenglicol, dipropilenglicol, trietilenglicol, tripropilenglicol, tetraetilenglicol o tetraetilenglicol. En algunas realizaciones, el enlazador puede incluir un resto alquilo divalente, alquenilo y/o alquinilo. El enlazador puede incluir un resto éster, amida o éter.

25 Otros ejemplos incluyen restos escindibles dentro del enlazador, tal como, por ejemplo, un enlace disulfuro (-S-S-) o un enlace azoico (-N=N-), que se puede escindir usando un agente reductor o fotólisis. Un enlace escindible incorporado en el enlazador y unido a un nucleótido modificado, cuando se escinde, da como resultado, por ejemplo, una "cicatriz" corta o modificación química en el nucleótido. Por ejemplo, después de la escisión, la cicatriz resultante en una base de nucleótidos, que formó parte del nucleótido modificado, y se incorpora en una cadena de polinucleótidos, no es reactiva y no necesita ser neutralizada químicamente. Esto aumenta la facilidad con la que se puede incorporar un nucleótido posterior durante la secuenciación de una plantilla de polímero de ácido nucleico. Por ejemplo, las condiciones incluyen el uso de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditioneitol (DTT) y/u otros agentes

reductores para la escisión de un enlace disulfuro. Un enlace que se puede cortar selectivamente que incluye un enlace amido se puede escindir, por ejemplo, mediante el uso de TCEP u otros agentes reductores y/o fotólisis. Un enlace que se puede separar selectivamente que incluye un enlace éster se puede escindir, por ejemplo, mediante hidrólisis ácida o básica.

5

Carga útil

Los procedimientos y composiciones descritos en esta invención son útiles para administrar una carga útil a un objetivo biológico. La carga útil se puede utilizar, *p. ej.*, para marcar (*p. ej.*, un agente detectable tal como un fluoróforo) o para fines terapéuticos (*p. ej.*, una citotoxina u otro agente terapéutico).

10

Carga útil: Agentes terapéuticos

En algunos casos, la carga útil es un agente terapéutico tal como una citotoxina, ion radiactivo, quimioterapéutico u otro agente terapéutico. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, maitansinoides, *por ejemplo*, maitansinol (véase la patente de EE. UU. N.º 5.208.020), CC-1065 (véase la patente de EE. UU. N.º 5.475.092, 5.585.499, 5.846.545) y análogos u homólogos de estos. Los iones radiactivos incluyen, pero no se limitan a, yodo (*por ejemplo*, yodo 125 o yodo 131), estroncio 89, fósforo, paladio, cesio, iridio, fosfato, cobalto, itrio 90, samario 153 y praseodimio. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (*por ejemplo*, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (*por ejemplo*, mecloretamina, tioepa clorambucilo, CC-1065, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomannitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (*por ejemplo*, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (*por ejemplo*, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC), y agentes anti-mitóticos (*por ejemplo*, vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides).

15

20

25

Carga útil: agentes detectables

Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias moléculas pequeñas orgánicas, compuestos inorgánicos, nanopartículas, enzimas o sustratos de enzimas, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales quimioluminiscentes, materiales radiactivos y agentes de contraste. Tales etiquetas ópticamente detectables incluyen, por ejemplo, sin limitación, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico; acridina y derivados: acridina, acridina isotiocianato; ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1 -sulfónico (EDANS); 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato; N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; BODIPY; Amarillo brillante; cumarina y derivados; cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcoumarina (Coumaran 151); tintes de cianina; cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5'5"-dibromopirogallol-sulfonaftaleino (Bromopirogallol Rojo); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; dietilenetriamina pentaacetato; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico; cloruro 5-[dimetilamino]-naftaleno-1-sulfonilo (DNS, dansilcloruro); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados; eosina, eosina isotiocianato, eritrosin y derivados; eritrosin B, eritrosin, isotiocianato; etidio; fluoresceína y derivados; 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7 -dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, fluoresceína, isotiocianato fluoresceína, QFITC, (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato verde malaquita; 4-metilumbelliferoneorto cresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Fenol rojo; B-ficoeritrin; o-ftaldialdeído; pireno y derivados; pireno, butirato pireno, succinimidil 1-pireno; puntos cuánticos del butirato; Rojo reactivo 4 (Cibacron™ Rojo brillante 3B-A) rodamina y derivados: 6-carboxi-x-rodamina (ROX), 6-carboxirodamina (R6G), Lissamina Rodamina B Sulfonil cloruro de la rodamina (RHOD), rodamina B, rodamina 123, rodamina x isotiocianato, sulforhodamina B, sulforhodamina 101, derivado de cloruro de sulfonilo de sulforhodamina 101 (Rojo Texas); N,N,N',N'treametil-6-carboxirodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC); riboflavina; ácido rosólico; derivados del quelato de terbio; Cianina-3 (Cy3); Cianina-5 (Cy5); Cianina-5.5 (Cy5.5), cianina-7 (Cy7); IRD 700; IRD 800; Alexa 647; La jolta azul; ftalo cianina; y naftalo cianina. En algunos casos, la etiqueta detectable es un tinte fluorescente, tal como Cy5 y Cy3.

35

40

45

50

55

Ejemplos de material luminiscente incluyen luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina.

Ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ¹⁸F, ⁶⁷Ga, ^{81m}Kr, ⁸²Rb, ¹¹¹In, ¹²³I, ¹³³Xe, ²¹¹Tl, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³H, ^{99m}Tc (por ejemplo, como pertechnetato (technetato (VII), TcO₄⁻), directa o indirectamente, u otro radioisótopo detectable por el recuento directo de la radioemisión o por el recuento de centelleo.

60

Además, se pueden usar agentes de contraste, por ejemplo, agentes de contraste para MRI o RMN, para TC de rayos X, imágenes Raman, tomografía de coherencia óptica, imágenes de absorción, imágenes de ultrasonido o imágenes térmicas. Los agentes de contraste ejemplares incluyen oro (por ejemplo, nanopartículas de oro), gadolinium

65

(por ejemplo, *gd* quelado), óxidos de hierro (por ejemplo, óxido de hierro superparamagnético (SPIO), nanopartículas de óxido de hierro monocristalino (MION), y óxido de hierro superparamagnético ultrareducido (USPIO)), quelatos de manganeso (por ejemplo, Mn-DPDP), sulfato de bario, también se pueden usar medios de contraste yodados (iohexol), microburbujas o perfluorocarbonos.

5 En algunos casos, el agente detectable es un pre-cursor no detectable que se vuelve detectable tras la activación. Los ejemplos incluyen construcciones fluorogénicas de tetrazina-fluoróforo (*p. ej.*, tetrazina-BODIPY FL, tetrazina-Verde Oregon Green 488 o tetrazina-BODIPY TMR-X) o agentes fluorogénicos activables por enzimas (*p. ej.*, PROSENSE (VisEn Medical)).

10 Cuando los compuestos se etiquetan enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, la etiqueta enzimática se detecta mediante la determinación de la conversión de un sustrato apropiado en producto.

15 Los ensayos *in vitro* en los que se pueden utilizar estas composiciones incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) y análisis de transferencia Western.

20 Las etiquetas distintas a las descritas en esta invención se contemplan en la presente descripción, que incluye otras etiquetas detectables ópticamente. Las etiquetas se pueden unir al nucleótido modificado de la presente descripción en cualquier posición usando productos químicos estándar de modo que la etiqueta se pueda retirar de la base incorporada tras la escisión del enlazador escindible.

Carga útil. Cargas útiles de penetración celular

25 En algunos casos, los nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados también pueden incluir una carga útil que puede ser un resto o agente de penetración celular que mejora la administración intracelular de las composiciones. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir una secuencia peptídica de penetración celular que facilita la administración al espacio intracelular, *por ejemplo*, péptido TAT derivado de VIH, penetratinas, transportanos o péptidos de penetración celular derivados de hCT, véase, por ejemplo, Caron y col., (2001) Mol Ther. 3(3):310-8; Langel, péptidos de penetración celular: Procesos y solicitudes (CRC Press, Boca Raton FL 2002); El-Andaloussi y col., (2005) Curr Pharm Des. 11(28):3597-611; y Deshayes y col., (2005) Cell Mol Life Sci. 62(16):1839-49. Las composiciones también se pueden formular para incluir un agente de penetración celular, *por ejemplo*, liposomas, que mejoran la administración de las composiciones al espacio intracelular.

Carga útil. Objetivos biológicos

Los nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados descritos en esta invención se pueden utilizar para administrar una carga útil a cualquier objetivo biológico para el cual existe o se puede generar un ligando específico. El ligando puede unirse al objetivo biológico de forma covalente o no covalente.

45 Los ejemplos de objetivos biológicos incluyen biopolímeros, *por ejemplo*, anticuerpos, ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, proteínas, enzimas; los ejemplos de proteínas incluyen enzimas, receptores y canales iónicos. En algunos casos, el objetivo es un marcador específico de tipo celular o tisular, *por ejemplo*, una proteína que se expresa específicamente en un tipo celular o tisular seleccionado. En algunos casos, el objetivo es un receptor, tal como, pero no limitado a, receptores de membranas plasmáticas y receptores nucleares; ejemplos más específicos incluyen receptores acoplados a proteínas G, proteínas de poros celulares, proteínas transportadoras, anticuerpos expresados en la superficie, proteínas HLA, proteínas MHC y receptores de factores de crecimiento.

Síntesis de nucleótidos modificados

Los nucleósidos y nucleótidos modificados descritos en esta invención se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles usando los siguientes métodos y procedimientos generales. Se apreciará que cuando se dan las condiciones de proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de reactivos, solventes, presiones, etc.), pueden usarse también otras condiciones de proceso a menos que se afirme lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar con los reactivos o solvente particular usados, pero tales condiciones pueden determinarse por un experto en la materia mediante procedimientos de optimización rutinarios.

60 Los procesos descritos en esta invención se pueden monitorear de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto se puede monitorear mediante medios espectroscópicos, tales como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (*p. ej.*, ^1H o ^{13}C), espectroscopía infrarroja, espectrofotometría (*p. ej.*, UV-visible), o espectrometría de masas, o mediante cromatografía tal como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de capa fina.

65 La preparación de nucleósidos y nucleótidos modificados puede implicar la protección y desprotección de varios

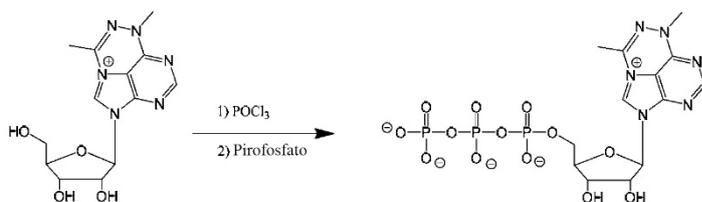
grupos químicos. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores adecuados. La química de los grupos protectores se puede encontrar, por ejemplo, en Greene, y col., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991,

- 5 Las reacciones de los procesos descritos en esta invención se pueden llevar a cabo en solventes adecuados, que se pueden seleccionar fácilmente por un experto en la materia de la síntesis orgánica. Los solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los intermedios o los productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, es decir, temperaturas que pueden variar desde la temperatura de congelación del solvente hasta la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción dada se puede llevar a cabo
10 en un solvente o una mezcla de más de un solvente. Dependiendo de la etapa de reacción particular, se pueden seleccionar solventes adecuados para una etapa de reacción particular.

- La resolución de mezclas racémicas de nucleósidos y nucleótidos modificados se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los numerosos procedimientos conocidos en la técnica. Un ejemplo de procedimiento incluye la
15 recristalización fraccionada usando un "ácido de resolución quiral" que es un ácido orgánico ópticamente activo que forma sal. Los agentes de resolución adecuados para los procedimientos de recristalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, tales como las formas D y L de ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los diversos ácidos alcanforsulfónicos ópticamente activos. La resolución de mezclas racémicas también se puede llevar a cabo mediante elución en una columna rellena
20 con un agente de resolución ópticamente activo (*p. ej.*, dinitrobenzoilfenilglicina). Un experto en la materia puede determinar la composición de solvente de elución adecuada.

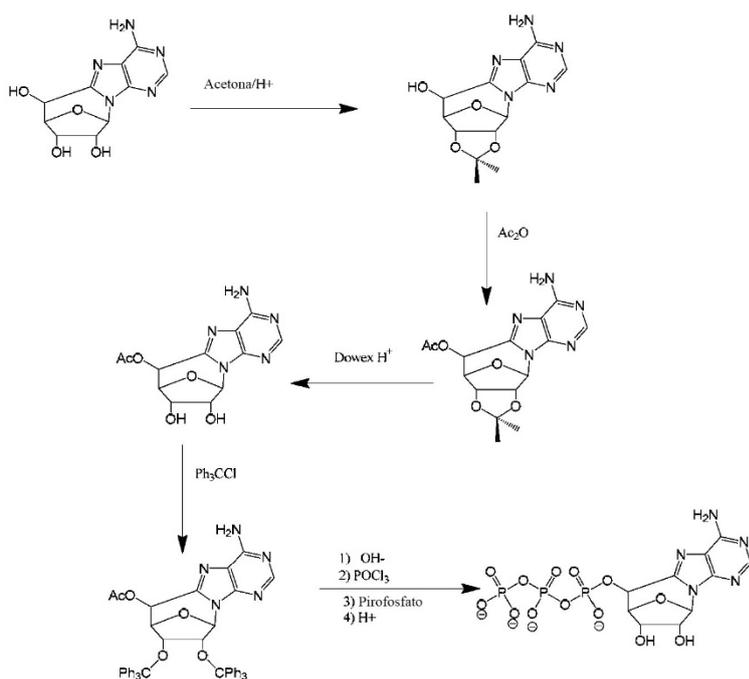
- Los ejemplos de síntesis de nucleótidos modificados, que se incorporan en un polinucleótido, por ejemplo, ARN o ARNm, se proporcionan a continuación en el Esquema 2 a través del Esquema 12. El Esquema 2 proporciona un
25 procedimiento general para la fosforilación de nucleósidos, que incluye nucleósidos modificados.

Esquema 2



- 30 Se pueden usar varios grupos protectores para controlar la reacción. Por ejemplo, el Esquema 3 proporciona el uso de múltiples etapas de protección y desprotección para promover la fosforilación en la posición 5' del azúcar, en lugar de los grupos hidroxilo 2' y 3'.

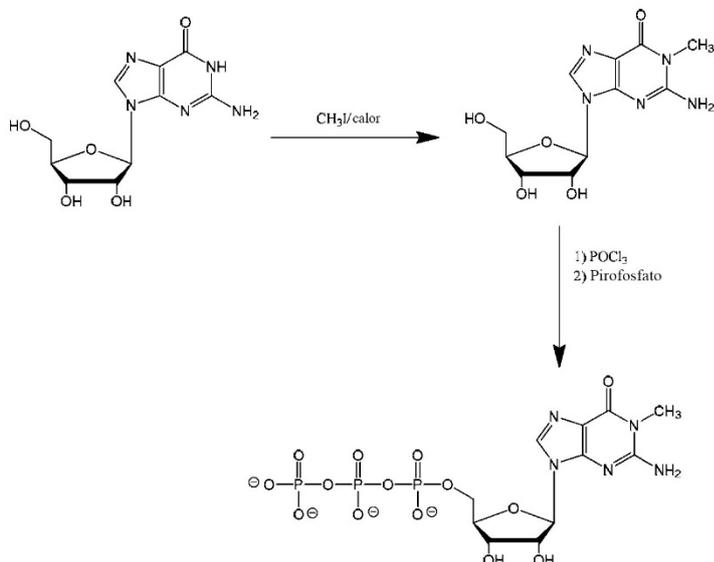
Esquema 3



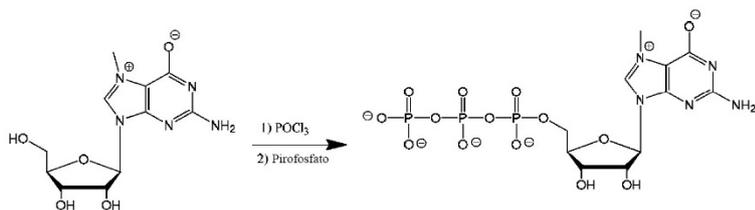
35

Los nucleótidos modificados se pueden sintetizar de cualquier manera útil. Los esquemas 4, 5 y 8 proporcionan procedimientos de ejemplo para sintetizar nucleótidos modificados que tienen una nucleobase de purina modificada; y los esquemas 6 (para referencia) y 7 proporcionan procedimientos de ejemplo para sintetizar nucleótidos modificados que tienen una pseudouridina o pseudoisocitidina modificadas, respectivamente.

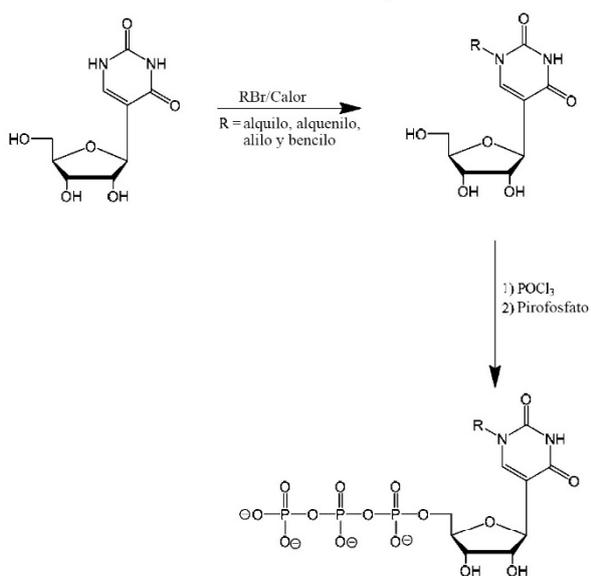
Esquema 4



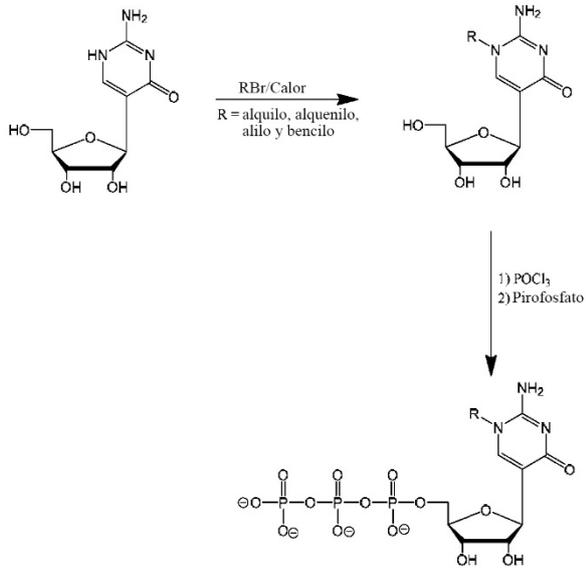
Esquema 5



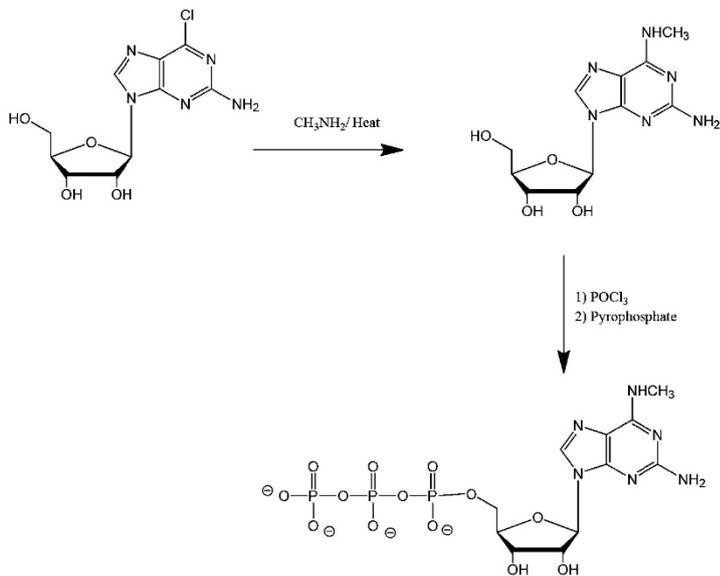
Referencia Esquema 6



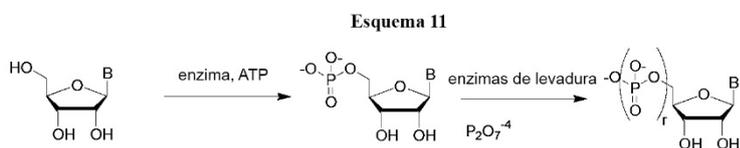
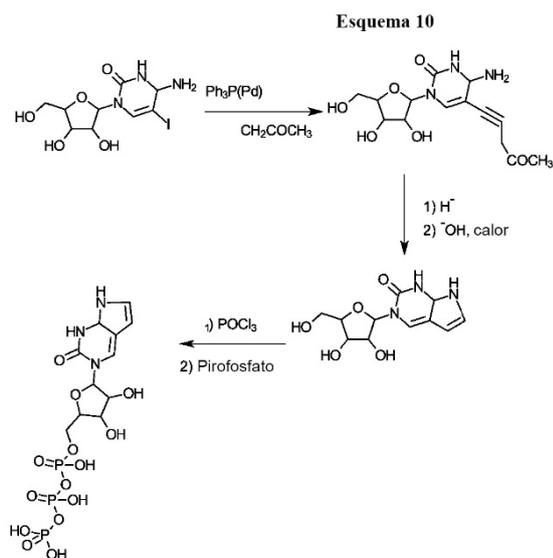
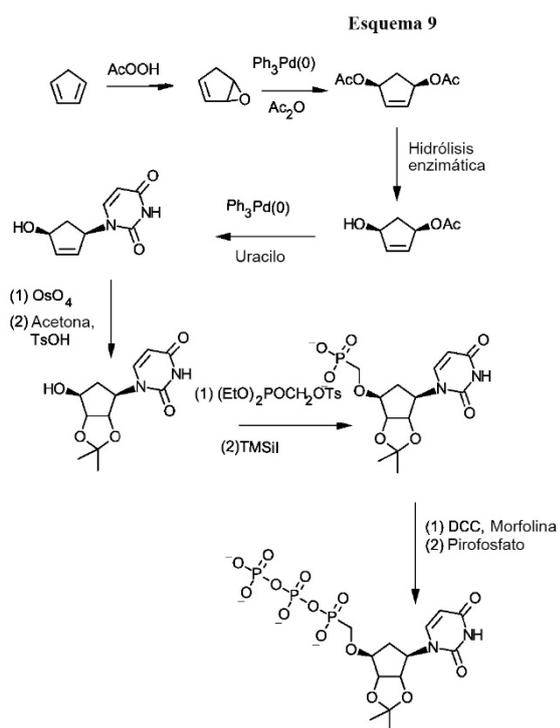
Esquema 7



Scheme 8



Los esquemas 9 y 10 proporcionan ejemplos de síntesis de nucleótidos modificados. El Esquema 11 proporciona un procedimiento biocatalítico no taxativo para producir nucleótidos.

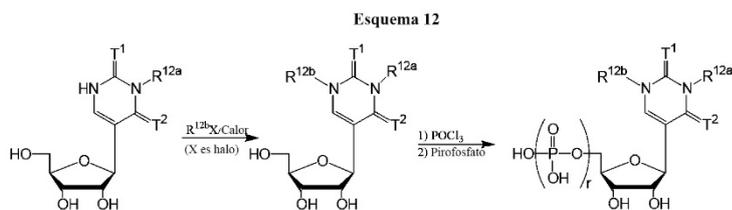


5

10

15

El Esquema 12 proporciona una síntesis de ejemplo de un uracilo modificado, donde la posición N1 en la cara del surco principal se modifica con R^{12b} , como se proporciona en otra parte, y la posición 5' de la ribosa se fosforila. T^1 , T^2 , R^{12a} , R^{12b} , y r son como se proporciona en esta invención. Esta síntesis, así como versiones optimizadas de esta, se pueden usar para modificar la cara del surco principal de otras nucleobases de pirimidina y nucleobases de purina (véanse, por ejemplo, Fórmulas (b1)-(b43)) y/o para instalar uno o más grupos fosfato (por ejemplo, en la posición 5' del azúcar). Esta reacción de alquilación también se puede utilizar para incluir uno o más grupos alquilo opcionalmente sustituidos en cualquier grupo reactivo (por ejemplo, grupo amino) en cualquier nucleobase descrita en esta invención (por ejemplo, los grupos amino en la cara de emparejamiento de bases de Watson-Crick para citosina, uracilo, adenina y guanina).



Los nucleósidos y nucleótidos modificados también se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos sintéticos descritos en Ogata y col. *Journal of Organic Chemistry* 74:2585-2588, 2009; Purmal y col. *Investigación de ácidos nucleicos* 22(1): 72-78, 1994; Fukuhara y col. *Bioquímica* 1(4): 563-568, 1962; y Xu y col. *Tetrahedron* 48(9): 1729-1740, 1992, cada uno de ellos es

Ácidos Nucleicos Modificados

La presente descripción proporciona ácidos nucleicos (o polinucleótidos), que incluyen ARN tales como ARNm que contienen uno o más nucleósidos modificados (denominados "ácidos nucleicos modificados") o nucleótidos como se describe en esta invención, que tienen propiedades útiles que incluyen la falta de una inducción sustancial de la respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el ARNm. Debido a que estos ácidos nucleicos modificados mejoran la eficiencia de la producción de proteínas, la retención intracelular de ácidos nucleicos y la viabilidad de las células en contacto, así como poseen inmunogenicidad reducida, estos ácidos nucleicos que tienen estas propiedades también se denominan "ácidos nucleicos mejorados" en esta invención.

Además, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos, que tienen una afinidad de unión disminuida a un surco principal que interactúa, por ejemplo, con un compañero de unión. Por ejemplo, los ácidos nucleicos están compuestos por al menos un nucleótido que ha sido modificado químicamente en la cara del surco principal como se describe en esta invención.

El término "ácido nucleico", en su sentido más amplio, incluye cualquier compuesto y/o sustancia que es o puede ser incorporada en una cadena de oligonucleótidos. En este contexto, el término ácido nucleico se utiliza como sinónimo de polinucleótido. Los ejemplos de ácidos nucleicos para su uso de acuerdo con la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, uno o más de ADN, ARN que incluye ARNm mensajero (ARNm), híbridos de estos, agentes inductores de iARN, agentes de iARN, ARNsi, ARNsh, ARNmi, ARN antisentido, ribozimas, ADN catalítico, ARN que inducen la formación de triple hélice, aptámeros, vectores, etc., descritos en detalle en esta invención.

Se proporcionan ácidos nucleicos modificados que contienen una región traducible y una, dos o más de dos modificaciones de nucleósidos diferentes. En algunas realizaciones, el ácido nucleico modificado presenta una degradación reducida en una célula en la que se introduce el ácido nucleico, con respecto a un ácido nucleico no modificado correspondiente. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos de treosa (TNA), ácidos nucleicos de glicol (GNA) o un híbrido de estos. En aspectos preferidos, el ácido nucleico modificado incluye ARN mensajeros (ARNm). Tal como se describe en esta invención, los ácidos nucleicos de la presente descripción no inducen sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el ARNm.

En determinados casos, es deseable degradar intracelularmente un ácido nucleico modificado introducido en la célula, por ejemplo, si se desea un momento preciso de la producción de proteínas. Por lo tanto, la presente descripción proporciona un ácido nucleico modificado que contiene un dominio de degradación, que es capaz de actuar de una manera dirigida dentro de una célula.

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

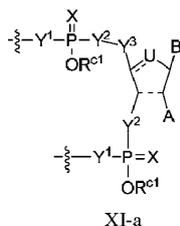
De manera adicional, se proporcionan ácidos nucleicos que contienen una o más secuencias de nucleótidos intrónicos que pueden extirparse del ácido nucleico.

Además, se proporcionan ácidos nucleicos que contienen un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES). Un IRES puede actuar como el único sitio de unión al ribosoma, o puede servir como uno de los múltiples sitios de unión al ribosoma de un ARNm. Un ARNm que contiene más de un sitio de unión al ribosoma funcional puede codificar varios péptidos o polipéptidos que se traducen independientemente por los ribosomas ("ARNm multicistrónico"). Cuando se proporcionan ácidos nucleicos con un IRES, opcionalmente se proporciona además una segunda región traducible. Los ejemplos de secuencias IRES que se pueden usar según la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, las de picornavirus (por ejemplo, FMDV), virus de plagas (CFFV), virus de la poliomieltitis (PV), virus de la

encefalomiocarditis (ECMV), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la peste porcina clásica (CSFV), virus de la leucemia murina (MLV), virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV) o virus de la parálisis del grillo (CrPV).

5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona secuencias de ácido nucleico que comprenden al menos dos nucleótidos, donde la secuencia de ácido nucleico comprende un nucleótido que interrumpe la unión de un compañero de unión de surco principal con la secuencia de ácido nucleico, donde el nucleótido tiene menor afinidad de unión al compañero de unión de surco principal.

10 En algunos casos, el ácido nucleico es un compuesto de Fórmula XI-a:



donde:

15



denota un doble enlace opcional;

20



denota un enlace sencillo opcional;

U es O, S, -NR^a- o -CR^aR^b- cuando

25



denota un enlace sencillo, o U es -CR^a- cuando

30



denota un enlace doble;

A es H, OH, fosforilo, pirofosfato, sulfato, -NH₂, -SH, un aminoácido, un péptido que comprende 2 a 12 aminoácidos;

35

X es O o S;

cada uno de Y¹ se selecciona independientemente de -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} y -SR^{a1};

40

cada uno de Y² e Y³ se selecciona independientemente de O, -CR^aR^b-, NR^c, S o un enlazador que comprende uno o más átomos seleccionados del grupo que consiste en C, O, N y S;

R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₁₂, alqueno C₂₋₁₂, alquino C₂₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀;

45

R^c es H, alquilo C₁₋₁₂, alqueno C₂₋₁₂, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol;

R^{a1} y R^{b1} son cada uno independientemente H o un contraión;

—OR^{c1} es OH a un pH de aproximadamente 1 o —OR^{c1} es O⁻ a pH fisiológico; y

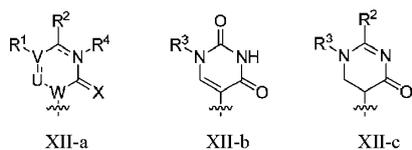
50

B es nucleobase;

siempre que el anillo que abarca las variables A, B, D, U, Z, Y² e Y³ no pueda ser ribosa.

55

En algunos casos, B es una nucleobase de Fórmula XII-a, XII-b o XII-c:



donde:

5 \equiv

denota un enlace simple o doble;

X es O o S;

10

U y W son cada uno independientemente C o N;

V es O, S, C o N;

15

donde cuando V es C, entonces R¹ es H, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₁₋₆, alquinilo C₁₋₆, halo u -OR^c, donde alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀ se sustituyen opcionalmente cada uno con -OH, -NR^aR^b, -SH, -C(O)R^c, -C(O)OR^c, -NHC(O)R^c, o -NHC(O)OR^c;

y donde cuando V es O, S o N, entonces R¹ está ausente;

20

R² es H, -OR^c, -SR^c, -NR^aR^b, o halo;

o cuando V es C entonces R¹ y R² junto con los átomos de carbono a los que están unidos pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados de halo, -OH, -SH, -NR^aR^b, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀, alcoxi C₁₋₂₀ o tioalquilo C₁₋₂₀;

25

R³ es H o alquilo C₁₋₂₀;

R⁴ es H o alquilo C₁₋₂₀; donde cuando

30 \equiv

denota un enlace doble entonces R⁴ está ausente, o N-R⁴, tomado en conjunto, forma un N con carga positiva sustituido con alquilo C₁₋₂₀;

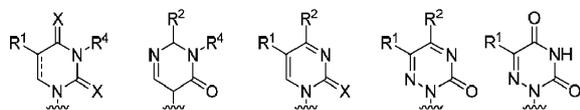
35

R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀ o arilo C₆₋₂₀; y

R^c es H, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol.

40

En algunos casos, B es una nucleobase de Fórmula XII-a1, XII-a2, XII-a3, XII-a4 o XII-a5:



XII-a1 XII-a2 XII-a3 XII-a4 XII-a5.

45

En algunos casos, la nucleobase es una pirimidina o un derivado de esta.

En algunos casos, el ácido nucleico contiene una pluralidad de compuestos estructuralmente únicos de la Fórmula XI-a.

50

En algunos casos, al menos el 25 % de las citosinas se reemplazan con un compuesto de Fórmula XI-a (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 100 %).

55

En algunos casos, al menos el 25 % de los uracilos se reemplazan con un compuesto de Fórmula XI-a (por ejemplo,

al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 100 %).

En algunos casos, al menos el 25 % de las citosinas y el 25 % de los uracilos se reemplazan con un compuesto de Fórmula XI-a (por ejemplo, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 100 %).

En algunos casos, el ácido nucleico es traducible.

En algunos casos, cuando el ácido nucleico incluye un nucleótido modificado con un enlazador y una carga útil, por ejemplo, como se describe en esta invención, el nucleótido modificado con un enlazador y una carga útil se encuentra en el extremo 3' del ácido nucleico.

Socios de interacción del surco principal

Tal como se describe en esta invención, la frase "socio de interacción del surco principal" se refiere a receptores de reconocimiento de ARN que detectan y responden a ligandos de ARN a través de interacciones, *por ejemplo*, unión, con la cara de surco principal de un nucleótido o ácido nucleico. Como tal, los ligandos de ARN que comprenden nucleótidos modificados o ácidos nucleicos como se describe en esta invención disminuyen las interacciones con los principales socios de unión al surco y, por lo tanto, disminuyen una respuesta inmunitaria innata, o la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias, o ambas.

Los ejemplos de compañeros que interactúan en el surco principal, *por ejemplo*, que se unen, incluyen, pero no se limitan a, las siguientes nucleasas y helicasas. Dentro de las membranas, los TLR (receptores tipo Toll) 3, 7 y 8 pueden responder a ARN de cadena simple y doble. Dentro del citoplasma, los miembros de la superfamilia 2 de helicasas y ATPasas DEX(D/H) pueden detectar ARN para iniciar respuestas antivirales. Estas helicasas incluyen el RIG-I (gen I de ácido etinoico-inducible) y MDA5 (gen asociado de diferenciación de melanoma 5). Otros ejemplos incluyen el laboratorio de genética y fisiología 2 (LGP2), proteínas que contienen el dominio HIN-200 o proteínas que contienen el dominio Helicasa.

Prevención o reducción de la respuesta inmune celular innata

El término "respuesta inmunitaria innata" incluye una respuesta celular a ácidos nucleicos monocatenarios exógenos, generalmente de origen viral o bacteriano, que implica la inducción de la expresión y liberación de citocinas, particularmente los interferones, y la muerte celular. La síntesis de proteínas también se reduce durante la respuesta inmune celular innata. Aunque es ventajoso eliminar la respuesta inmunitaria innata en una célula que se activa mediante la introducción de ácidos nucleicos exógenos, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos modificados tales como ARNm que reducen sustancialmente la respuesta inmunitaria, incluida la señalización de interferón, sin eliminar completamente dicha respuesta. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99,9 % o más del 99,9 % en comparación con la respuesta inmunitaria inducida por un ácido nucleico no modificado correspondiente. Tal reducción se puede medir mediante la expresión o el nivel de actividad de los interferones de tipo 1 o la expresión de genes regulados por interferón, tales como los receptores tipo Toll (*p. ej.*, TLR7 y TLR8). La reducción o falta de inducción de la respuesta inmunitaria innata también se puede medir mediante la disminución de la muerte celular después de una o más administraciones de ARN modificados a una población celular; *por ejemplo*, la muerte celular es un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de un 95 % menor que la frecuencia de muerte celular observada con un ácido nucleico no modificado correspondiente. Además, la muerte celular puede afectar a menos del 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 % o menos del 0,01 % de las células en contacto con los ácidos nucleicos modificados.

En algunos casos, los ácidos nucleicos modificados, que incluyen polinucleótidos y/o moléculas de ARNm se modifican de tal manera que no inducen, o inducen solo mínimamente, una respuesta inmunitaria por parte de la célula u organismo receptor. Tal evasión o evitación de un accionador o activación de respuesta inmunitaria es una característica novedosa de los polinucleótidos modificados de la presente descripción.

La presente descripción proporciona la introducción repetida (*p. ej.*, transfección) de ácidos nucleicos modificados en una población de células diana, *p. ej.*, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La etapa de poner en contacto la población celular se puede repetir una o más veces (tal como dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco veces). En algunos casos, la etapa de poner en contacto la población celular con los ácidos nucleicos modificados se repite una cantidad de veces suficiente de modo que se logre una eficiencia predeterminada de traducción de proteínas en la población celular.

Dada la citotoxicidad reducida de la población de células diana proporcionada por las modificaciones de ácido nucleico, tales transfecciones repetidas son alcanzables en un conjunto diverso de tipos de células *in vitro* y/o *in vivo*.

Variantes de polipéptidos

5 Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican polipéptidos variantes, que tienen una cierta identidad con una secuencia de polipéptidos de referencia. El término "identidad" como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más péptidos, como se determina mediante la comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre péptidos, como se determina por la cantidad de coincidencias entre cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. "Identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si las hay) dirigidas por un modelo matemático o programa informático particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de los péptidos relacionados se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en 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; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, HG, eds. Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo y col., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 1988 .

20 En algunos casos, la variante de polipéptido tiene la misma actividad o una actividad similar que el polipéptido de referencia. De manera alternativa, la variante tiene una actividad alterada (*p. ej.*, aumentada o disminuida) con respecto a un polipéptido de referencia. Generalmente, las variantes de un polinucleótido o polipéptido particular de la presente descripción tendrán al menos aproximadamente el 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con ese polinucleótido o polipéptido de referencia particular según lo determinado por los programas y parámetros de alineación de secuencia descritos en esta invención y conocidos por los expertos en la materia.

30 Tal como lo reconocen los expertos en la materia, los fragmentos de proteínas, los dominios de proteínas funcionales y las proteínas homólogas también se consideran dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, en esta invención se proporciona cualquier fragmento de proteína de una proteína de referencia (lo que significa una secuencia de polipéptidos al menos un residuo de aminoácido más corto que una secuencia de polipéptidos de referencia pero de otro modo idéntica) 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más de 100 aminoácidos de longitud. En otro ejemplo, cualquier proteína que incluye una extensión de aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50 o aproximadamente 100 aminoácidos que son aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 100 % idénticas a cualquiera de las secuencias descritas en esta invención se puede utilizar de acuerdo con la presente descripción. En determinados casos, una secuencia de proteína que se utilizará de acuerdo con la presente descripción incluye 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mutaciones como se muestra en cualquiera de las secuencias proporcionadas o a las que se hace referencia en esta invención.

Bibliotecas de polipéptidos

45 También se proporcionan bibliotecas de polinucleótidos que contienen modificaciones de nucleósidos, donde los polinucleótidos contienen individualmente una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, tal como un anticuerpo, socio de unión a proteína, proteína de andamio y otros polipéptidos conocidos en la técnica. Preferentemente, los polinucleótidos son ARNm en una forma adecuada para la introducción directa en un huésped celular diana, que a su vez sintetiza el polipéptido codificado.

50 En determinados casos, se producen y analizan múltiples variantes de una proteína, cada una con diferentes modificaciones de aminoácidos, para determinar la mejor variante en términos de farmacocinética, estabilidad, biocompatibilidad y/o actividad biológica, o una propiedad biofísica tal como el nivel de expresión. Tal biblioteca puede contener 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ o más de 10⁹ posibles variantes (que incluyen sustituciones, eliminaciones de uno o más residuos e inserción de uno o más residuos).

Complejos de polipéptido y ácido nucleico

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

65

Ácidos nucleicos modificados no traducibles

Tal como se describe en esta invención, se proporcionan ARNm que tienen secuencias que no son sustancialmente traducibles. Dicho ARNm es eficaz como una vacuna cuando se administra a un sujeto mamífero.

También se proporcionan ácidos nucleicos modificados que contienen una o más regiones no codificantes. Tales ácidos nucleicos modificados generalmente no se traducen, pero son capaces de unirse y aislar uno o más componentes de maquinaria de traducción tales como una proteína ribosómica o un ARN de transferencia (ARNt), reduciendo así eficazmente la expresión de proteínas en la célula. El ácido nucleico modificado puede contener un ARN nucleolar pequeño (ARN-sno), microARN (ARNmi), ARN interferente pequeño (ARNsi) o ARN que interactúa con Piwi (ARNpi).

Síntesis de ácidos nucleicos modificados

Los ácidos nucleicos para su uso de acuerdo con la presente descripción se pueden preparar de acuerdo con cualquier técnica disponible que incluye, pero no se limita a, síntesis química, síntesis enzimática, que generalmente se denomina transcripción *in vitro*, escisión enzimática o química de un precursor más largo, etc. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar ARN (véase, por ejemplo, Gait, M.J. (ed.) Síntesis de oligonucleótidos: una estrategia práctica, Oxford [Oxfordshire], Washington, DC: IRL Press, 1984; y Herdewijn, P. (ed.) Síntesis de oligonucleótidos: procedimientos y aplicaciones, Procedimientos en la biología molecular, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005

Los ácidos nucleicos modificados no necesitan modificarse uniformemente a lo largo de toda la longitud de la molécula. Pueden existir diferentes modificaciones de nucleótidos y/o estructuras de estructura principal en diversas posiciones en el ácido nucleico. Un experto en la materia apreciará que los análogos de nucleótidos u otras modificaciones se pueden ubicar en cualquier posición o posiciones de un ácido nucleico de modo que la función del ácido nucleico no disminuya sustancialmente. Una modificación también puede ser una modificación de terminal 5' o 3'. Los ácidos nucleicos pueden contener como mínimo uno y como máximo el 100 % de nucleótidos modificados, o cualquier porcentaje intermedio, tal como al menos el 5 % de nucleótidos modificados, al menos el 10 % de nucleótidos modificados, al menos el 25 % de nucleótidos modificados, al menos el 50 % de nucleótidos modificados, al menos el 80 % de nucleótidos modificados o al menos el 90 % de nucleótidos modificados. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden contener una pirimidina modificada tal como uracilo o citosina. En algunos casos, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % del uracilo en el ácido nucleico se reemplaza con un uracilo modificado. El uracilo modificado puede reemplazarse por un compuesto que tiene una única estructura, o puede reemplazarse por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas). En algunos casos, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % de la citosina en el ácido nucleico se reemplaza con una citosina modificada. La citosina modificada puede reemplazarse por un compuesto que tiene una única estructura, o puede reemplazarse por una pluralidad de compuestos que tienen diferentes estructuras (por ejemplo, 2, 3, 4 o más estructuras únicas).

Generalmente, la longitud más corta de un ARNm modificado de la presente descripción puede ser la longitud de una secuencia de ARNm que es suficiente para codificar un dipéptido. En otro caso, la longitud de la secuencia de ARNm es suficiente para codificar un tripéptido. En otro, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un tetrapéptido. En otro caso, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un pentapéptido. En otro caso, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un hexapéptido. En otro caso, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un heptapéptido. En otro caso, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un octapéptido. En otro caso, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un nonapéptido. En otro caso, la longitud de una secuencia de ARNm es suficiente para codificar un decapéptido.

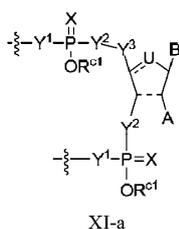
Los ejemplos de dipéptidos que las secuencias de ácido nucleico modificado pueden codificar incluyen, pero no se limitan a, carnosina y anserina.

En un caso adicional, el ARNm tiene más de 30 nucleótidos de longitud. En otro caso, la molécula de ARN tiene más de 35 nucleótidos de longitud. En otro, la longitud es de al menos 40 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 45 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 55 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 60 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 80 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 90 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 100 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 120 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 140 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 160 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 180 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 200 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 250 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 300 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 350 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 400 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 450 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 500 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 600 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 700 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 800 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 900 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1000 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1100 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al

menos 1200 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1300 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1400 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1500 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1600 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 1800 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 2000 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 2500 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 3000 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 4000 nucleótidos. En otro caso, la longitud es de al menos 5000 nucleótidos, o mayor que 5000 nucleótidos.

Por ejemplo, los ácidos nucleicos modificados descritos en esta invención se pueden preparar usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia de síntesis de ácidos nucleicos.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona procedimientos, por ejemplo, enzimáticos, para preparar una secuencia de ácido nucleico que comprende un nucleótido que interrumpe la unión de un socio de unión de surco principal con la secuencia de ácido nucleico, donde la secuencia de ácido nucleico comprende un compuesto de Fórmula XI-a:



donde:

el nucleótido tiene una afinidad de unión disminuida al socio de unión de surco principal;



denota un doble enlace opcional;



denota un enlace sencillo opcional;

U es O, S, -NR^a- o -CR^aR^b- cuando



denota un enlace sencillo, o U es -CR^a- cuando



denota un enlace doble;

A es H, OH, fosforilo, pirofosfato, sulfato, -NH₂, -SH, un aminoácido, un péptido que comprende 2 a 12 aminoácidos;

X es O o S;

cada uno de Y¹ se selecciona independientemente de —OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} y —SR^{a1};

cada uno de Y² e Y³ se selecciona independientemente de O, -CR^aR^b-, NR^c, S o un enlazador que comprende uno o más átomos seleccionados del grupo que consiste en C, O, N y S;

R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₁₂, alqueno C₂₋₁₂, alquino C₂₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀;

R^c es H, alquilo C₁₋₁₂, alqueno C₂₋₁₂, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol;

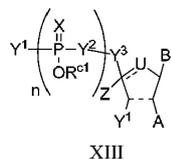
R^{a1} y R^{b1} son cada uno independientemente H o un contraión;

—OR^{c1} es OH a un pH de aproximadamente 1 o —OR^{c1} es O⁻ a pH fisiológico; y

B es nucleobase;

siempre que el anillo que comprende las variables A, B, D, U, Z, Y² e Y³ no pueda ser ribosa, el procedimiento comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula XIII:

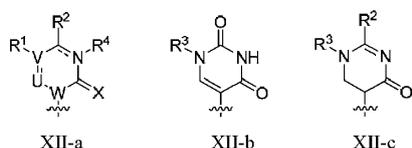
5



con una polimerasa de ARN y una plantilla de ADNc.

10 En algunos casos, la reacción se repite de 1 a aproximadamente 7.000 veces.

En algunos casos, B es una nucleobase de Fórmula XII-a, XII-b o XII-c:



15

donde:



20 denota un enlace simple o doble;

X es O o S;

U y W son cada uno independientemente C o N;

25

V es O, S, C o N;

donde cuando V es C, entonces R¹ es H, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₁₋₆, alquinilo C₁₋₆, halo u —OR^c, donde alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀ se sustituyen opcionalmente cada uno con —OH, —NR^aR^b, —SH, —C(O)R^c, —C(O)OR^c, —NHC(O)R^c, o —NHC(O)OR^c;

30

y donde cuando V es O, S o N, entonces R¹ está ausente;

R² es H, —OR^c, —SR^c, —NR^aR^b, o halo;

35

o cuando V es C entonces R¹ y R² junto con los átomos de carbono a los que están unidos pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados de halo, —OH, —SH, —NR^aR^b, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀, alcoxi C₁₋₂₀ o tioalquilo C₁₋₂₀;

40 R³ es H o alquilo C₁₋₂₀;

R⁴ es H o alquilo C₁₋₂₀; donde cuando



45

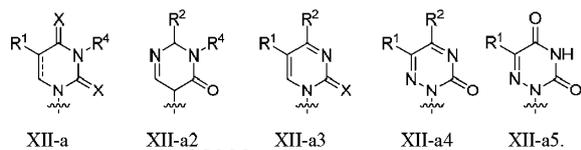
denota un enlace doble entonces R⁴ está ausente, o N-R⁴, tomado en conjunto, forma un N con carga positiva sustituido con alquilo C₁₋₂₀;

R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀ o arilo C₆₋₂₀; y

50

R^c es H, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol.

En algunos casos, B es una nucleobase de Fórmula XII-a1, XII-a2, XII-a3, XII-a4 o XII-a5:



En algunos casos, los procedimientos comprenden además un nucleótido que se selecciona del grupo que consiste en adenosina, citosina, guanosina y uracilo.

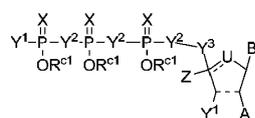
5

En algunos casos, la nucleobase es una pirimidina o un derivado de esta.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona procedimientos para amplificar una secuencia de ácido nucleico que comprende un nucleótido que interrumpe la unión de un socio de unión de surco principal con la secuencia de ácido nucleico, donde el procedimiento comprende:

10

hacer reaccionar un compuesto de Fórmula XI-d:



XI-d

15

donde:

el nucleótido tiene una afinidad de unión disminuida al socio de unión de surco principal;

20



denota un enlace simple o doble;

--- denota un enlace sencillo opcional;

25

U es O, S, -NR^a- o -CR^aR^b- cuando



30

denota un enlace sencillo, o U es -CR^a- cuando



denota un enlace doble;

35

Z es H, alquilo C₁₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀, o Z está ausente cuando



40

denota un enlace doble; y

Z puede ser -CR^aR^b- y formar un enlace con A;

45

A es H, OH, fosforilo, pirofosfato, sulfato, -NH₂, -SH, un aminoácido o un péptido que comprende 1 a 12 aminoácidos;

X es O o S;

cada uno de Y¹ se selecciona independientemente de —OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} y —SR^{a1};

50

cada uno de Y² e Y³ se selecciona independientemente de O, -CR^aR^b-, NR^c, S o un enlazador que comprende uno o más átomos seleccionados del grupo que consiste en C, O, N y S;

n es 0, 1, 2, o 3;

m es 0, 1, 2 o 3;

55

B es nucleobase;

R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, alquinilo C₂₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀,

5 R^c es H, alquilo C₁₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol;

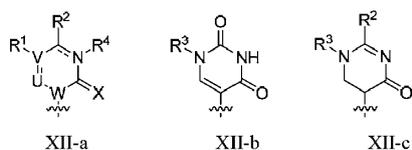
R^{a1} y R^{b1} son cada uno independientemente H o un contraión; y

—OR^{c1} es OH a un pH de aproximadamente 1 o —OR^{c1} es O⁻ a pH fisiológico;

10 siempre que el anillo que abarca las variables A, B, D, U, Z, Y² e Y³ no pueda ser ribosa con un cebador, una plantilla de ADNc y una polimerasa de ARN.

En algunos casos, B es una nucleobase de Fórmula XII-a, XII-b o XII-c:

15



donde:

20



denota un enlace simple o doble;

X es O o S;

25

U y W son cada uno independientemente C o N;

V es O, S, C o N;

30 donde cuando V es C, entonces R¹ es H, alquilo C₁₋₆, alquenilo C₁₋₆, alquinilo C₁₋₆, halo u —OR^c, donde alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀ se sustituyen opcionalmente cada uno con —OH, —NR^aR^b, —SH, —C(O)R^c, —C(O)OR^c, —NHC(O)R^c, o —NHC(O)OR^c;

y donde cuando V es O, S o N, entonces R¹ está ausente;

35

R² es H, —OR^c, —SR^c, —NR^aR^b, o halo;

o cuando V es C entonces R¹ y R² junto con los átomos de carbono a los que están unidos pueden formar un anillo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con 1-4 sustituyentes seleccionados de halo, —OH, —SH, —NR^aR^b, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀, alcoxi C₁₋₂₀ o tioalquilo C₁₋₂₀;

40

R³ es H o alquilo C₁₋₂₀;

R⁴ es H o alquilo C₁₋₂₀; donde cuando

45



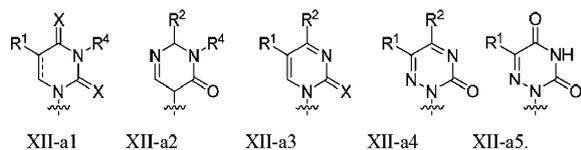
denota un enlace doble entonces R⁴ está ausente, o N-R⁴, tomado en conjunto, forma un N con carga positiva sustituido con alquilo C₁₋₂₀;

50

R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, alquinilo C₂₋₂₀ o arilo C₆₋₂₀; y

R^c es H, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₂₀, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol.

55 En algunos casos, B es una nucleobase de Fórmula XII-a1, XII-a2, XII-a3, XII-a4 o XII-a5:



En algunos casos, los procedimientos comprenden además un nucleótido que se selecciona del grupo que consiste en adenosina, citosina, guanosina y uracilo.

5

En algunos casos, la nucleobase es una pirimidina o un derivado de esta.

En algunos casos, la presente descripción proporciona procedimientos para sintetizar un ácido nucleico farmacéutico, que comprenden las etapas de:

10

1. a) proporcionar un ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) que codifica una proteína farmacéutica de interés;

15

2. b) seleccionar un nucleótido que se sabe que interrumpe una unión de un socio de unión al surco principal con un ácido nucleico, donde el nucleótido tiene una afinidad de unión disminuida con el socio de unión al surco principal; y

3. c) poner en contacto el ADNc proporcionado y el nucleótido seleccionado con una ARN polimerasa, en condiciones tales que el ácido nucleico farmacéutico se sintetice.

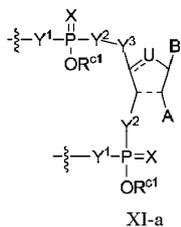
20

En aspectos adicionales, el ácido nucleico farmacéutico es un ácido ribonucleico (ARN).

En aun un aspecto adicional de la presente descripción, los ácidos nucleicos modificados se pueden preparar usando procedimientos de síntesis de fase sólida.

25

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona procedimientos para sintetizar un ácido nucleico que comprende un compuesto de Fórmula XI-a:



30 donde:



denota un doble enlace opcional;

35

--- denota un enlace sencillo opcional;

U es O, S, -NR^a- o -CR^aR^b- cuando

40



denota un enlace sencillo, o U es -CR^a- cuando



45

denota un enlace doble;

A es H, OH, fosforilo, pirofosfato, sulfato, -NH₂, -SH, un aminoácido, un péptido que comprende 2 a 12 aminoácidos;

50

X es O o S;

cada uno de Y¹ se selecciona independientemente de -OR^{a1}, -NR^{a1}R^{b1} y -SR^{a1};

cada uno de Y² e Y³ se selecciona independientemente de O, -CR^a R^b-, NR^c, S o un enlazador que comprende uno o más átomos seleccionados del grupo que consiste en C, O, N y S;

R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₁₂, alqueno C₂₋₁₂, alquino C₂₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀;

R^c es H, alquilo C₁₋₁₂, alqueno C₂₋₁₂, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol;

R^{a1} y R^{b1} son cada uno independientemente H o un contraión;

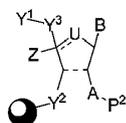
—OR^{c1} es OH a un pH de aproximadamente 1 o —OR^{c1} es O⁻ a pH fisiológico; y

B es nucleobase;

siempre que el anillo que abarca las variables A, B, U, Z, Y² e Y³ no pueda ser ribosa;

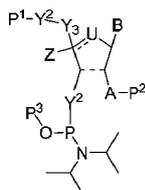
que comprende:

1. a) hacer reaccionar un nucleótido de Fórmula XIII-a:



XIII-a

con un compuesto de fosforamidita de Fórmula XIII-b:



XXIII-b

donde:

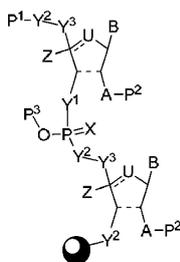


denota un soporte sólido; y

P¹, P² y P³ son cada uno independientemente grupos protectores adecuados;

para proporcionar un ácido nucleico de Fórmula XIV-a:

XIV-a y b) oxidar o sulfurar el ácido nucleico de Fórmula XIV-a para proporcionar un ácido nucleico de Fórmula XIVb:

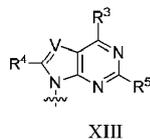


XIV-b

y c) retirar los grupos protectores para proporcionar el ácido nucleico de la Fórmula XI-a.

En algunos casos, los procedimientos comprenden además un nucleótido que se selecciona del grupo que consiste en adenosina, citosina, guanosina y uracilo.

En algunos casos, B es una nucleobase de Fórmula XIII:



5

donde:

V es N o NR^c cargado positivamente;

10 R³ es NR^cR^d, -OR^a o -SR^a;

R⁴ es H u opcionalmente puede formar un enlace con Y³;

15 R⁵ es H, -NR^cR^d o -OR^a;

R^a y R^b son cada uno independientemente H, alquilo C₁₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, alquinilo C₂₋₁₂ o arilo C₆₋₂₀; y

R^c es H, alquilo C₁₋₁₂, alquenilo C₂₋₁₂, fenilo, bencilo, un grupo polietilenglicol o un grupo amino-polietilenglicol.

20 En algunos casos, las etapas a) y b) se repiten de 1 a aproximadamente 10.000 veces.

Usos de los ácidos nucleicos modificados

Agentes terapéuticos

25

Los ácidos nucleicos modificados descritos en esta invención se pueden utilizar como agentes terapéuticos. Por ejemplo, un ácido nucleico modificado descrito en esta invención se puede administrar a un animal o sujeto, donde el ácido nucleico modificado se traduce *in vivo* para producir un péptido terapéutico en el animal o sujeto. Por consiguiente, en esta invención se proporcionan composiciones, procedimientos, kits y reactivos para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones en humanos y otros mamíferos. Los agentes terapéuticos activos de la presente descripción incluyen ácidos nucleicos modificados, células que contienen ácidos nucleicos modificados o polipéptidos traducidos de los ácidos nucleicos modificados, polipéptidos traducidos de ácidos nucleicos modificados, células en contacto con células que contienen ácidos nucleicos modificados o polipéptidos traducidos de los ácidos nucleicos modificados, tejidos que contienen células que contienen ácidos nucleicos modificados y órganos que contienen tejidos que contienen células que contienen ácidos nucleicos modificados.

35

Se proporcionan procedimientos para inducir la traducción de un polinucleótido sintético o recombinante para producir un polipéptido en una población celular usando los ácidos nucleicos modificados descritos en esta invención. Dicha traducción puede ser *in vivo*, *ex vivo*, *en cultivo* o *in vitro*. La población celular se pone en contacto con una cantidad eficaz de una composición que contiene un ácido nucleico que tiene al menos una modificación de nucleósido, y una región traducible que codifica el polipéptido. La población se pone en contacto en condiciones tales que el ácido nucleico se localiza en una o más células de la población celular y el polipéptido recombinante se traduce en la célula a partir del ácido nucleico.

40

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

50

Los aspectos de la presente descripción se refieren a procedimientos para inducir la traducción *in vivo* de un polipéptido recombinante en un sujeto mamífero que lo necesita. En esta, una cantidad eficaz de una composición que contiene un ácido nucleico que tiene al menos una modificación de nucleósido y una región traducible que codifica el polipéptido se administra al sujeto usando los procedimientos de administración descritos en esta invención. El ácido nucleico se proporciona en una cantidad y en otras condiciones, de modo que el ácido nucleico se localiza en una célula o células del sujeto y el polipéptido recombinante se traduce en la célula a partir del ácido nucleico. La célula en la que se localiza el ácido nucleico, o el tejido en el que está presente la célula, puede dirigirse con una o más rondas de administración de ácido nucleico.

55

60

Otros aspectos de la presente descripción se refieren al trasplante de células que contienen ácidos nucleicos modificados a un sujeto mamífero. La administración de células a sujetos mamíferos es conocida por los expertos en la materia, tal como implantación local (*por ejemplo*, administración tópica o subcutánea), administración de órganos o inyección sistémica (*por ejemplo*, inyección o inhalación intravenosa), al igual que la formulación de células en portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que contienen ácidos nucleicos modificados se formulan para administración intramuscular, transarterial, intraperitoneal, intravenosa, intranasal, subcutánea, endoscópica, transdérmica o intratecal. En algunas realizaciones, la composición se formula para liberación prolongada.

El sujeto al que se administra el agente terapéutico padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección deletérea. Se proporcionan procedimientos para identificar, diagnosticar y clasificar sujetos en estas bases, que pueden incluir diagnóstico clínico, niveles de biomarcadores, estudios de asociación de todo el genoma (GWAS, por sus siglas en inglés) y otros procedimientos conocidos en la técnica.

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

En otros casos, el ácido nucleico modificado administrado dirige la producción de uno o más polipéptidos recombinantes que reemplazan un polipéptido (o múltiples polipéptidos) que está sustancialmente ausente en la célula en la que se traduce el polipéptido recombinante. Tal ausencia puede deberse a la mutación genética del gen codificador o vía reguladora de este. En otros casos, el ácido nucleico modificado administrado dirige la producción de uno o más polipéptidos recombinantes para complementar la cantidad de polipéptido (o múltiples polipéptidos) que está presente en la célula en la que se traduce el polipéptido recombinante. Alternativamente, el polipéptido recombinante funciona para antagonizar la actividad de una proteína endógena presente en, en la superficie de, o secretada de la célula. Por lo general, la actividad de la proteína endógena es perjudicial para el sujeto, por ejemplo, debido a la mutación de la proteína endógena que resulta en una actividad o localización alterada. Adicionalmente, el polipéptido recombinante antagoniza, directa o indirectamente, la actividad de un resto biológico presente en, en la superficie de, o secretado de la célula. Los ejemplos de restos biológicos antagonizados incluyen lípidos (*p. ej.*, colesterol), una lipoproteína (*p. ej.*, lipoproteína de baja densidad), un ácido nucleico, un carbohidrato o una toxina de molécula pequeña.

Las proteínas recombinantes descritas en esta invención se modifican genéticamente para su localización dentro de la célula, potencialmente dentro de un compartimento específico tal como el núcleo, o se modifican genéticamente para su secreción desde la célula o translocación a la membrana plasmática de la célula.

Tal como se describe en esta invención, una característica útil de los ácidos nucleicos modificados de la presente descripción es la capacidad de reducir, evadir, evitar o eliminar la respuesta inmunitaria innata de una célula a un ácido nucleico exógeno. Se proporcionan procedimientos para realizar la titulación, reducción o eliminación de la respuesta inmunitaria en una célula o una población de células. En algunos casos, la célula se pone en contacto con una primera composición que contiene una primera dosis de un primer ácido nucleico exógeno que incluye una región traducible y al menos una modificación de nucleósido, y se determina el nivel de la respuesta inmunitaria innata de la célula al primer ácido nucleico exógeno. Posteriormente, la célula se pone en contacto con una segunda composición, que incluye una segunda dosis del primer ácido nucleico exógeno, conteniendo la segunda dosis una cantidad menor del primer ácido nucleico exógeno en comparación con la primera dosis. Alternativamente, la célula se pone en contacto con una primera dosis de un segundo ácido nucleico exógeno. El segundo ácido nucleico exógeno puede contener uno o más nucleósidos modificados, que pueden ser iguales o diferentes del primer ácido nucleico exógeno o, alternativamente, el segundo ácido nucleico exógeno puede no contener nucleósidos modificados. Las etapas de poner en contacto la célula con la primera composición y/o la segunda composición se pueden repetir una o más veces. Además, la eficiencia de la producción de proteínas (*p. ej.*, traducción de proteínas) en la célula se determina opcionalmente y la célula se puede volver a transfectar con la primera y/o segunda composición repetidamente hasta que se logre una eficiencia de producción de proteínas diana.

55 **Terapéutica para enfermedades y afecciones**

Se proporcionan procedimientos para tratar o prevenir un síntoma de enfermedades caracterizadas por una actividad proteica que falta o aberrante, mediante el reemplazo de la actividad proteica que falta o la superación de la actividad proteica aberrante. Debido al rápido inicio de la producción de proteínas después de la introducción de ARNm modificados, en comparación con los vectores de ADN viral, los compuestos de la presente descripción son particularmente ventajosos en el tratamiento de enfermedades agudas tales como sepsis, accidente cerebrovascular e infarto de miocardio. Además, la falta de regulación transcripcional de los ARNm modificados de la presente descripción es ventajosa porque se puede lograr una titulación precisa de la producción de proteínas. Múltiples enfermedades se caracterizan por omitir (o disminuir sustancialmente de tal manera que no se produzca la función proteica adecuada) la actividad proteica. Tales proteínas pueden no estar presentes, están presentes en cantidades muy bajas o son esencialmente no funcionales. La presente descripción proporciona un procedimiento para tratar tales

afecciones o enfermedades en un sujeto mediante la introducción de ácido nucleico o productos terapéuticos basados en células que contienen los ácidos nucleicos modificados proporcionados en esta invención, donde los ácidos nucleicos modificados codifican para una proteína que reemplaza la actividad proteica que falta en las células diana del sujeto.

5 Las enfermedades caracterizadas por actividad proteica disfuncional o aberrante incluyen, pero no se limitan a, cáncer y enfermedades proliferativas, enfermedades genéticas (*p. ej.*, fibrosis quística), enfermedades autoinmunitarias, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas. La presente descripción proporciona un procedimiento para tratar tales afecciones o enfermedades en un sujeto mediante la introducción de ácido nucleico o productos terapéuticos basados en células que contienen los ácidos nucleicos modificados proporcionados en esta invención, donde los ácidos nucleicos modificados codifican para una proteína que antagoniza o supera de otro modo la actividad de proteína aberrante presente en la célula del sujeto.

10 Los ejemplos específicos de una proteína disfuncional son las variantes de mutación sin sentido o sin sentido del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que producen una variante de proteína disfuncional o no funcional, respectivamente, de la proteína CFTR, que causa fibrosis quística.

15 Por lo tanto, se proporcionan procedimientos para tratar la fibrosis quística en un sujeto mamífero al poner en contacto una célula del sujeto con un ácido nucleico modificado que tiene una región traducible que codifica un polipéptido CFTR funcional, en condiciones tales que una cantidad eficaz del polipéptido CFTR está presente en la célula. Las células diana preferidas son células epiteliales, tales como el pulmón, y los procedimientos de administración se determinan en vista del tejido diana; es decir, para la administración pulmonar, las moléculas de ARN se formulan para la administración por inhalación.

20 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar la hiperlipidemia en un sujeto, mediante la introducción en una población celular del sujeto con una molécula de ARNm modificado que codifica sortilina, una proteína caracterizada recientemente por estudios genómicos, mejorando así la hiperlipidemia en un sujeto. El gen *SORT1* codifica una proteína transmembrana de la red trans-Golgi (TGN) llamada sortilina. Los estudios genéticos han demostrado que uno de los cinco individuos tiene un polimorfismo de un solo nucleótido, rs12740374, en el locus 1p13 del gen *SORT1* que los predispone a tener niveles bajos de lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Cada copia del alelo menor, presente en aproximadamente el 30 % de las personas, altera el colesterol LDL en 8 mg/dL, mientras que dos copias del alelo menor, presentes en aproximadamente el 5 % de la población, disminuye el colesterol LDL 16 mg/dL. También se ha demostrado que los portadores del alelo menor tienen un 40 % menos de riesgo de infarto de miocardio. Los estudios funcionales *in vivo* en ratones describen que la sobreexpresión de *SORT1* en el tejido hepático de ratón condujo a niveles significativamente más bajos de colesterol LDL, hasta un 80 % más bajos, y que el silenciamiento de *SORT1* aumentó el colesterol LDL aproximadamente un 200 % (Musunuru K y col. De la variante no codificante al fenotipo a través de *SORT1* en el locus de colesterol 1p13. *Nature* 2010; 466: 714-721).

40 **Procedimientos de administración de ácido nucleico celular**

Los procedimientos de la presente descripción mejoran la administración de ácido nucleico en una población celular, *in vivo*, *ex vivo* o *en cultivo*. Por ejemplo, un cultivo celular que contiene una pluralidad de células huésped (por *ejemplo*, células eucariotas tales como células de levadura o de mamífero) se pone en contacto con una composición que contiene un ácido nucleico mejorado que tiene al menos una modificación de nucleósido y, opcionalmente, una región traducible. La composición también contiene generalmente un reactivo de transfección u otro compuesto que aumenta la eficiencia de la absorción de ácido nucleico mejorada en las células huésped. El ácido nucleico mejorado exhibe una retención mejorada en la población celular, con respecto a un ácido nucleico no modificado correspondiente. La retención del ácido nucleico mejorado es mayor que la retención del ácido nucleico no modificado. En algunos casos, es al menos aproximadamente el 50 %, 75 %, 90 %, 95 %, 100 %, 150 %, 200 % o más del 200 % mayor que la retención del ácido nucleico no modificado. Dicha ventaja de retención puede lograrse mediante una ronda de transfección con el ácido nucleico mejorado, o puede obtenerse después de rondas repetidas de transfección.

55 En algunos casos, el ácido nucleico mejorado se administra a una población de células diana con uno o más ácidos nucleicos adicionales. Dicha administración puede ser al mismo tiempo, o el ácido nucleico mejorado se administra antes de la administración del uno o más ácidos nucleicos adicionales. El uno o más ácidos nucleicos adicionales pueden ser ácidos nucleicos modificados o ácidos nucleicos no modificados. Se entiende que la presencia inicial de los ácidos nucleicos mejorados no induce sustancialmente una respuesta inmunitaria innata de la población celular y, además, que la respuesta inmunitaria innata no se activará por la presencia posterior de los ácidos nucleicos no modificados. En este sentido, el ácido nucleico mejorado puede no contener en sí mismo una región traducible, si la proteína deseada para estar presente en la población de células diana se traduce a partir de los ácidos nucleicos no modificados.

60 **Residuos diana**

65 En aspectos de la presente descripción, se proporcionan ácidos nucleicos modificados para expresar un socio de

unión a proteínas o un receptor en la superficie de la célula, que funciona para dirigir la célula a un espacio tisular específico o para interactuar con un resto específico, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Los socios de unión a proteínas adecuados incluyen anticuerpos y fragmentos funcionales de estos, proteínas de andamio o péptidos. Adicionalmente, se pueden emplear ácidos nucleicos modificados para dirigir la síntesis y localización extracelular de lípidos, carbohidratos u otros restos biológicos.

Silenciamiento permanente de la expresión génica

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

Administración de un agente terapéutico o detectable a una diana biológica

Los nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados descritos en esta invención se pueden utilizar en una cantidad de escenarios diferentes en los que se desea la administración de una sustancia (la "carga útil") a una diana biológica, por ejemplo, la administración de sustancias detectables para la detección de la diana o la administración de un agente terapéutico. Los procedimientos de detección pueden incluir procedimientos de imagenología *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, inmunohistoquímica, imagenología por bioluminiscencia (BLI, por sus siglas en inglés), imagenología por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica, tomografía computarizada por rayos X, imagenología Raman, tomografía por coherencia óptica, imagenología por absorción, imagenología térmica, imagenología por reflectancia de fluorescencia, microscopía por fluorescencia, imagenología por tomografía molecular de fluorescencia, imagenología por resonancia magnética nuclear, imagenología por rayos X, imagenología por ultrasonido, imagenología fotoacústica, ensayos de laboratorio o en cualquier situación donde se requiera marcaje/tinción/imagenología.

Por ejemplo, los nucleósidos modificados, los nucleótidos modificados y los ácidos nucleicos modificados descritos en esta invención se pueden utilizar en la reprogramación de células madre pluripotentes inducidas (células iPS), que se pueden utilizar a continuación para rastrear directamente las células que se transfectan en comparación con las células totales en el grupo. En otro ejemplo, se puede usar un fármaco que está unido al ácido nucleico modificado a través de un enlazador y está marcado de forma fluorescente para rastrear el fármaco *in vivo*, por ejemplo, intracelularmente. Otros ejemplos incluyen el uso de un ácido nucleico modificado en la administración reversible de fármacos en células.

Los nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados descritos en esta invención se pueden utilizar en el direccionamiento intracelular de una carga útil, por ejemplo, agente detectable o terapéutico, a un orgánulo específico. Los ejemplos de dianas intracelulares pueden incluir la localización nuclear para el procesamiento avanzado de ARNm, o una secuencia de localización nuclear (NLS) unida al ARNm que contiene un inhibidor.

Además, los nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados descritos en esta invención se pueden utilizar para administrar agentes terapéuticos a células o tejidos, por ejemplo, en animales vivos. Por ejemplo, los nucleósidos modificados, los nucleótidos modificados y los ácidos nucleicos modificados descritos en esta invención se pueden utilizar para administrar agentes quimioterapéuticos altamente polares para destruir células cancerosas. Los ácidos nucleicos modificados unidos al agente terapéutico a través de un enlazador pueden facilitar la permeación del miembro permitiendo que el agente terapéutico se desplace hacia una célula para alcanzar una diana intracelular.

En otro ejemplo, los nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados se pueden unir a un péptido inhibidor viral (VIP) a través de un enlazador escindible. El enlazador escindible liberará el VIP y el tinte en la célula. En otro ejemplo, los nucleósidos modificados, nucleótidos modificados y ácidos nucleicos modificados se pueden unir a través del enlazador a un ADP-ribosilato, que es responsable de las acciones de algunas toxinas bacterianas, tales como toxina de cólera, toxina de difteria y toxina de tos ferina. Estas proteínas tóxicas son ADP-ribohiltransferasas que modifican proteínas diana en células humanas. Por ejemplo, las proteínas G de la toxina del cólera ADP-ribosilata, causan la secreción masiva de líquido del revestimiento del intestino delgado, lo que resulta en diarrea potencialmente mortal.

Composiciones farmacéuticas

La presente descripción proporciona proteínas generadas a partir de ARNm modificados. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente una o más sustancias terapéuticamente activas adicionales. De acuerdo con algunos aspectos, se proporciona un procedimiento para administrar composiciones farmacéuticas que comprenden un ácido nucleico modificado que codifica una o más proteínas para administrarse a un sujeto que lo necesita. En algunos casos, se administran composiciones a humanos. A los efectos de la presente descripción, la

frase "ingrediente activo" generalmente se refiere a una proteína, proteína que codifica o complejo que contiene proteínas como se describe en esta invención.

5 Aunque las descripciones de composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta invención se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración a humanos, el experto en la técnica entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para la administración a animales de todo tipo. Se comprende bien la modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a humanos con el fin de hacer que las composiciones sean adecuadas para su administración a diversos animales, y el farmacólogo veterinario normalmente experto puede diseñar y/o realizar tal modificación con experimentación
10 meramente ordinaria, si la hubiera. Los sujetos para los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, humanos y/u otros primates; mamíferos, que incluyen mamíferos comercialmente relevantes tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos, perros, ratones y/o ratas; y/o aves, que incluyen aves comercialmente relevantes tales como pollos, patos, gansos y/o pavos.

15 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en esta invención se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido o desarrollado en lo sucesivo en la técnica de la farmacología. En general, dichos procedimientos preparatorios incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con un excipiente y/o uno o más ingredientes accesorios y, a continuación, si es necesario y/o deseable, dar forma y/o empaquetar el producto en una unidad de dosis única o múltiple deseada.

20 Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción puede prepararse, empaquetarse y/o venderse a granel, como una única dosis unitaria y/o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se usa en esta invención, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del
25 ingrediente activo que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de tal dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de tal dosificación.

30 Las cantidades relativas del ingrediente activo, el excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción variarán, dependiendo de la identidad, tamaño y/o condición del sujeto tratado y además dependiendo de la vía por la cual se administrará la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1 % y el 100 % (p/p) de ingrediente activo.

35 Las formulaciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable, que, tal como se usa en esta invención, incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21^a edición, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; describe varios excipientes utilizados en la formulación
40 de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación. Excepto en la medida en que cualquier medio de excipiente convencional sea incompatible con una sustancia o sus derivados, tal como al producir cualquier efecto biológico no deseado o interactuar de otra manera de manera perjudicial con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, se contempla que su uso esté dentro del alcance de la presente descripción.

45 En algunos casos, un excipiente farmacéuticamente aceptable es al menos en un 95 %, al menos en un 96 %, al menos en un 97 %, al menos en un 98 %, al menos en un 99 % o el 100 % puro. En algunas realizaciones, un excipiente está aprobado para su uso en humanos y para uso veterinario. En algunos casos, un excipiente está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos. En algunos casos, un excipiente es
50 de grado farmacéutico. En algunos casos, un excipiente cumple con los estándares de la farmacopea de Estados Unidos (USP), la Farmacopea Europea (EP), la Farmacopea Británica y/o la Farmacopea Internacional.

55 Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes de dispersión y/o granulación, agentes tensioactivos y/o emulsionantes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, conservantes, agentes de tampón, agentes lubricantes y/o aceites. Tales excipientes pueden incluirse opcionalmente en formulaciones farmacéuticas. Los excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio, agentes colorantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes y/o agentes perfumantes pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

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

65 Los ejemplos de agentes de granulación y/o dispersión incluyen, pero no se limitan a, almidón de patata, almidón de maíz, almidón de tapioca, glicolato de almidón de sodio, arcillas, ácido algínico, goma guar, pulpa de cítricos, agar,

5 bentonita, celulosa y productos de madera, esponja natural, resinas de intercambio catiónico, carbonato de calcio, silicatos, carbonato de sodio, poli(vinil-pirrolidona) reticulado (crospovidona), almidón de carboximetilo de sodio (glicolato de almidón de sodio), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio reticulado (croscarmelosa), metilcelulosa, almidón pregelificado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio, silicato de aluminio y magnesio (Veegumo), lauril sulfato de sodio, compuestos de amonio cuaternario, etc., y/o combinaciones de los mismos.

10 Los ejemplos de agentes tensioactivos y/o emulsionantes incluyen, de modo no taxativo, emulsionantes naturales (por ejemplo, acacia, agar, ácido algínico, alginato de sodio, tragacanto, condruj, colesterol, xantano, pectina, gelatina, yema de huevo, caseína, grasa de lana, colesterol, cera y lecitina), arcillas coloidales (por ejemplo, bentonita [silicato de aluminio] y Veegum® [silicato de aluminio y magnesio]), derivados de aminoácidos de cadena larga, alcoholes de alto peso molecular (por ejemplo, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol oleílico, monoestearato de triacetina, distearato de etilenglicol, monoestearato de glicerilo y monoestearato de propilenglicol, alcohol polivinílico), carbómeros (por ejemplo, carboxi polimetileno, ácido poliacrílico, polímero de ácido acrílico y polímero de ácido carboxivinílico), carragenano, derivados celulósicos (por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, celulosa en polvo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, monolaurato de sorbitán de polioxietileno [Tween®20], sorbitán de polioxietileno [Tween®60], monooleato de sorbitán de polioxietileno [Tween®80], monopalmitato de sorbitán [Span®40], monoestearato de sorbitán [Span®60], tristearato de sorbitán [Span®65], monooleato de glicerilo, monooleato de sorbitán [Span®80]), ésteres de polioxietileno (por ejemplo, monoestearato de polioxietileno [Myrj®45], aceite de castor hidrogenado de polioxietileno, aceite de castor polietoxilado, estearato de polioximetileno, y Solutol®), ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (por ejemplo, Cremophor®), éteres de polioxietileno, (por ejemplo, lauril éter de polioxietileno [Brij®30]), poli(vinil-pirrolidona), monolaurato de dietilenglicol, oleato de trietanolamina, oleato de sodio, oleato de potasio, oleato de etilo, ácido oleico, laurato de etilo, lauril sulfato de sodio, Pluronic®F 68, Poloxamer®188, bromuro de cetrinio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio, docusato de sodio, etc. y/o combinaciones de los mismos.

30 Los ejemplos de agentes aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, almidón (por ejemplo, almidón de maíz y pasta de almidón); gelatina; azúcares (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa, dextrina, melaza, lactosa, lactitol, manitol); gomas naturales y sintéticas (por ejemplo, acacia, alginato de sodio, extracto de musgo irlandés, goma panwar, goma ghatti, mucílago de cáscaras de isapol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, celulosa microcristalina, acetato de celulosa, poli(vinil-pirrolidona), silicato de magnesio y aluminio (Veegum®) y arabogalactán); alginatos; óxido de polietileno; polietilenglicol; sales de calcio inorgánico; ácido silícico; polimetilacrilatos; ceras; agua; alcohol; etc.; y combinaciones de los mismos.

35 Los ejemplos de conservantes pueden incluir, pero no se limitan a, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes antimicrobianos, conservantes antifúngicos, conservantes de alcohol, conservantes ácidos y/u otros conservantes. Los ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, alfa tocoferol, ácido ascórbico, palmitato de acorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, ácido propiónico, galato de propilo, ascorbato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio y/o sulfito de sodio. Los ejemplos de agentes quelantes incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido cítrico monohidrato, edetato disódico, edetato dipotásico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, ácido fosfórico, edetato de sodio, ácido tartárico y/o edetato trisódico. Los ejemplos de conservantes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, bronopol, cetrinida, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, cloroxilenol, cresol, alcohol etílico, glicerina, hexetidina, imidurea, fenol, fenoxietanol, alcohol feniletilo, nitrato fenilmercúrico, propilenglicol y/o timerosal. Los ejemplos de conservantes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a, parabeno de butilo, parabeno de metilo, parabeno de etilo, parabeno de propilo, ácido benzoico, ácido hidroxibenzoico, benzoato de potasio, sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio y/o ácido sórbico. Los ejemplos de conservantes de alcohol incluyen, pero no se limitan a, etanol, polietilenglicol, fenol, compuestos fenólicos, bisfenol, clorobutanol, hidroxibenzoato y/o alcohol feniletilo. Los ejemplos de conservantes ácidos incluyen, pero no se limitan a, vitamina A, vitamina C, vitamina E, betacaroteno, ácido cítrico, ácido acético, ácido deshidroacético, ácido ascórbico, ácido sórbico y/o ácido fítico. Otros conservantes incluyen, pero no se limitan a, tocoferol, acetato de tocoferol, mesilato de deteroxima, cetrinida, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitoluenado butilado (BHT), etilendiamina, lauril sulfato de sodio (SLS), lauril éter sulfato de sodio (SLES), bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de potasio, metabisulfito de potasio, Glydant Plus®, Phenonip®, metilparabeno, Germall®115, Germaben®II, Neolone™, Kathon™, y/o Euxyl

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

Los ejemplos de agentes lubricantes incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, sílice, talco, malta, behanato de glicerilo, aceites vegetales hidrogenados, polietilenglicol, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, leucina, lauril sulfato de magnesio, lauril sulfato de sodio, *etc.*, y combinaciones de estos.

Los ejemplos de aceites incluyen, pero no se limitan a, almendra, almendra de albaricoque, aguacate, babasú, bergamota, semilla de corriente negra, borraja, cade, manzanilla, colza, alcaravea, carnauba, ricino, canela, manteca de cacao, coco, hígado de bacalao, café, maíz, semilla de algodón, emú, eucalipto, onagra, pescado, semilla de linaza, geraniol, calabaza, semilla de uva, avellana, hisopo, miristato de isopropilo, jojoba, nuez de kukui, lavanda, limón, litsea cubeba, nuez de macademia, malva, semilla de mango, semilla de espuma de prado, visón, nuez moscada, oliva, naranja, reloj anaranjado, palma, semilla de palma, nuez de melocotón, cacahuete, semilla de amapola, semilla de calabaza, arroz, salvado, romero, cártamo, sándalo, sabana, espino amarillo, sésamo, manteca de karité, silicona, soja, girasol, árbol de té, cardo, tsubaki, vetiver, nuez y aceites de germen de trigo. Los ejemplos de aceites incluyen, pero no se limitan a, estearato de butilo, triglicérido caprílico, triglicérido cáprico, ciclometicona, sebacato de dietilo, dimeticona 360, miristato de isopropilo, aceite mineral, octildodecanol, alcohol oleílico, aceite de silicona y/o combinaciones de los mismos.

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

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando agentes dispersantes, 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 parenterales aceptables no tóxicos, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse están agua y solución de Ringer, U.S.P., y solución de cloruro de sodio isotónico. Además, pueden emplearse convencionalmente aceites estériles fijos como solvente o medio de suspensión. Con este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Pueden usarse ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana y/o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Para prolongar el efecto de un ingrediente activo, con frecuencia es conveniente disminuir la absorción del ingrediente activo a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco entonces depende de su velocidad de disolución la cual, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrado por vía parenteral se lleva a cabo al disolver o suspender el fármaco en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se hacen formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como poli(láctido)-poliglicólido. Dependiendo de la relación del fármaco con respecto al polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con el tejido corporal.

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

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, un ingrediente activo se mezcla con al menos un excipiente inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o rellenos o extensores (*por ejemplo*, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico), aglutinantes (*por ejemplo*, carboximetilcelulosa,

alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y acacia), humectantes (por ejemplo, glicerol), agentes desintegrantes (*por ejemplo*, agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio), agentes retardantes de solución (por ejemplo, parafina), aceleradores de absorción (por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario), agentes humectantes (*por ejemplo*, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol),
 5 absorbentes (*por ejemplo*, kaolín y arcilla de bentonita), y lubricantes (*por ejemplo*, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicol sólido, sulfato de laurilo de sodio) y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender agentes de tampón.

Se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras
 10 utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y conchas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden comprender agentes opacificantes y pueden ser de una composición que liberan el o los ingredientes activos solo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto
 15 intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. Se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas de dosificación para la administración tópica y/o transdérmica de una composición pueden incluir
 20 ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, aerosoles, inhalantes y/o parches. Generalmente, un ingrediente activo se mezcla en condiciones estériles con un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o cualquier conservante y/o tampón necesario según se requiera. Además, la presente descripción contempla el uso de parches transdérmicos, que a menudo tienen la ventaja adicional de proporcionar una administración controlada de un
 25 compuesto al cuerpo. Tales formas de dosificación se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo y/o dispensando el compuesto en el medio adecuado. De manera alternativa o adicional, la velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de velocidad y/o dispersando el compuesto en una matriz polimérica y/o gel.

Los dispositivos adecuados para su uso en la administración de composiciones farmacéuticas intradérmicas descritas
 30 en esta invención incluyen dispositivos de aguja corta tales como los descritos en las patentes de EE. UU. 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; y 5.417.662. Las composiciones intradérmicas se pueden administrar mediante dispositivos que limitan la longitud de penetración efectiva de una aguja en la piel, tal como los descritos en la publicación PCT WO 99/34850 y equivalentes funcionales de esta. Los dispositivos de inyección por chorro que suministran composiciones líquidas a la dermis a través de un inyector de chorro líquido y/o
 35 a través de una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que llega a la dermis son adecuados. Los dispositivos de inyección por chorro se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. 5.480.381; 5.599.302; 5.334.144; 5.993.412; 5.649.912; 5.569.189; 5.704.911; 5.383.851; 5.893.397; 5.466.220; 5.339.163; 5.312.335; 5.503.627; 5.064.413; 5.520.639; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 4.940.460; y las publicaciones PCT WO 97/37705 y WO 97/13537. Los dispositivos balísticos de suministro de polvo/partículas que utilizan gas comprimido para acelerar
 40 la vacuna en forma de polvo a través de las capas externas de la piel hasta la dermis son adecuados. Alternativa o adicionalmente, las jeringas convencionales se pueden usar en el procedimiento de mantoux clásico de administración intradérmica.

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

Una composición farmacéutica se puede preparar, empaquetar y/o vender en una formulación adecuada para la
 administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Tal formulación puede comprender partículas secas que
 55 comprenden el ingrediente activo y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 nm a aproximadamente 7 nm o de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 6 nm. Tales composiciones se encuentran convenientemente en forma de polvos secos para su administración utilizando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que se puede dirigir una corriente de propulsor para dispersar el polvo y/o utilizando un recipiente dispensador de solvente/polvo autopropulsor tal como un dispositivo que comprende el ingrediente activo
 60 disuelto y/o suspendido en un propulsor de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Tales polvos comprenden partículas en las que al menos el 98 % de las partículas en peso tienen un diámetro mayor que 0,5 nm y al menos el 95 % de las partículas en número tienen un diámetro menor que 7 nm. Alternativamente, al menos el 95 % de las partículas en peso tienen un diámetro mayor que 1 nm y al menos el 90 % de las partículas en número tienen un diámetro menor que 6 nm. Las composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente de polvo sólido fino tal como
 65 azúcar y se proporcionan convenientemente en una forma de dosis unitaria.

Los propulsores de bajo punto de ebullición generalmente incluyen propulsores líquidos que tienen un punto de

ebullición de menos de 65 °F a presión atmosférica. Generalmente, el propulsor puede constituir del 50 al 99,9 % (p/p) de la composición, y el ingrediente activo puede constituir del 0,1 al 20 % (p/p) de la composición. Un propulsor puede comprender además ingredientes adicionales tales como un tensioactivo aniónico líquido y/o sólido y/o un diluyente sólido (que puede tener un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que comprenden el ingrediente activo).

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

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

Las formulaciones adecuadas para la administración nasal pueden, por ejemplo, comprender de aproximadamente el 0,1 % (p/p) y hasta el 100 % (p/p) del ingrediente activo, y pueden comprender uno o más de los ingredientes adicionales descritos en esta invención. Una composición farmacéutica se puede preparar, empaquetar y/o vender en una formulación adecuada para administración bucal. Tales formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de comprimidos y/o grageas hechas usando procedimientos convencionales, y pueden, por ejemplo, 0,1 % a 20 % (p/p) de ingrediente activo, comprendiendo el equilibrio una composición soluble y/o degradable por vía oral y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en esta invención. Alternativamente, las formulaciones adecuadas para la administración bucal pueden comprender un polvo y/o una solución y/o suspensión aerosolizada y/o atomizada que comprende el ingrediente activo. Tales formulaciones en polvo, aerosolizadas y/o aerosolizadas, cuando se dispersan, pueden tener un tamaño de partícula y/o gota promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 200 nm, y pueden comprender además uno o más de cualquiera de los ingredientes adicionales descritos en esta invención.

Una composición farmacéutica se puede preparar, empaquetar y/o vender en una formulación adecuada para administración oftálmica. Tales formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de gotas para los ojos que incluyen, por ejemplo, una solución y/o suspensión al 0,1/1,0 % (p/p) del ingrediente activo en un excipiente líquido acuoso u oleoso. Tales gotas pueden comprender además agentes de tampón, sales y/o uno o más de cualquiera de los ingredientes adicionales descritos en esta invención. Otras formulaciones administrables oftálmicamente que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina y/o en una preparación liposómica. Se contempla que las gotas para los oídos y/o gotas para los ojos están dentro del alcance de esta descripción.

Las consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005

Administración

La presente descripción proporciona procedimientos que comprenden la administración de proteínas o complejos de acuerdo con la presente descripción a un sujeto que lo necesita. Las proteínas o complejos, o composiciones farmacéuticas, de imagenología, diagnósticas o profilácticas de estos, se pueden administrar a un sujeto usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para prevenir, tratar, diagnosticar u obtener imágenes de una enfermedad, trastorno y/o afección (*por ejemplo*, una enfermedad, trastorno y/o afección relacionada con déficits de memoria de trabajo). La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad y condición general del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la composición particular, su modo de administración, su modo de actividad y similares. Las composiciones de acuerdo con la presente descripción se formulan típicamente en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Sin embargo, se entenderá que el médico tratante decidirá el uso diario total de las composiciones de la presente descripción dentro del alcance del criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente efectivo, profilácticamente efectivo, o de imagenología apropiado para cualquier paciente en particular dependerá de diversos factores, entre ellos el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o de forma coincidente con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Las proteínas que se administrarán y/o las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imagenología de estas se pueden administrar a animales, tales como mamíferos (*p. ej.*, humanos, animales domesticados, gatos, perros, ratones, ratas, *etc.*). En algunos casos, se administran composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imagenología de estos a humanos.

Las proteínas que se administrarán y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imagenología de estas de acuerdo con la presente descripción se pueden administrar por cualquier vía. En algunas realizaciones, las proteínas y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, diagnósticas o de imagenología de estas se administran mediante una o más de una variedad de vías, que incluyen oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea, intraventricular, transdérmica, interdérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (por ejemplo, mediante polvos, ungüentos, cremas, geles, lociones y/o gotas), mucosa, nasal, bucal, enteral, vítreo, intratumoral, sublingual; mediante instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; como un aerosol oral, aerosol nasal y/o aerosol, y/o a través de un catéter de vena portal. En algunos casos, las proteínas o complejos, y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imagenología de estos, se administran mediante inyección intravenosa sistémica. En casos específicos, las proteínas o complejos y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, diagnósticas o de imagenología de estos se pueden administrar por vía intravenosa y/u oral. En casos específicos, las proteínas o complejos, y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imagenología de estos, se pueden administrar de una manera que permita que la proteína o complejo atraviese la barrera hematoencefálica, la barrera vascular u otra barrera epitelial.

Sin embargo, la presente descripción comprende la administración de proteínas o complejos, y/o composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imagenología de estos, por cualquier vía apropiada teniendo en cuenta los avances probables en las ciencias de la administración de fármacos.

En general, la vía de administración más adecuada dependerá de una variedad de factores que incluyen la naturaleza de la proteína o complejo que comprende proteínas asociadas con al menos un agente que se va a administrar (por ejemplo, su estabilidad en el entorno del tracto gastrointestinal, torrente sanguíneo, *etc.*), la condición del paciente (*por ejemplo*, si el paciente es capaz de tolerar vías particulares de administración), *etc.* La presente descripción comprende la administración de las composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imagenología por cualquier vía adecuada teniendo en cuenta los avances probables en las ciencias de la administración de fármacos.

En determinados casos, las composiciones de acuerdo con la presente descripción se pueden administrar a niveles de dosificación suficientes para administrar de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, del peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico, de diagnóstico, profiláctico o de imagenología deseado. La dosis deseada se puede administrar tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. En determinados casos, la dosificación deseada se puede administrar utilizando múltiples administraciones (*p. ej.*, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).

Las proteínas o complejos se pueden usar en combinación con uno o más agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico o de imagenología. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes deben administrarse al mismo tiempo y/o formularse para su administración en conjunto, aunque estos procedimientos de administración están dentro del alcance de la presente descripción. Las composiciones se pueden administrar de forma simultánea, previa o posterior a uno o más procedimientos médicos o terapéuticos deseados. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o en un cronograma determinado para ese agente. En algunos aspectos, la presente descripción comprende la administración de composiciones farmacéuticas, profilácticas, de diagnóstico o de imagenología en combinación con agentes que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción y/o modifican su distribución dentro del cuerpo.

Se apreciará además que los agentes activos terapéuticos, profilácticos, diagnósticos o de formación de imágenes utilizados en combinación se pueden administrar juntos en una única composición o se pueden administrar por separado en diferentes composiciones. En general, se espera que los agentes utilizados en combinación se utilicen en niveles que no excedan los niveles a los que se utilizan individualmente. En algunos casos, los niveles utilizados en combinación serán inferiores a los utilizados individualmente.

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

Kits

- 5 La presente descripción proporciona una variedad de kits para llevar a cabo de forma conveniente y/o eficaz los procedimientos de la presente descripción. Típicamente, los kits comprenderán cantidades y/o cantidades suficientes de componentes para permitir que un usuario realice múltiples tratamientos de un sujeto(s) y/o realice múltiples experimentos.
- 10 En un aspecto, la descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación de ácido nucleico, donde el ácido nucleico es capaz de evadir o evitar la inducción de una respuesta inmunitaria innata de una célula en la que se introduce el primer ácido nucleico aislado, y empaquetado e instrucciones.
- 15 En un aspecto, la descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden: un primer ácido nucleico modificado aislado que comprende una región traducible, proporcionado en una cantidad eficaz para producir una cantidad deseada de una proteína codificada por la región traducible cuando se introduce en una célula diana; un segundo ácido nucleico que comprende un ácido nucleico inhibidor, proporcionado en una cantidad eficaz para inhibir sustancialmente la respuesta inmunitaria innata de la célula; y empaquetado e instrucciones.
- 20 En un aspecto, la descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación de nucleósido, donde el ácido nucleico presenta degradación reducida por una nucleasa celular y empaquetado e instrucciones.
- 25 En un aspecto, la descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y al menos dos modificaciones de nucleósidos diferentes, donde el ácido nucleico presenta degradación reducida por una nucleasa celular y empaquetado e instrucciones.
- 30 En un aspecto, la descripción proporciona kits para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y al menos una modificación de nucleósido, donde el ácido nucleico presenta degradación reducida por una nucleasa celular; un segundo ácido nucleico que comprende un ácido nucleico inhibidor; y empaquetado e instrucciones.
- 35 En algunos casos, el primer ácido nucleico aislado comprende ARN mensajero (ARNm). En algunos casos, el ARNm comprende al menos un nucleósido que se selecciona del grupo que consiste en ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinomethyluridina, 1-taurinomethyl-pseudouridina, 5-taurinomethyl-2-tio-uridina, 1-taurinomethyl-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-deaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-deaza-pseudouridina, dihidrohiduridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina o cualquiera descrito en esta invención.
- 40 En algunos casos, el ARNm comprende al menos un nucleósido que se selecciona del grupo que consiste en 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, 1-metil-1-deaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tiozebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina, 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina o cualquier otra descrita en esta invención.
- 45 En algunos casos, el ARNm comprende al menos un nucleósido que se selecciona del grupo que consiste en 2-aminopurina, 2, 6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxisopentenil)adenosina, 2-metil-N6-(cis-hidroxisopentenil) adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metil-N6-treonil carbamoiladenosina, N6, N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metil-N6-adenina, 2-metoxi-adenina o cualquiera de los descritos en esta invención.
- 50 En algunos casos, el ARNm comprende al menos un nucleósido que se selecciona del grupo que consiste en 2-aminopurina, 2, 6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, 7-deaza-8-aza-adenina, 7-deaza-2-aminopurina, 7-deaza-8-aza-2-aminopurina, 7-deaza-2,6-diaminopurina, 7-deaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxisopentenil)adenosina, 2-metil-N6-(cis-hidroxisopentenil) adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metil-N6-treonil carbamoiladenosina, N6, N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metil-N6-adenina, 2-metoxi-adenina o cualquiera de los descritos en esta invención.
- 55 En algunos casos, el ARNm comprende al menos un nucleósido seleccionado del grupo que consiste en inosina, 1-metil-inosina, wiosina, wibutosina, 7-deaza-guanosina, 7-deaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-deaza-guanosina, 6-tio-7-deaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilanosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2, N2-dimetilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina o cualquiera de los descritos en esta invención.
- 60 En otro aspecto, la descripción proporciona composiciones para la producción de proteínas, que comprenden un primer ácido nucleico aislado que comprende una región traducible y una modificación de nucleósido, donde el ácido
- 65

nucleico presenta degradación reducida por una nucleasa celular, y una célula de mamífero adecuada para la traducción de la región traducible del primer ácido nucleico.

Definiciones

5 En diversos lugares de la presente memoria descriptiva, se describen sustituyentes de compuestos de la presente descripción en grupos o en intervalos. Se pretende específicamente que la presente descripción incluya todas y cada una de las subcombinaciones individuales de los miembros de tales grupos e intervalos. Por ejemplo, se pretende específicamente que el término "alquilo C₁₋₆" describa individualmente metilo, etilo, alquilo C₃, alquilo C₄, alquilo C₅ y alquilo C₆.

Acerca de: Como se usa en esta invención, el término "aproximadamente" significa +/- 10 % del valor mencionado.

15 *Administrado en combinación:* Como se usa en esta invención, el término "administrado en combinación" o "administración combinada" significa que dos o más agentes se administran a un sujeto al mismo tiempo o dentro de un intervalo tal que puede haber una superposición de un efecto de cada agente en el paciente. En algunos casos, se administran dentro de aproximadamente 60, 30, 15, 10, 5 o 1 minuto entre sí. En algunos casos, las administraciones de los agentes están suficientemente separadas entre sí de manera que se logra un efecto combinatorio (*por ejemplo*, un efecto sinérgico).

20 *Animal:* Como se usa en esta invención, el término «animal» se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunos casos, "animal" se refiere a los seres humanos en cualquier etapa del desarrollo. En algunos casos, "animal" se refiere a animales no humanos en cualquier etapa del desarrollo. En determinados casos, el animal no humano es un mamífero (p. ej., un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, un ganado, un primate o un cerdo). En algunos casos, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y gusanos. En algunos casos, el animal es un animal transgénico, un animal modificado genéticamente o un clon.

30 *Antígenos de interés o antígenos deseados:* Como se usa en esta invención, los términos "antígenos de interés" o "antígenos deseados" incluyen aquellas proteínas y otras biomoléculas proporcionadas en esta invención que están inmuno-específicamente unidas por los anticuerpos y fragmentos, mutantes, variantes y alteraciones de estos descritos en esta invención. Los ejemplos de antígenos de interés incluyen, pero no se limitan a, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina, hGH, tPA, citocinas, tales como interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón (IFN) alfa, IFN beta, IFN gamma, IFN omega o IFN tau, factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF alfa y TNF beta, TNF gamma, TRAIL; G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 y VEGF.

40 *Aproximadamente:* Como se usa en esta invención, el término "aproximadamente" o "alrededor de", como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En determinados casos, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que se encuentran dentro del 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia establecido a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto (excepto cuando dicha cantidad exceda el 100 % de un valor posible).

45 *Asociado a:* Como se usan en esta invención, los términos "asociado con", "conjugado", "enlazado", "unido" y "atado", cuando se usan con respecto a dos o más restos, significa que los restos están físicamente asociados o conectados entre sí, ya sea directamente o a través de uno o más restos adicionales que sirven como un agente de enlace, para formar una estructura que es lo suficientemente estable para que los restos permanezcan físicamente asociados en las condiciones en las que se usa la estructura, *por ejemplo*, condiciones fisiológicas. Una "asociación" no necesita ser estrictamente a través de enlace químico covalente directo. También puede sugerir un enlace iónico o de hidrógeno o una conectividad basada en hibridación lo suficientemente estable de modo que las entidades "asociadas" permanezcan físicamente asociadas.

55 *Biocompatible:* Como se usa en esta invención, el término "biocompatible" significa compatible con células, tejidos, órganos o sistemas vivos que presentan poco o ningún riesgo de lesión, toxicidad o rechazo por parte del sistema inmunitario.

60 *Biodegradable:* Como se usa en esta invención, el término "biodegradable" significa que puede descomponerse en productos inocuos por la acción de seres vivos.

65 *Biológicamente activo:* Como se usa en esta invención, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier sustancia que tiene actividad en un sistema y/u organismo biológico. Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico en ese organismo, se considera biológicamente activa. En casos particulares, un polinucleótido de la presente descripción puede considerarse biológicamente activo si incluso una parte del polinucleótido es biológicamente activo o imita una actividad considerada biológicamente relevante.

Términos químicos: A continuación se proporciona la definición de varios términos químicos de "acilo" a "tiol".

El término "acilo", tal como se usa en esta invención, representa un grupo hidrógeno o alquilo (p. ej., un grupo haloalquilo), tal como se define en esta invención, que está unido al grupo molecular original a través de un grupo carbonilo, tal como se define en esta invención, y se ejemplifica mediante formilo (es decir, un grupo carboxialdehído), acetilo, trifluoroacetilo, propionilo, butanoilo y similares. Los ejemplos de grupos acilo no sustituidos incluyen de 1 a 7, de 1 a 11 o de 1 a 21 carbonos. En algunos casos, el grupo alquilo se sustituye además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención.

El término "acilamino", tal como se usa en esta invención, representa un grupo acilo, tal como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo amino, tal como se define en esta invención (es decir, $-\text{N}(\text{R}^{\text{N}1})-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, donde R es H o un grupo alquilo C_{1-6} , C_{1-10} o C_{1-20} opcionalmente sustituido (por ejemplo, haloalquilo) y $\text{R}^{\text{N}1}$ es como se define en esta invención). Los ejemplos de grupos acilamino no sustituidos incluyen de 1 a 41 carbonos (por ejemplo, de 1 a 7, de 1 a 13, de 1 a 21, de 2 a 7, de 2 a 13, de 2 a 21 o de 2 a 41 carbonos). En algunos casos, el grupo alquilo se sustituye además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención, y/o el grupo amino es $-\text{NH}_2$ o $-\text{NHR}^{\text{N}1}$, donde $\text{R}^{\text{N}1}$ es, independientemente, OH, NO_2 , NH_2 , $\text{NR}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{OR}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{R}^{\text{N}2}$, $\text{SOR}^{\text{N}2}$, alquilo, arilo, acilo (por ejemplo, acetilo, trifluoroacetilo u otros descritos en esta invención), o alcoxicarbonilalquilo, y cada $\text{R}^{\text{N}2}$ puede ser H, alquilo o arilo.

El término "acilaminoalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo acilo, como se define en esta invención, unido a un grupo amino que a su vez está unido al grupo molecular original a través de un grupo alquilo, como se define en esta invención (es decir, $-\text{alquil-N}(\text{R}^{\text{N}1})-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, donde R es H o un grupo alquilo C_{1-6} , C_{1-10} o C_{1-20} opcionalmente sustituido (por ejemplo, haloalquilo) y $\text{R}^{\text{N}1}$ es como se define en esta invención). Los ejemplos de grupos acilamino no sustituidos incluyen de 1 a 41 carbonos (por ejemplo, de 1 a 7, de 1 a 13, de 1 a 21, de 2 a 7, de 2 a 13, de 2 a 21 o de 2 a 41 carbonos). En algunos casos, el grupo alquilo se sustituye además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención, y/o el grupo amino es $-\text{NH}_2$ o $-\text{NHR}^{\text{N}1}$, donde $\text{R}^{\text{N}1}$ es, independientemente, OH, NO_2 , NH_2 , $\text{NR}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{OR}^{\text{N}2}$, $\text{SO}_2\text{R}^{\text{N}2}$, $\text{SOR}^{\text{N}2}$, alquilo, arilo, acilo (por ejemplo, acetilo, trifluoroacetilo u otros descritos en esta invención), o alcoxicarbonilalquilo, y cada $\text{R}^{\text{N}2}$ puede ser H, alquilo o arilo.

El término "aciloxi", como se usa en esta invención, representa un grupo acilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno (es decir, $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, donde R es H o un grupo alquilo C_{1-6} , C_{1-10} o C_{1-20} opcionalmente sustituido). Los ejemplos de grupos aciloxi no sustituidos incluyen de 1 a 21 carbonos (por ejemplo, de 1 a 7 o de 1 a 11 carbonos). En algunos casos, el grupo alquilo se sustituye además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención.

El término "aciloxialquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo acilo, como se define en esta invención, unido a un átomo de oxígeno que a su vez está unido al grupo molecular original a través de un grupo alquilo (es decir, $-\text{alquil-O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}$, donde R es H o un grupo alquilo C_{1-6} , C_{1-10} o C_{1-20} opcionalmente sustituido). Los ejemplos de grupos aciloxialquilo no sustituidos incluyen de 1 a 21 carbonos (por ejemplo, de 1 a 7 o de 1 a 11 carbonos). En algunos casos, el grupo alquilo está, independientemente, sustituido además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención.

El término "alcarilo", como se usa en esta invención, representa un grupo arilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo alquileno, como se define en esta invención. Los ejemplos de grupos alcarilo no sustituidos son de 7 a 30 carbonos (por ejemplo, de 7 a 16 o de 7 a 20 carbonos, tal como arilo C_{1-6} alk- C_{6-10} , arilo C_{1-10} alk- C_{6-10} o arilo C_{1-20} alk- C_{6-10}). En algunos casos, el alquileno y el arilo se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para los grupos respectivos. Otros grupos precedidos por el prefijo "alk-" se definen de la misma manera, donde "alk" se refiere a un alquileno C_{1-6} , a menos que se indique lo contrario, y la estructura química unida es como se define en esta invención.

El término "alquilo" representa un grupo cicloalquilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo alquileno, como se define en esta invención (por ejemplo, un grupo alquileno de 1 a 4, de 1 a 6, de 1 a 10 o forma 1 a 20 carbonos). En algunos casos, el alquileno y el cicloalquilo se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para el grupo respectivo.

El término "alquenilo", como se usa en esta invención, representa grupos de cadena lineal o ramificada monovalentes de, a menos que se especifique lo contrario, de 2 a 20 carbonos (p. ej., de 2 a 6 o de 2 a 10 carbonos) que contienen uno o más enlaces dobles carbono-carbono y se ejemplifica mediante etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo y similares. Los alquenilos incluyen tanto isómeros cis como trans. Los grupos alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes que se seleccionan, independientemente, de amino, arilo, cicloalquilo o heterociclilo (por ejemplo, heteroarilo), como se define en esta invención, o cualquiera de los ejemplos de grupos sustituyentes alquilo descritos en esta invención.

El término "alqueniloxi" representa un sustituyente químico de fórmula $-\text{OR}$, donde R es un grupo alquenilo C_{2-20} (p. ej., alquenilo C_{2-6} o C_{2-10}), a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos de grupos alqueniloxi incluyen

eteniloxi, propeniloxi y similares. En algunos casos, el grupo alqueno se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxilo).

5 El término "heteroarilo" se refiere a un grupo heteroarilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo alqueno, como se define en esta invención. Los ejemplos de grupos heteroarilo no sustituidos son de 2 a 32 carbonos (por ejemplo, de 2 a 22, de 2 a 18, de 2 a 17, de 2 a 16, de 3 a 15, de 2 a 14, de 2 a 13, o de 2 a 12 carbonos, tales como heteroarilo C₁₋₆ alk-C₁₋₁₂, heteroarilo C₁₋₁₀ alk-C₁₋₁₂ o heteroarilo C₁₋₂₀ alk-C₁₋₁₂). En algunos casos, el alqueno y el heteroarilo se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para el grupo respectivo. Los grupos alqheteroarilo son un subconjunto de grupos alqheterociclilo.

15 El término "alqheterociclilo" representa un grupo heterociclilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo alqueno, como se define en esta invención. Los ejemplos de grupos alqheterociclilo no sustituidos son de 2 a 32 carbonos (por ejemplo, de 2 a 22, de 2 a 18, de 2 a 17, de 2 a 16, de 3 a 15, de 2 a 14, de 2 a 13, o de 2 a 12 carbonos, tales como heterociclilo C₁₋₆ alk-C₁₋₁₂, heterociclilo C₁₋₁₀ alk-C₁₋₁₂ o heterociclilo C₁₋₂₀ alk-C₁₋₁₂). En algunos casos, el alqueno y el heterociclilo se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para el grupo respectivo.

20 El término "alcoxi" representa un sustituyente químico de fórmula —OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₂₀ (p. ej., alquilo C₁₋₆ o C₁₋₁₀), a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi (p. ej., n-propoxi e isopropoxi), t-butoxi y similares. En algunos casos, el grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención (por ejemplo, hidroxilo o alcoxi).

25 El término "alcoxialcoxi" representa un grupo alcoxi que está sustituido con un grupo alcoxi. Los ejemplos de grupos alcoxialcoxi no sustituidos incluyen entre 2 y 40 carbonos (por ejemplo, de 2 a 12 o de 2 a 20 carbonos, tal como alcoxi C₁₋₆-alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₁₀-alcoxi C₁₋₁₀ o alcoxi C₁₋₂₀-alcoxi C₁₋₂₀). En algunos casos, cada grupo alcoxi se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

30 El término "alcoxialquilo" representa un grupo alquilo que está sustituido con un grupo alcoxi. Los ejemplos de grupos alcoxialquilo no sustituidos incluyen entre 2 y 40 carbonos (por ejemplo, de 2 a 12 o de 2 a 20 carbonos, tal como alquilo C₁₋₆ alcoxi-C₁₋₆, alquilo C₁₋₁₀ alcoxi-C₁₋₁₀ o alquilo C₁₋₂₀ alcoxi-C₁₋₂₀). En algunos casos, el alquilo y el alcoxi se pueden sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para el grupo respectivo.

35 El término "alcoxicarbonilo", tal como se usa en esta invención, representa un alcoxi, tal como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un átomo de carbonilo (por ejemplo, -C(O)-OR, donde R es H o un grupo alquilo C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ opcionalmente sustituido). Los ejemplos de alcoxicarbonilo no sustituido incluyen de 1 a 21 carbonos (por ejemplo, de 1 a 11 o de 1 a 7 carbonos). En algunas realizaciones, el grupo alcoxi se sustituye además con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención.

40 El término "alcoxicarbonilacilo", como se usa en esta invención, representa un grupo acilo, tal como se define en esta invención, que está sustituido con un grupo alcoxicarbonilo, como se define en esta invención (por ejemplo, -C(O)-alquil-C(O)-OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ opcionalmente sustituido). Los ejemplos de alcoxicarbonilacilo no sustituido incluyen de 3 a 41 carbonos (p. ej., de 3 a 10, de 3 a 13, de 3 a 17, de 3 a 21 o de 3 a 31 carbonos, tal como alcoxicarbonil-C₁₋₆ acilo C₁₋₆, alcoxicarbonil-C₁₋₁₀ acilo C₁₋₁₀ o alcoxicarbonil-C₁₋₂₀ acilo C₁₋₂₀). En algunos casos, cada grupo alcoxi y alquilo se sustituye además de forma independiente con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes, tal como se describe en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxilo) para cada grupo.

50 El término "alcoxicarbonilalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, como se define en esta invención, que está sustituido con un grupo alcoxicarbonilo, como se define en esta invención (por ejemplo, -O-alquilo-C(O)-OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₆, C₁₋₁₀ o C₁₋₂₀ opcionalmente sustituido). Los ejemplos de alcoxicarbonilalcoxi no sustituido incluyen de 3 a 41 carbonos (por ejemplo, de 3 a 10, de 3 a 13, de 3 a 17, de 3 a 21 o de 3 a 31 carbonos, tal como alcoxi C₁₋₆ alcoxicarbonilo-C₁₋₆, alcoxi C₁₋₁₀ alcoxicarbonilo-C₁₋₁₀ o alcoxi C₁₋₂₀ alcoxicarbonilo-C₁₋₂₀). En algunos casos, cada grupo alcoxi se sustituye además de forma independiente con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes, como se describe en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxilo).

60 El término "alcoxicarbonilalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, que está sustituido con un grupo alcoxicarbonilo, como se define en esta invención (por ejemplo, -alquil-C(O)-OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₂₀, C₁₋₁₀ o C₁₋₆ opcionalmente sustituido). Los ejemplos de alcoxicarbonilalquilo no sustituido incluyen de 3 a 41 carbonos (por ejemplo, de 3 a 10, de 3 a 13, de 3 a 17, de 3 a 21 o de 3 a 31 carbonos, tal como alcoxicarbonil-C₁₋₆ alquilo C₁₋₆, alcoxicarbonil-C₁₋₁₀ alquilo C₁₋₁₀ o alcoxicarbonil-C₁₋₂₀ alquilo C₁₋₂₀). En algunos casos, cada grupo alquilo y alcoxi se sustituye además de forma independiente con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxilo).

65 El término "alcoxicarbonilalqueno", como se usa en esta invención, representa un grupo alqueno, como se define en esta invención, que está sustituido con un grupo alcoxicarbonilo, como se define en esta invención (por ejemplo, -

alquenilo-C (O)-OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₂₀, C₁₋₁₀ o C₁₋₆ opcionalmente sustituido). Los ejemplos de alcocarbonilalquenilo no sustituido incluyen entre 4 y 41 carbonos (por ejemplo, entre 4 y 10, entre 4 y 13, entre 4 y 17, entre 4 y 21 o entre 4 y 31 carbonos, tales como alcocarbonil-C₂₋₆ alquenilo C₁₋₆, alcocarbonil-C₂₋₁₀ alquenilo C₁₋₁₀ o alcocarbonil-C₂₋₂₀ alquenilo C₁₋₂₀). En algunos casos, cada grupo alquilo, alquenilo y alcoxi se sustituye además de forma independiente con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxilo).

El término "alcocarbonilalquinilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquinilo, como se define en esta invención, que está sustituido con un grupo alcocarbonilo, como se define en esta invención (por ejemplo, -alquinil-C(O)-OR, donde R es un grupo alquilo C₁₋₂₀, C₁₋₁₀, o C₁₋₆ opcionalmente sustituido). El alcocarbonilalquinilo no sustituido ejemplar incluye de 4 a 41 carbonos (por ejemplo, de 4 a 10, de 4 a 13, de 4 a 17, de 4 a 21, o de 4 a 31 carbonos, tales como alquinilo C₁₋₆ alcocarbonilo-C₂₋₆, alquinilo C₁₋₁₀ alcocarbonilo-C₂₋₁₀ o alquinilo C₁₋₂₀ alcocarbonilo C₂₋₂₀). En algunos casos, cada grupo alquilo, alquinilo y alcoxi se sustituye aún más de manera independiente con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se describe en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxilo).

El término "alquilo", como se usa en esta invención, incluye tanto a grupos saturados de cadena lineal como de cadena ramificada de 1 a 20 carbonos (por ejemplo, de 1 a 10 o de 1 a 6), a menos que se especifique lo contrario. Los grupos alquilo se ejemplifican por metilo, etilo, n- e iso-propilo, n-, sec-, iso- y tert-butilo, neopentilo, y similares, y pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres o, en el caso de los grupos alquilo de dos carbonos o más, cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: (1) alcoxi C₁₋₆; (2) alquilsulfino C₁₋₆; (3) amino, como se define en esta invención (por ejemplo, amino no sustituido (es decir, -NH₂) o un amino sustituido (es decir, -N(R^{N1})₂, donde R^{N1} es como se define para amino); (4) arilo C₆₋₁₀ alcoxi-C₁₋₆; (5) azido; (6) halo; (7) (heterocicli)oxi C₂₋₉; (8) hidroxilo, opcionalmente sustituido con un grupo protector de O; (9) nitro; (10) oxo (por ejemplo, carboxialdehído o acilo); (11) espirocicli C₁₋₇; (12) tioalcoxi; (13) tiol; (14) -CO₂R^A, opcionalmente sustituido con n grupo protector de O y donde R^A se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c) arilo C₆₋₁₀, (d) hidrógeno, (e) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, (f) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (15) -C(O)NR^BR^C, donde cada uno de R^B y R^C se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀, y (d) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo; (16) -SO₂R^D, donde R^D se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, y (d) hidroxilo; (17) -SO₂NR^ER^F, donde cada uno de R^E y R^F se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo; (18) -C(O)R^G, donde R^G se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c) arilo C₆₋₁₀, (d) hidrógeno, (e) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, (f) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (19) -NR^HC(O)R^I, donde R^H se selecciona del grupo que consiste en (a1) hidrógeno y (b1) alquilo C₁₋₆, y R^I se selecciona del grupo que consiste en (a2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b2) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c2) arilo C₆₋₁₀, (d2) hidrógeno, (e2) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g2) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R' s H o alquilo C₁₋₂₀, y (h2) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (20) -NR^JC(O)OR^K, donde R^J se selecciona del grupo que consiste en (a1) hidrógeno y (b1) alquilo C₁₋₆, y R^K se selecciona del grupo que consiste en (a2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b2) alquenilo C₂₋₂₀ (por ejemplo, alquenilo C₂₋₆), (c2) arilo C₆₋₁₀, (d2) hidrógeno, (e2) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g2) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R' s H o alquilo C₁₋₂₀, y (h2) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s₁ es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s₂ y s₃, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; y (21) amidina. En algunos casos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención. Por ejemplo, el grupo alquilo de un alcarilo C₁ se puede sustituir además con un grupo oxo para proporcionar el respectivo sustituyente del arilo.

El término "alquileo" y el prefijo "alk-", como se usa en esta invención, representan un grupo hidrocarburo divalente saturado derivado de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada mediante la eliminación de dos átomos

de hidrógeno, y se ejemplifica por metileno, etileno, isopropileno, y similares. El término "alquileo C_{x-y}" y el prefijo "alk- C_{x-y}" representan grupos alquileo que tienen entre los carbonos x e y. Los valores de ejemplo para x son 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y los valores de ejemplo para y son 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 (por ejemplo, alquileo C₁₋₆, C₁₋₁₀, C₂₋₂₀, C₂₋₆, C₂₋₁₀ o C₂₋₂₀). En algunos casos, el alquileo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención para un grupo alquilo.

El término "alquilsulfino", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo unido al grupo molecular original a través de un grupo -S(O)-. Los ejemplos de grupos alquilsulfino no sustituidos son de 1 a 6, de 1 a 10 o de 1 a 20 carbonos. En algunos casos, el grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

El término "alquilsulfmialquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo alquilsulfino. Los ejemplos de grupos alquilsulfmialquilo no sustituidos son de 2 a 12, de 2 a 20 o de 2 a 40 carbonos. En algunos casos, cada grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

El término "alquinilo", como se usa en esta invención, representa grupos de cadena lineal o ramificada monovalentes de 2 a 20 átomos de carbono (p. ej., de 2 a 4, de 2 a 6 o de 2 a 10 carbonos) que contienen un enlace triple carbono-carbono y se ejemplifica mediante etinilo, 1-propinilo y similares. Los grupos alquinilo pueden estar opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes que se seleccionan, independientemente, de arilo, cicloalquilo o heterociclilo (por ejemplo, heteroarilo), como se define en esta invención, o cualquiera de los ejemplos de grupos sustituyentes alquilo descritos en esta invención.

El término "alquiniloxi" representa un sustituyente químico de fórmula -OR, donde R es un grupo alquinilo C₂₋₂₀ (p. ej., alquinilo C₂₋₆ o C₂₋₁₀), a menos que se especifique lo contrario. Los ejemplos de grupos alquiniloxi incluyen etiniloxi, propiniloxi y similares. En algunos casos, el grupo alquinilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención (por ejemplo, un grupo hidroxilo).

El término "amidina", como se usa en esta invención, representa un grupo —C(=NH)NH₂.

El término "amino", como se usa en esta invención, representa —N(R^{N1})₂, donde cada R^{N1} es, independientemente, H, OH, NO₂, N(R^{N2})₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, un grupo protector de N, alquilo, alqueno, alquinilo, alcoxi, arilo, alcarilo, cicloalquilo, alcicloalquilo, carboxialquilo (por ejemplo, opcionalmente sustituido con un grupo protector de O, tal como grupos arilalcoxicarbonilo opcionalmente sustituidos o cualquiera descrito en esta invención), sulfoalquilo, acilo (por ejemplo, acetilo, trifluoroacetilo, u otros descritos en esta invención), alcoxycarbonilalquilo (por ejemplo, opcionalmente sustituidos con un grupo protector de O, tal como grupos arilalcoxicarbonilo opcionalmente sustituidos o cualquiera descrito en esta invención), heterociclilo (por ejemplo, heteroarilo), o alqheterociclilo (por ejemplo, alqheteroarilo), donde cada uno de estos grupos R^{N1} mencionados pueden ser opcionalmente sustituidos, como se define en esta invención para cada grupo; o dos R^{N1} combinados para formar un heterociclilo o un grupo protector de N, y donde cada R^{N2} es, independientemente, H, alquilo o arilo. Los grupos amino de la descripción pueden ser un amino no sustituido (es decir, —NH₂) o un amino sustituido (es decir, —N(R^{N1})₂). En una realización preferida, amino es —NH₂ o —NHR^{N1}, donde R^{N1} es, independientemente, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, alquilo, carboxialquilo, sulfoalquilo, acilo (por ejemplo, acetilo, trifluoroacetilo u otros descritos en esta invención), alcoxycarbonilalquilo (por ejemplo, t-butoxicarbonilalquilo) o arilo y cada R^{N2} puede ser H, alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), o arilo C₆₋₁₀.

El término "aminoácido", como se describe en esta invención, se refiere a una molécula que tiene una cadena lateral, un grupo amino y un grupo ácido (por ejemplo, un grupo carboxi de —CO₂H o un grupo sulfo de —SO₃H), donde el aminoácido se une al grupo molecular original por la cadena lateral, grupo amino o grupo ácido (por ejemplo, la cadena lateral). En algunos casos, el aminoácido se une al grupo molecular original por un grupo carbonilo, donde la cadena lateral o el grupo amino se une al grupo carbonilo. Las cadenas laterales ejemplares incluyen un alquilo, arilo, heterociclilo, alcarilo, alqheterociclilo, aminoalquilo, carbamoilalquilo y carboxialquilo opcionalmente sustituido. Los aminoácidos ejemplares incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, hidroxinorvalina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, pirrolisina, selenocisteína, serina, taurina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Los grupos de aminoácidos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres o, en el caso de grupos de aminoácidos de dos carbonos o más, cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: (1) alcoxi C₁₋₆; (2) alquilsulfino C₁₋₆; (3) amino, como se define en esta invención, (por ejemplo, amino no sustituido (es decir, -NH₂) o un amino sustituido (es decir, -N(R^{N1})₂, donde R^{N1} es como se define para amino); (4) C₆₋₁₀ arilo-C₁₋₆ alcoxi; (5) azido; (6) halo; (7) (heterociclil)oxi C₂₋₉; (8) hidroxilo; (9) nitro; (10) oxo (por ejemplo, carboxialdehído o acilo); (11) espirociclilo C₁₋₇; (12) tioalcoxi; (13) tiol; (14) -CO₂R^A, donde R^A se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b) alqueno C₂₋₂₀ (por ejemplo, alqueno C₂₋₆), (c) arilo C₆₋₁₀, (d) hidrógeno, (e) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, (f) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6 o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno

de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (15) -C(O)NR^{B'}R^{C'}, donde cada uno de R^{B'} y R^{C'} se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀, y (d) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo; (16) -SO₂R^{D'}, donde R^{D'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, y (d) hidroxilo; (17) -SO₂NR^{E'}R^{F'}, donde cada uno de R^{E'} y R^{F'} se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo; (18) -C(O)R^{G'}, donde R^{G'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b) alqueno C₂₋₂₀ (por ejemplo, alqueno C₂₋₆), (c) arilo C₆₋₁₀, (d) hidrógeno, (e) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, (f) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (19) -NR^{H'}C(O)R^{I'}, donde R^{H'} se selecciona del grupo que consiste en (a1) hidrógeno y (b1) alquilo C₁₋₆ y R^{I'} se selecciona del grupo que consiste en (a2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b2) alqueno C₂₋₂₀ (por ejemplo, alqueno C₂₋₆), (c2) arilo C₆₋₁₀, (d2) hidrógeno, (e2) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g2) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h2) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; (20) -NR^{J'}C(O)OR^{K'}, donde R^{J'} se selecciona del grupo que consiste en (a1) hidrógeno y (b1) alquilo C₁₋₆, y R^{K'} se selecciona del grupo que consiste en (a2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆), (b2) alqueno C₂₋₂₀ (por ejemplo, alqueno C₂₋₆), (c2) arilo C₆₋₁₀, (d2) hidrógeno, (e2) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo, (f2) amino-C₁₋₂₀ alquilo, (g2) polietilenglicol de -(CH₂)_{s2}(OCH₂CH₂)_{s1}(CH₂)_{s3}OR', donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y R' es H o alquilo C₁₋₂₀, y (h2) amino-polietilenglicol de -NR^{N1}(CH₂)_{s2}(CH₂CH₂O)_{s1}(CH₂)_{s3}NR^{N1}, donde s1 es un entero de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 6 o de 1 a 4), cada uno de s2 y s3, independientemente, es un entero de 0 a 10 (por ejemplo, de 0 a 4, de 0 a 6, de 1 a 4, de 1 a 6, o de 1 a 10), y cada R^{N1} es, independientemente, hidrógeno o alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido; y (21) amidina. En algunos casos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención.

El término "aminoalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, tal como se define en esta invención, sustituido por un grupo amino, como se define en esta invención. El alquilo y el amino pueden sustituirse adicionalmente con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para el grupo respectivo (por ejemplo, CO₂R^{A'}, donde R^{A'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀, por ejemplo, carboxi).

El término "aminoalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo amino, tal como se define en esta invención. El alquilo y el amino pueden sustituirse adicionalmente con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para el grupo respectivo (por ejemplo, CO₂R^{A'}, donde R^{A'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀, por ejemplo, carboxi y/o un grupo protector de N).

El término "aminoalqueno", como se usa en esta invención, representa un grupo alqueno, tal como se define en esta invención, sustituido por un grupo amino, como se define en esta invención. Cada uno del alqueno y amino se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para el grupo respectivo (por ejemplo, CO₂R^{A'}, donde R^{A'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀, por ejemplo, carboxi y/o un grupo protector de N).

El término "aminoalquino", como se usa en esta invención, representa un grupo alquino, como se define en esta invención, sustituido por un grupo amino, como se define en esta invención. El alquino y el amino pueden sustituirse adicionalmente con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para el grupo respectivo (por ejemplo, CO₂R^{A'}, donde R^{A'} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀, por ejemplo, carboxi y/o un grupo protector de N).

El término "arilo", como se usa en esta invención, representa un sistema anular carbocíclico mono, bicíclico o multicíclico que tiene uno o dos anillos aromáticos y se ejemplifica por fenilo, naftilo, 1,2-dihidronaftilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, antraceno, fenantreno, fluoreno, indano, indeno y similares, y puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituyentes que se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: (1) acilo C₁₋₇ (por ejemplo, carboxialdehído); (2) alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ alquilo, alquilsulfino C₁₋₆ alquilo, amino-C₁₋₆ alquilo, azido-C₁₋₆ alquilo, (carboxialdehído)-alquilo C₁₋₆, halo-C₁₋₆ alquilo (por ejemplo, perfluoroalquilo), hidroxi-C₁₋₆ alquilo, nitro-C₁₋₆ alquilo o tioalcoxi C₁₋₆ alquilo); (3) C₁₋₂₀ alcoxi (por ejemplo, alcoxi C₁₋₆, tal como perfluoroalcoxi); (4) alquilsulfino C₁₋₆; (5) arilo C₆₋₁₀; (6) amino; (7) C₁₋₆ alquilo-C₆₋₁₀ arilo; (8) azido; (9) cicloalquilo C₃₋₈; (10) cicloalquilo C₁₋₆ alk-C₃₋₈; (11) halo; (12) heterociclilo C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₁₂); (13) (heterociclilo C₁₋₁₂)oxi; (14) hidroxilo; (15) nitro; (16) tioalcoxi C₁₋₂₀ (por ejemplo, tioalcoxi C₁₋₆); (17) -(CH₂)_qCO₂R^{A'}, donde

q es un número entero de cero a cuatro, y R^{A^1} se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C_{1-6} , (b) arilo C_{6-10} , (c) hidrógeno y (d) arilo C_{1-6} alk- C_{6-10} ; (18) $-(CH_2)_qCONR^B R^C$, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^B y R^C se seleccionan independientemente del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C_{1-6} , (c) arilo C_{6-10} y (d) arilo C_{1-6} alk- C_{6-10} ; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^D$, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^D se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo, (b) arilo C_{6-10} y (c) arilo alk- C_{6-10} ; (20) $-(CH_2)_qSO_2NR^E R^F$, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde cada uno de R^E y R^F se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C_{1-6} , (c) arilo C_{6-10} y (d) arilo C_{1-6} alk- C_{6-10} ; (21) tiol; (22) ariloxi C_{6-10} ; (23) cicloalcoxi C_{3-8} ; (24) arilo C_{6-10} -alcoxi C_{1-6} ; (25) heterociclilo C_{1-6} alk- C_{1-12} (por ejemplo, heteroarilo C_{1-6} alk- C_{1-12}); (26) alqueno C_{2-20} ; y (27) alquinilo C_{2-20} . En algunos casos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención. Por ejemplo, el grupo alqueno de un alcarilo C_1 -alcarilo o un alheterociclilo C_1 se puede sustituir adicionalmente con un grupo oxo para proporcionar el grupo sustituyente ariloilo y (heterociclilo)oil respectivo.

El término "arilalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcarilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno. Los ejemplos de grupos arilalcoxi no sustituidos incluyen de 7 a 30 carbonos (por ejemplo, de 7 a 16 o de 7 a 20 carbonos, tal como alcoxi C_{6-10} arilo- C_{1-6} , alcoxi C_{6-10} arilo- C_{1-10} o alcoxi C_{6-10} arilo- C_{1-20}). En algunos casos, el grupo arilalcoxi se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención.

El término "arilalcoxycarbonilo", como se usa en esta invención, representa un grupo arilalcoxi, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un carbonilo (por ejemplo, $-C(O)-O$ -alquil-arilo). Los ejemplos de grupos arilalcoxi no sustituidos incluyen de 8 a 31 carbonos (p. ej., de 8 a 17 o de 8 a 21 carbonos, tales como alcoxycarbonilo C_{6-10} arilo- C_{1-6} , alcoxycarbonilo C_{6-10} arilo- C_{1-10} o alcoxycarbonilo C_{6-10} arilo- C_{1-20}). En algunos casos, el grupo arilalcoxycarbonilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención.

El término "ariloxi" representa un sustituyente químico de fórmula $-OR'$, donde R' es un grupo de casos arilo de 6 a 18 carbonos, a menos que se especifique lo contrario. En algunos casos, el grupo arilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención.

El término "ariloilo", como se usa en esta invención, representa un grupo arilo, como se define en esta invención, que está unido al grupo molecular original a través de un grupo carbonilo. Los ejemplos de grupos ariloilo no sustituidos son de 7 a 11 carbonos. En algunos casos, el grupo arilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención.

El término "azido" representa un grupo $-N_3$, que también se puede representar como $-N=N=N$.

El término "bicíclico", como se usa en esta invención, se refiere a una estructura que tiene dos anillos, que pueden ser aromáticos o no aromáticos. Las estructuras bicíclicas incluyen grupos espirociclilo, como se define en esta invención, y dos anillos que comparten uno o más puentes, donde dichos puentes pueden incluir un átomo o una cadena que incluye dos, tres o más átomos. Los ejemplos de grupos bicíclicos incluyen un grupo carbociclilo bicíclico, donde el primer y segundo anillos son grupos carbociclilo, como se define en esta invención; un grupo arilo bicíclico, donde el primer y segundo anillos son grupos arilo, como se define en esta invención; grupos heterociclilo bicíclicos, donde el primer anillo es un grupo heterociclilo y el segundo anillo es un grupo carbociclilo (por ejemplo, arilo) o heterociclilo (por ejemplo, heteroarilo); y grupos heteroarilo bicíclicos, donde el primer anillo es un grupo heteroarilo y el segundo anillo es un grupo carbociclilo (por ejemplo, arilo) o heterociclilo (por ejemplo, heteroarilo). En algunos casos, el grupo bicíclico se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención para los grupos cicloalquilo, heterociclilo y arilo.

El término "boranilo", como se usa en esta invención, representa $-B(R^{B1})_3$, donde cada R^{B1} se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en H y alquilo opcionalmente sustituido. En algunos casos, el grupo boranilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes como se define en esta invención para alquilo.

Los términos "carbocíclico" y "carbociclilo", como se usan en esta invención, se refieren a una estructura monocíclica, bicíclica o tricíclica de C_{3-12} opcionalmente sustituida en la que los anillos, que pueden ser aromáticos o no aromáticos, están formados por átomos de carbono. Las estructuras carbocíclicas incluyen grupos cicloalquilo, cicloalqueno y arilo.

El término "carbamoilo", como se usa en esta invención, representa $-C(O)-N(R^{N1})_2$, donde el significado de cada R^{N1} se encuentra en la definición de "amino" proporcionada en esta invención.

El término "carbamoilalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo carbamoilo, como se define en esta invención. El grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

El término "carbamilo", como se usa en esta invención, se refiere a un grupo carbamato que tiene la estructura $-NR^{N1}C(=O)OR$ u $-OC(=O)N(R^{N1})_2$, donde el significado de cada R^{N1} se encuentra en la definición de "amino" proporcionada en esta invención, y R es alquilo, cicloalquilo, alquicicloalquilo, arilo, alcarilo, heterociclilo (por ejemplo,

heteroarilo) o alqheterociclilo (por ejemplo, alqheteroarilo), como se define en esta invención.

El término "carbonilo", como se usa en esta invención, representa un grupo C(O), que también se puede representar como C=O.

5

El término "carboxialdehído" representa un grupo acilo que tiene la estructura —CHO.

El término "carboxi", como se usa en esta invención, significa —CO₂H.

10 El término "carboxialcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, como se define en esta invención, sustituido por un grupo carboxi, como se define en esta invención. El grupo alcoxi se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para el grupo alquilo, y el grupo carboxilo se puede sustituir opcionalmente con uno o más grupos protectores de O.

15 El término "carboxialquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo carboxi, como se define en esta invención. El grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención, y el grupo carboxilo se puede sustituir opcionalmente con uno o más grupos protectores de O.

20 El término "carboxiaminoalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo aminoalquilo, como se define en esta invención, sustituido por un carboxi, como se define en esta invención. Cada uno de carboxi, alquilo y amino se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para el grupo respectivo (por ejemplo, CO₂R^A, donde R^A se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alquil-C₆₋₁₀, por ejemplo, carboxi y/o un grupo protector de N y/o un grupo protector de O).

25

El término "ciano", como se usa en esta invención, representa un grupo —CN.

El término "cicloalcoxi" representa un sustituyente químico de fórmula —OR, donde R es un grupo cicloalquilo C₃₋₈, como se define en esta invención, a menos que se especifique lo contrario. El grupo cicloalquilo puede estar sustituido además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención. Los ejemplos de grupos cicloalcoxi no sustituidos son de 3 a 8 carbonos. En algunos casos, el grupo cicloalquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

30

El término "cicloalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo hidrocarburo cíclico no aromático saturado o insaturado monovalente de tres a ocho carbonos, a menos que se especifique lo contrario, y se ejemplifica mediante ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, heptilo de biciclo y similares. Cuando el grupo cicloalquilo incluye un doble enlace carbono-carbono, el grupo cicloalquilo puede denominarse grupo "cicloalquenilo". Los ejemplos de grupos cicloalquenilo incluyen ciclopentenilo, ciclohexenilo y similares. Los grupos cicloalquilo de la presente descripción se pueden sustituir opcionalmente con:

35

40

(1) C₁₋₇ acilo (por ejemplo, carboxialdehído); (2) C₁₋₂₀ alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ alquilo, alquilsulfínilo C₁₋₆ alquilo, amino-C₁₋₆ alquilo, azido-C₁₋₆ alquilo, (carboxialdehído)-alquilo C₁₋₆, halo-C₁₋₆ alquilo (por ejemplo, perfluoroalquilo), hidroxio-C₁₋₆ alquilo, nitro-C₁₋₆ alquilo o tialcoxi C₁₋₆ alquilo); (3) C₁₋₂₀ alcoxi (por ejemplo, alcoxi C₁₋₆, tal como perfluoroalcoxi); (4) C₁₋₆ alquilsulfínilo; (5) C₆₋₁₀ arilo; (6) amino; (7) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo; (8) azido; (9) C₃₋₈ cicloalquilo; (10) cicloalquilo C₁₋₆ alk-C₃₋₈; (11) halo; (12) heterociclilo C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₁₂); (13) (heterociclilo C₁₋₁₂)oxi; (14) hidroxio; (15) nitro; (16) tialcoxi C₁₋₂₀ (por ejemplo, tialcoxi C₁₋₆); (17) —(CH₂)_qCO₂R^A, donde q es un número entero de cero a cuatro, y R^A se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀; (18) —(CH₂)_qCONR^BR^C, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^B y R^C se seleccionan independientemente del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₆₋₁₀, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀; (19) —(CH₂)_qSO₂R^D, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^D se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₆₋₁₀, (b) arilo C₆₋₁₀ y

45

50

(c) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀; (20) —(CH₂)_qSO₂NR^ER^F, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde cada uno de R^E y R^F se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₆₋₁₀, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀; (21) tiol; (22) ariloxi C₆₋₁₀; (23) cicloalcoxi C₃₋₈; (24) arilo C₆₋₁₀-alcoxi C₁₋₆; (25) heterociclilo C₁₋₆ alk-C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₆ alk-C₁₋₁₂); (26) oxo; (27) C₂₋₂₀ alquenilo; y (28) C₂₋₂₀ alquinilo. En algunos casos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención. Por ejemplo, el grupo alquilenilo de un alcarilo C₁-alcarilo o un alqheterociclilo C₁ se puede sustituir adicionalmente con un grupo oxo para proporcionar el grupo sustituyente ariloilo y (heterociclil)oil respectivo

55

El término "diastereómero", como se usa en esta invención, significa estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí y no son superponibles entre sí.

60 El término "cantidad eficaz" de un agente, como se usa en esta invención, es esa cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados, por ejemplo, resultados clínicos, y, como tal, una "cantidad eficaz" depende del contexto en el que se aplica. Por ejemplo, en el contexto de la administración de un agente que trata el cáncer, una cantidad eficaz 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.

65

El término "enantiómero", como se usa en esta invención, significa cada forma ópticamente activa individual de un

compuesto de la descripción, que tiene una pureza óptica o exceso enantiomérico (como se determina mediante procedimientos estándar en la técnica) de al menos un 80 % (es decir, al menos un 90 % de un enantiómero y como máximo un 10 % del otro enantiómero), preferentemente al menos un 90 % y más preferentemente al menos un 98 %.

5 El término «halo», como se usa en esta invención, representa un halógeno seleccionado de bromo, cloro, yodo o flúor.

10 El término "haloalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, como se define en esta invención, sustituido por un grupo halógeno (es decir, F, Cl, Br o I). Un haloalcoxi puede sustituirse con uno, dos, tres o, en el caso de grupos alquilo de dos carbonos o más, cuatro halógenos. Los grupos haloalcoxi incluyen perfluoroalcoxi (por ejemplo, -OCF₃), -OCHF₂, -OCH₂F, -OCCl₃, -OCH₂CH₂Br, -OCH₂CH(CH₂CH₂Br)CH₃ y -OCHICH₃. En algunos casos, el grupo haloalcoxi se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para grupos alquilo.

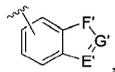
15 El término "haloalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo halógeno (es decir, F, Cl, Br o I). Un haloalquilo puede sustituirse con uno, dos, tres o, en el caso de grupos alquilo de dos carbonos o más, cuatro halógenos. Los grupos haloalquilo incluyen perfluoroalquilos (por ejemplo, -CF₃), -CHF₂, -CH₂F, -CCl₃, -CH₂CH₂Br, -CH₂CH(CH₂CH₂Br)CH₃ y -CHICH₃. En algunos casos, el grupo haloalquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para grupos alquilo.

20 El término "heteroalquileno", como se usa en esta invención, se refiere a un grupo alquileno, como se define en esta invención, en el que uno o dos de los átomos de carbono constituyentes se han reemplazado cada uno por nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunos casos, el grupo heteroalquileno se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención para los grupos alquileno.

25 El término "heteroarilo", como se usa en esta invención, representa ese subconjunto de heterociclos, como se define en esta invención, que son aromáticos: es decir, contienen $4n+2$ pi electrones dentro del sistema de anillo mono o multicíclico. Los ejemplos de grupos heteroarilo no sustituidos son de 1 a 12 (por ejemplo, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 2 a 12, 2 a 11, 2 a 10 o 2 a 9) carbonos. En algunos casos, el heteroarilo se sustituye con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define para un grupo heterocíclico.

30 El término "heterocíclico", como se usa en esta invención, representa un anillo de 5, 6 o 7 miembros, a menos que se especifique lo contrario, que contiene uno, dos, tres o cuatro heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. El anillo de 5 miembros tiene de cero a dos enlaces dobles, y los anillos de 6 y 7 miembros tienen de cero a tres enlaces dobles. Los ejemplos de grupos heterocíclico no sustituidos son de 1 a 12 (por ejemplo, 1 a 11, 1 a 10, 1 a 9, 2 a 12, 2 a 11, 2 a 10 o 2 a 9) carbonos. El término "heterocíclico" también representa un compuesto heterocíclico que tiene una estructura multicíclica unida en la que uno o más carbonos y/o heteroátomos forman puentes entre dos miembros no adyacentes de un anillo monocíclico, por ejemplo, un grupo quinuclidinilo. El término "heterocíclico" incluye grupos bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos en los que cualquiera de los anillos heterocíclicos anteriores está fusionado a uno, dos o tres anillos carbocíclicos, por ejemplo, un anillo arilo, un anillo ciclohexano, un anillo ciclohexeno, un anillo ciclopentano, un anillo ciclopenteno u otro anillo heterocíclico monocíclico, tal como indolilo, quinolilo, isoquinolilo, isoquinolilo, tetrahydroquinolilo, benzofurilo, benzotienilo y similares. Los ejemplos de heterociclos fusionados incluyen tropanos y 1,2,3,5,8a-hexahidroindolizina. Los heterocíclicos incluyen pirrolilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, pirazolilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piridilo, piperidinilo, homopiperidinilo, pirazinilo, piperazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, isoxazolilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiazolilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, isotiazolidinilo, indolilo, indazolilo, quinolilo, isoquinolilo, quinoxalinilo, dihydroquinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, benzotiadiazolilo, furilo, tienilo, tiazolidinilo, isotiazolil, triazolilo, tetrazolilo, oxadiazolilo (por ejemplo, 1,2,3-oxadiazolilo), purinilo, tiadiazolilo (por ejemplo, 1,2,3-tiadiazolilo), tetrahydrofuranilo, dihydrofuranilo, tetrahydrotienilo, dihydrotienilo, dihydroindolilo, dihydroquinolilo, tetrahydroquinolilo, tetrahydroisoquinolilo, dihydroisoquinolilo, piranilo, dihydropiranilo, ditiazolilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, benzotienilo, y similares, incluyendo las formas dihidro y tetrahidro de los mismos, donde uno o más enlaces dobles se reducen y se reemplazan con hidrógenos. Aún otros heterociclos ejemplares incluyen: 2,3,4,5-tetrahidro-2-oxo-oxazolilo; 2,3-dihidro-2-oxo-1H-imidazolilo; 2,3,4,5-tetrahidro-5-oxo-1H-pirazolilo (por ejemplo, 2,3,4,5-tetrahidro-2-fenil-5-oxo-1H-pirazolilo); 2,3,4,5-tetrahidro-2,4-dioxo-1H-imidazolilo (por ejemplo, 2,3,4,5-tetrahidro-2,4-dioxo-5-metil-5-fenil-1H-imidazolilo); 2,3-dihidro-2-tioxo-1,3,4-oxadiazolilo (por ejemplo, 2,3-dihidro-2-tioxo-5-fenil-1,3,4-oxadiazolilo); 4,5-dihidro-5-oxo-1H-triazolilo (por ejemplo, 4,5-dihidro-3-metil-4-amino-5-oxo-1H-triazolilo); 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxopiridinilo (por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxo-3,3-diethylpiridinilo); 2,6-dioxo-piperidinilo (por ejemplo, 2,6-dioxo-3-etil-3-fenilpiperidinilo); 1,6-dihidro-6-oxopiridiminilo; 1,6-dihidro-4-oxopiridiminilo (por ejemplo, 2-(metiltio) -1,6-dihidro-4-oxo-5-metilpirimidin-1-il); 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxopirimidinilo (por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxo-3-etilpirimidinilo); 1,6-dihidro-6-oxo-piridazinilo (por ejemplo, 1,6-dihidro-6-oxo-3-etilpiridazinilo); 1,6-dihidro-6-oxo-1,2,4-triazinilo (por ejemplo, 1,6-dihidro-5-isopropil-6-oxo-1,2,4-triazinilo); 2,3-dihidro-2-oxo-1H-indolilo (por ejemplo, 3,3-dimetil-2,3-dihidro-2-oxo-1H-indolilo y 2,3-dihidro-2-oxo-3,3'-espiropropano-1H-indol-1-il); 1,3-dihidro-1-oxo-2H-iso-indolilo; 1,3-dihidro-1,3-dioxo-2H-iso-indolilo; 1H-benzopirazolilo (por ejemplo, 1-(etoxicarbonilo) - 1H-benzopirazolilo); 2,3-dihidro-2-oxo-1H-bencimidazolilo (por ejemplo, 3-etil-2,3-dihidro-2-oxo-1H-

bencimidazolilo); 2,3-dihidro-2-oxo-benzoxazolilo (por ejemplo, 5-cloro-2,3-dihidro-2-oxo-benzoxazolilo); 2,3-dihidro-2-oxo-benzoxazolilo; 2-oxo-2H-benzopirano; 1,4-benzodioxano; 1,3-benzodioxano; 2,3-dihidro-3-oxo, 4H-1,3-benzotiazinilo; 3,4-dihidro-4-oxo-3H-quinazolinilo (por ejemplo, 2-metil-3,4-dihidro-4-oxo-3H-quinazolinilo); 1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxo-3H-quinazolilo (por ejemplo, 1-etil-1,2,3,4-tetrahidro-2,4-dioxo-3H-quinazolilo); 1,2,3,6-tetrahidro-2,6-dioxo-7H-purinilo (por ejemplo, 1,2,3,6-tetrahidro-1,3-dimetil-2,6-dioxo-7 H -purinilo); 1,2,3,6-tetrahidro-2,6-dioxo-1 h-purinilo (por ejemplo, 1,2,3,6-tetrahidro-3,7-dimetil-2,6-dioxo-1 H-purinilo); 2-oxobenz[c,d]indolilo; 1,1-dioxo-2H-naft[1,8-c,d] isotiazolilo; y 1,8-naftilendicarboxamido. Los heterocíclicos adicionales incluyen 3,3a, 4,5,6,6a-hexahidropirrol[3,4-b]pirrol-(2H)-il, y 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptan-2-il, homopiperazinil (o diazepanilo), tetrahidropirano, ditiazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, oxepanilo, tiepanilo, azocanilo, oxecanilo y tiocanilo. Los grupos heterocíclicos incluyen también grupos de la fórmula



donde

E' se selecciona del grupo que consiste en -N- y -CH-; F' se selecciona del grupo que consiste en -N=CH-, -NH-CH₂-, -NH-C(O)-, -NH-, -CH=N-, -CH₂-NH-, -C(O)-NH-, -CH=CH-, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂O-, -OCH₂-, -O-, y -S-; y G' se selecciona del grupo que consiste en -CH- y -N-. Cualquiera de los grupos heterocíclicos mencionados en esta invención puede estar opcionalmente sustituido con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: (1) C₁₋₇ acilo (por ejemplo, carboxialdehído); (2) C₁₋₂₀ alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆ alquilo, alquilsulfino C₁₋₆ alquilo, amino-C₁₋₆ alquilo, azido-C₁₋₆ alquilo, (carboxialdehído)-alquilo C₁₋₆, halo-C₁₋₆ alquilo (por ejemplo, perfluoroalquilo), hidroxio-C₁₋₆ alquilo, nitro-C₁₋₆ alquilo o tioalcoxi C₁₋₆ alquilo); (3) C₁₋₂₀ alcoxi (por ejemplo, alcoxi C₁₋₆, tal como perfluoroalcoxi); (4) C₁₋₆ alquilsulfino; (5) C₆₋₁₀ arilo; (6) amino; (7) C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀ arilo; (8) azido; (9) C₃₋₈ cicloalquilo; (10) cicloalquilo C₁₋₆ alk-C₃₋₈; (11) halo; (12) heterociclilo C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₂₋₁₂); (13) (heterociclilo C₁₋₁₂)oxi; (14) hidroxio; (15) nitro; (16) tioalcoxi C₁₋₂₀ (por ejemplo, tioalcoxi C₁₋₆); (17) -(CH₂)_qCO₂R^A, donde q es un número entero de cero a cuatro, y R^A se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀, (c) hidrógeno y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀; (18) -(CH₂)_qCONR^BR^C, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^B y R^C se seleccionan independientemente del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀; (19) -(CH₂)_qSO₂R^D, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde R^D se selecciona del grupo que consiste en (a) alquilo C₁₋₆, (b) arilo C₆₋₁₀ y (c) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀; (20) -(CH₂)_qSO₂NR^ER^F, donde q es un número entero de cero a cuatro y donde cada uno de R^E y R^F se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en (a) hidrógeno, (b) alquilo C₁₋₆, (c) arilo C₆₋₁₀ y (d) arilo C₁₋₆ alk-C₆₋₁₀; (21) tío; (22) arilo C₆₋₁₀; (23) cicloalcoxi C₃₋₈; (24) arilalcoxi; (25) heterociclilo C₁₋₆ alk-C₁₋₁₂ (por ejemplo, heteroarilo C₁₋₆ alk-C₁₋₁₂); (26) oxo; (27) heterociclilo C₁₋₁₂)imino; (28) alqueno C₂₋₂₀; y (29) alquino C₂₋₂₀. En algunos casos, cada uno de estos grupos se puede sustituir aún más como se describe en esta invención. Por ejemplo, el grupo alqueno de un alquilo C₁-alcarilo o un alquilo C₁-heterociclilo se puede sustituir adicionalmente con un grupo oxo para proporcionar el grupo sustituyente ariloilo y (heterociclilo)oil respectivo.

El término "(heterociclilo) imino", como se usa en esta invención, representa un grupo heterociclilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo imino. En algunas realizaciones, el grupo heterociclilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

El término "(heterociclilo)oxi", como se usa en esta invención, representa un grupo heterociclilo, como se definen casos en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno. En algunos casos, el grupo heterociclilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

El término "(heterociclilo)oil", como se usa en esta invención, representa un grupo heterociclilo, como se define en esta invención, unido al grupo molecular original a través de un grupo carbonilo. En algunos casos, el grupo heterociclilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en esta invención.

El término "hidrocarburo", como se usa en esta invención, representa un grupo que consiste solo en átomos de carbono e hidrógeno.

El término "hidroxio", como se usa en esta invención, representa un grupo —OH. En algunos casos, el grupo hidroxio se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes (por ejemplo, grupos protectores de O) como se define en esta invención para un alquilo.

El término "hidroxialqueno", como se usa en esta invención, representa un grupo alqueno, como se define en esta invención, sustituido por uno a tres grupos hidroxio, con la condición de que no más de un grupo hidroxio pueda estar unido a un único átomo de carbono del grupo alquilo, y se ejemplifica mediante dihidroxipropeno, hidroxioisopenteno y similares. En algunos casos, el grupo hidroxialqueno se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes (por ejemplo, grupos protectores de O) como se define en esta invención para un alquilo.

El término "hidroxialquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta

invención, sustituido por uno a tres grupos hidroxilo, con la condición de que no más de un grupo hidroxilo pueda estar unido a un único átomo de carbono del grupo alquilo, y se ejemplifica mediante hidroximetilo, dihidroxipropilo y similares. En algunos casos, el grupo hidroxialquilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes (por ejemplo, grupos protectores de O) como se define en esta invención para un alquilo.

El término "hidroxialquinilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquinilo, como se define en esta invención, sustituido por uno a tres grupos hidroxilo, con la condición de que no se pueda unir más de un grupo hidroxilo a un único átomo de carbono del grupo alquilo. En algunos casos, el grupo hidroxialquinilo se puede sustituir con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes (por ejemplo, grupos protectores de O) como se define en esta invención para un alquilo.

El término "isómero", como se usa en esta invención, significa cualquier tautómero, estereoisómero, enantiómero o diastereómero de cualquier compuesto de la descripción. Se reconoce que los compuestos de la descripción pueden tener uno o más centros quirales y/o enlaces dobles y, por lo tanto, existen como estereoisómeros, tal como los isómeros de doble enlace (es decir, (+) o (-) o los isómeros *cis/trans*). Según la descripción, las estructuras químicas que se muestran en esta invención, y, por lo tanto, los compuestos de la descripción, abarcan todos los estereoisómeros correspondientes, es decir, tanto la forma estereoméricamente pura (por ejemplo, geoméricamente pura, enantioméricamente pura, o diastereoméricamente pura) y mezclas estereoisoméricas y enantioméricas, por ejemplo, racematos. Las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas de compuestos de la descripción se pueden resolver típicamente en sus enantiómeros componentes o estereoisómeros por procedimientos bien conocidos, tales como cromatografía de gases de fase quiral, cromatografía líquida de alta potencia de fase quiral, que cristaliza el compuesto como un complejo de sal quiral, o cristaliza el compuesto en un solvente quiral. Los enantiómeros y los estereoisómeros también se pueden obtener a partir de intermedios, reactivos y catalizadores estereomérica o enantioméricamente puros por procedimientos sintéticos asimétricos bien conocidos.

El término "amino protegido de N", como se usa en esta invención, se refiere a un grupo amino, como se define en esta invención, al que se une a uno o dos grupos protectores de N, como se define en esta invención.

El término "grupo protector de N", como se usa en esta invención, representa aquellos grupos destinados a proteger a un grupo amino contra reacciones no deseadas durante los procedimientos sintéticos. Los grupos protectores de N comúnmente utilizados se describen en Greene, "Grupos de protección en la síntesis orgánica", 3ª edición (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999). Los grupos protectores de N incluyen grupos de acilo, ariloilo o carbamilo tales como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, t-butilacetilo, 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, o-nitrofenoxiacetilo, α -clorobutirilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, 4-nitrobenzoilo, y auxiliares quirales, tales como D, L o D, L-aminoácidos protegidos o no protegidos tales como alanina, leucina, fenilalanina y similares; grupos que contienen sulfonilo, tales como bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo, y similares; grupos de formación de carbamato tales como benciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 2,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,4,5-trimetoxibenciloxicarbonilo, 1-(p-bifenilil)-1-metiletoxicarbonilo, α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, benzhidroxilo carbonilo, t-butiloxicarbonilo, diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, metoxicarbonilo, alililoxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, fenoxicarbonilo, 4-nitrofenoxi carbonilo, fluorenil-9-metoxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, feniltiocarbonilo, y similares, grupos alcarilos tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo, y similares y grupos sililo, tales como trimetilsililo, y similares. Los grupos protectores de N preferidos son formil, acetilo, benzoilo, pivaloilo, t-butilacetilo, alanilo, fenilsulfonilo, bencilo, t-butiloxicarbonilo (Boc) y benciloxicarbonilo (Cbz).

El término "nitro", como se usa en esta invención, representa un grupo $-\text{NO}_2$.

El término "grupo protector de O", como se usa en esta invención, representa aquellos grupos destinados a proteger un grupo que contiene oxígeno (por ejemplo, fenol, hidroxilo o carbonilo) contra reacciones no deseadas durante procedimientos sintéticos. Los grupos protectores de O comúnmente utilizados se describen en Greene, "Grupos de protección en la síntesis orgánica", 3ª Edición (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999). Los ejemplos de grupos protectores de O incluyen grupos acilo, ariloilo o carbamilo, tales como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, t-butilacetilo, 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, o-nitrofenoxiacetilo, α -clorobutirilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, t-butildimetilsililo, tri-iso-propilsililoximetilo, 4,4'-dimetoxitritilo, isobutirilo, fenoxiacetilo, 4-isopropilpehenoxiacetilo, dimetilformamidino y 4-nitrobenzoilo; grupos alquilcarbonilo, tales como acilo, acetilo, propionilo, pivaloilo y similares; grupos arilcarbonilo opcionalmente sustituidos, tales como benczoilo; grupos sililo, tales como trimetilsililo (TMS), tert-butildimetilsililo (TBDMS), tri-iso-propilsililoximetil (TOM), triisopropilsilil (TIPS), y similares; grupos de éter con el hidroxilo, tal metil, metoximetilo, tetrahidropirano, bencilo, p-metoxibencilo, tritilo y similares; alcoxicarbonilos, tales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, isopropoxicarbonilo, n-isopropoxicarbonilo, n-butiloxicarbonilo, isobutiloxicarbonilo, sec-butiloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo, 2-etilhexiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, metiloxicarbonilo, y similares; grupos alcoxialcoxicarbonilo, tales como metoximetoxicarbonilo, etoximetoxicarbonilo, 2-metoxietoxicarbonilo, 2-etoxietoxicarbonilo, 2-butoxietoxicarbonilo, 2-metoxietoxicarbonilo, alililoxicarbonilo, propargentoxicarbonilo, 2-butenoxicarbonilo, 3-metil-2-butenoxicarbonilo, y similares; haloalcoxicarbonilos, tales como 2-cloroetoxicarbonilo, 2-cloroetoxicarbonilo, 2,2,2-

tricloroetoxicarbonilo, y similares; grupos arilalcoxicarbonilo opcionalmente sustituidos, tales como benciloxicarbonilo, p-metilbenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, 2,4-dinitrobenciloxicarbonilo, 3,5-dimetilbenciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxi-carbonilo, fluorenilmetiloxicarbonilo, y similares; y grupos ariloxicarbonilo opcionalmente sustituidos, tales como fenoxicarbonilo, p-nitrofenoxicarbonilo, o-nitrofenoxicarbonilo, 2,4-dinitrofenoxicarbonilo, p-metilfenoxicarbonilo, m-metilfenoxicarbonilo, o-bromofenoxicarbonilo, 3,5-dimetilfenoxicarbonilo, p-clorofenoxicarbonilo, 2-cloro-4-nitrofenoxi-carbonilo, y similares); alquilo, arilo y éteres de alcarilo sustituidos (por ejemplo, tritilo; metiltiometilo; metoximetilo; benciloximetilo; siloximetilo; 2,2,2-tricloroetoximetilo; tetrahidropirano; tetrahidrofuranilo; etoxietil; 1- [2- (trimetilsilil)etoxi]etilo; 2-trimetilsililetilo; éter t-butil; p-clorofenilo, p-metoxifenilo, p-nitrofenilo, bencilo, p-metoxibencilo y nitrobencilo); éteres de sililo (por ejemplo, trimetilsililo; trietilsililo; triisopropilsililo; dimetilisopropilsililo; t-butildimetilsililo; t-butildifenilsililo; tribencilsililo; trifenilsililo; y difenimetilsililo); carbonatos (por ejemplo, metil, metoximetilo; 9-fluorenilmetil; etilo; 2,2,2-tricloroetilo; 2-(trimetilsilil)etilo; vinilo, alilo, nitrofenilo; bencilo; metoxibencilo; 3,4-dimetoxibencilo; y nitrobencilo); grupos protectores de carbonilo (p. ej., grupos acetales y cetales, tales como dimetil acetal, 1,3-dioxolano, y similares; grupos acilales; y grupos ditiano, tales como 1,3-ditianos, 1,3-ditiolano y similares); grupos de protección contra ácidos carboxílicos (por ejemplo, grupos éster, tales como éster metílico, éster bencilico, éster t-butílico, ortoésteres y similares; y grupos de oxazolina.

El término "oxo", como se usa en esta invención, representa =O.

El término "perfluoroalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, donde cada radical hidrógeno unido al grupo alquilo se ha reemplazado por un radical fluoruro. Los grupos perfluoroalquilo se ejemplifican mediante trifluorometilo, pentafluoroetilo y similares.

El término "perfluoroalcoxi", como se usa en esta invención, representa un grupo alcoxi, como se define en esta invención, donde cada radical de hidrógeno unido al grupo alcoxi se ha reemplazado por un radical fluoruro. Los grupos perfluoroalcoxi se ejemplifican mediante trifluorometoxi, pentafluoroetoxi y similares.

El término "espirociclilo", como se usa en esta invención, representa un diradical de alquileo C_{2-7} , cuyos dos extremos están unidos al mismo átomo de carbono del grupo original para formar un grupo espirocíclico, y también un diradical de heteroalquileo C_{1-6} , cuyos dos extremos están unidos al mismo átomo. El radical heteroalquileo que forma el grupo espirociclilo puede contener uno, dos, tres o cuatro heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. En algunas realizaciones, el grupo espirociclilo incluye de uno a siete carbonos, excluyendo el átomo de carbono al que se une el diradical. Los grupos espirociclilo de la descripción pueden estar opcionalmente sustituidos con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes proporcionados en esta invención como sustituyentes opcionales para grupos cicloalquilo y/o heterociclilo.

El término "estereoisómero", como se usa en esta invención, se refiere a todas las formas isoméricas y conformacionales diferentes posibles que un compuesto puede poseer (por ejemplo, un compuesto de cualquier fórmula descrita en esta invención), en particular todas las formas isoméricas estereoquímicas y conformacionales posibles, todos los diastereómeros, enantiómeros y/o conformadores de la estructura molecular básica. Algunos compuestos de la presente descripción pueden existir en diferentes formas tautoméricas, todas estas últimas incluidas dentro del alcance de la presente descripción.

El término "sulfoalquilo", como se usa en esta invención, representa un grupo alquilo, como se define en esta invención, sustituido por un grupo sulfo de $-SO_3H$. En algunas realizaciones, el grupo alquilo puede sustituirse adicionalmente con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención, y el grupo sulfo puede sustituirse adicionalmente con uno o más grupos protectores de O (por ejemplo, como se describe en esta invención).

El término "sulfonilo", como se usa en esta invención, representa un grupo $-S(O)_2$.

El término "tioalcarilo", como se usa en esta invención, representa un sustituyente químico de fórmula -SR, donde R es un grupo alcarilo. En algunos casos, el grupo alcarilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

El término "tioalqheterociclilo", como se usa en esta invención, representa un sustituyente químico de fórmula -SR, donde R es un grupo alqheterociclilo. En algunos casos, el grupo alqheterociclilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

El término "tioalcoxi", como se usa en esta invención, representa un sustituyente químico de fórmula -SR, donde R es un grupo alquilo, como se define en esta invención. En algunos casos, el grupo alquilo se puede sustituir además con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en esta invención.

Compuesto: Como se usa en esta invención, el término "compuesto" pretende incluir todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros e isótopos de las estructuras representadas.

Los compuestos descritos en esta invención pueden ser asimétricos (por ejemplo, que tienen uno o más

estereocentros). Todos los estereoisómeros, tales como enantiómeros y diastereómeros, son contemplados a menos que se indique lo contrario. Los compuestos de la presente descripción que contienen átomos de carbono sustituidos asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. En la técnica se conocen procedimientos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente activos, tales como

5 mediante resolución de mezclas racémicas o mediante síntesis estereoselectiva. Muchos isómeros geométricos de olefinas, enlaces dobles C=N y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en esta invención, y todos estos isómeros estables se contemplan en la presente descripción. Los isómeros geométricos cis y trans de los compuestos de la presente descripción se describen y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas.

10 Los compuestos de la presente descripción también incluyen formas tautoméricas. Las formas tautoméricas son el resultado del intercambio de un enlace sencillo con un enlace doble adyacente y la migración concomitante de un protón. Las formas tautoméricas incluyen tautómeros prototrópicos que son estados de protonación isomérica que tienen la misma fórmula empírica y carga total. Los ejemplos de tautómeros prototrópicos incluyen pares de cetona — enol, pares de amida — ácido imídico, pares de lactama — lactim, pares de amida — ácido imídico, pares de enamina — imina y formas anulares donde un protón puede ocupar dos o más posiciones de un sistema heterocíclico, tal como 1H- y 3H-imidazol, 1H-, 2H- y 4H- 1,2,4-triazol, 1H- y 2H- isoindol y 1H- y 2H-pirazol. Las formas tautoméricas pueden estar en equilibrio o bloqueadas estéricamente en una forma mediante sustitución adecuada.

15 Los compuestos de la presente descripción también incluyen todos los isótopos de los átomos que ocurren en los compuestos intermedios o finales. "Isótopos" se refiere a átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa resultantes de un número diferente de neutrones en los núcleos. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio.

20 Los compuestos y sales de la presente descripción se pueden preparar en combinación con moléculas de solvente o agua para formar solvatos e hidratos mediante procedimientos de rutina.

Conservado: Como se usa en esta invención, el término "conservado" se refiere a nucleótidos o residuos de aminoácidos de una secuencia de polinucleótidos o secuencia de polipéptidos, respectivamente, que son aquellos que

30 ocurren inalterados en la misma posición de dos o más secuencias que se comparan. Los nucleótidos o aminoácidos que se conservan relativamente son aquellos que se conservan entre secuencias más relacionadas que los nucleótidos o aminoácidos que aparecen en otras partes de las secuencias.

En algunos casos, se dice que dos o más secuencias están "completamente conservadas" si son 100 % idénticas entre sí. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias están "altamente conservadas" si son al menos en un 70 % idénticas, al menos en un 80 % idénticas, al menos en un 90 % idénticas o al menos en un 95 % idénticas entre sí. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias están "altamente conservadas" si son alrededor del 70 % idénticas, alrededor del 80 % idénticas, alrededor del 90 % idénticas, alrededor del 95 %, alrededor del 98 % o alrededor del 99 % idénticas entre sí. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias están "conservadas" si

40 son al menos en un 30 % idénticas, al menos en un 40 % idénticas, al menos en un 50 % idénticas, al menos en un 60 % idénticas, al menos en un 70 % idénticas, al menos en un 80 % idénticas, al menos en un 90 % idénticas o al menos en un 95 % idénticas entre sí. En algunos casos, se dice que dos o más secuencias están "conservadas" si son aproximadamente en un 30 % idénticas, aproximadamente en un 40 % idénticas, aproximadamente en un 50 % idénticas, aproximadamente en un 60 % idénticas, aproximadamente en un 70 % idénticas, aproximadamente en un 80 % idénticas, aproximadamente en un 90 % idénticas, aproximadamente en un 95 % idénticas, aproximadamente en un 98 % idénticas o aproximadamente en un 99 % idénticas entre sí. La conservación de la secuencia puede aplicarse a toda la longitud de un oligonucleótido o polipéptido o puede aplicarse a una porción, región o característica de este.

50 *Cíclico o Ciclado:* Como se usa en esta invención, el término «cíclico» se refiere a la presencia de un bucle continuo. Las moléculas cíclicas no necesitan ser circulares, sólo unidas para formar una cadena ininterrumpida de subunidades. Las moléculas cíclicas tales como el ARNm de la presente descripción pueden ser unidades individuales o multímeros o comprender uno o más componentes de una estructura compleja o de orden superior.

55 *Citostático:* Como se usa en esta invención, "citostático" se refiere a inhibir, reducir, suprimir el crecimiento, división o multiplicación de una célula (*por ejemplo*, una célula de mamífero (*por ejemplo*, una célula humana)), bacteria, virus, hongo, protozoo, parásito, prión o una combinación de los mismos.

60 *Citotóxico:* Como se usa en esta invención, "citotóxico" se refiere a destruir o causar un efecto perjudicial, tóxico o mortal en una célula (*por ejemplo*, una célula de mamífero (*por ejemplo*, una célula humana)), bacteria, virus, hongo, protozoo, parásito, prión o una combinación de los mismos.

Administración: Como se usa en esta invención, "administración" se refiere al acto o manera de administrar un compuesto, sustancia, entidad, resto, carga o carga útil.

65 *Agente de administración:* Como se usa en esta invención, «agente de administración» se refiere a cualquier sustancia

que facilita, al menos en parte, la administración *in vivo* de un polinucleótido a células diana.

Desestabilizado: Como se usa en esta invención, el término "inestable", "desestabilizar" o "región desestabilizadora" significa una región o molécula que es menos estable que una forma inicial, de tipo salvaje o natural de la misma región o molécula.

Etiqueta detectable: Como se usa en esta invención, "etiqueta detectable" se refiere a uno o más marcadores, señales o restos que se unen, incorporan o asocian con otra entidad que se detecta fácilmente mediante procedimientos conocidos en la técnica que incluyen radiografía, fluorescencia, quimioluminiscencia, actividad enzimática, absorbancia y similares. Las etiquetas detectables incluyen radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, enzimas, tintes, iones metálicos, ligandos tales como biotina, avidina, estreptavidina y haptenos, puntos cuánticos y similares. Las etiquetas detectables se pueden ubicar en cualquier posición en los péptidos o proteínas descritas en esta invención. Pueden estar dentro de los aminoácidos, los péptidos o las proteínas, o ubicados en los extremos N o C.

Digerir: Como se usa en esta invención, el término "digerir" significa dividir en partes o componentes más pequeños. Cuando se hace referencia a polipéptidos o proteínas, la digestión resulta en la producción de péptidos.

Distal: Como se usa en esta invención, el término "distal" significa situado lejos del centro o lejos de un punto o región de interés.

Señal de escisión de proteína codificada: Como se usa en esta invención, «señal de escisión de proteína codificada» se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica una señal de escisión de proteína.

Diseñado: Como se usa en esta invención, los aspectos de la descripción se "diseñan" cuando se conciben para tener una característica o propiedad, ya sea estructural o química, que varía desde un punto de partida, tipo salvaje o molécula nativa.

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

Característica: Como se usa en esta invención, una «característica» se refiere a una característica, una propiedad o un elemento distintivo.

Formulación: Como se usa en esta invención, una "formulación" incluye al menos un polinucleótido y un agente de administración.

Fragmento: Un "fragmento", como se usa en esta invención, se refiere a una porción. Por ejemplo, los fragmentos de proteínas pueden comprender polipéptidos obtenidos mediante la digestión de proteínas de longitud completa aisladas de células cultivadas.

Funcional: Como se usa en esta invención, una molécula biológica «funcional» es una molécula biológica en una forma en la que presenta una propiedad y/o actividad por la cual se caracteriza.

Homología: Como se usa en esta invención, el término "homología" se refiere a la relación 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 polipéptido. En algunas realizaciones, se considera que las moléculas poliméricas son "homólogas" entre sí si sus secuencias son al menos en un 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % idénticas o similares. El término «homólogo» se refiere necesariamente a una comparación entre al menos dos secuencias (secuencias de polinucleótidos o polipéptidos). De acuerdo con la descripción, se considera que dos secuencias de polinucleótidos son homólogas si los polipéptidos que codifican son al menos alrededor del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso 99 % para al menos una extensión de al menos aproximadamente 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, las secuencias de polinucleótidos homólogas se caracterizan por la capacidad de codificar una extensión de al menos 4-5 aminoácidos especificados de forma única. Para las secuencias de polinucleótidos de menos de 60 nucleótidos de longitud, la homología se determina mediante la capacidad de codificar una extensión de al menos 4-5 aminoácidos especificados de forma única. De acuerdo con la descripción, se considera que dos secuencias de proteínas son homólogas si las proteínas son al menos aproximadamente en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % idénticas para al menos una extensión de al menos aproximadamente 20 aminoácidos.

Identidad: Como se usa en esta invención, el término "identidad" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, *por ejemplo*, entre moléculas de oligonucleótidos (*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 polinucleótidos, *por ejemplo*, se puede realizar alineando las dos secuencias para fines de comparación óptimos (*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 secuencias no idénticas para fines de comparación). En determinados casos, la longitud de una secuencia alineada a efectos de comparación es 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 el 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación se comparan los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando se ocupa una posición en la primera secuencia por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta la cantidad de huecos y la longitud de cada hueco, que debe introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar mediante el uso de procedimientos tales como los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed. Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputación: 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, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds. Humana Press, Nueva Jersey, 1994; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991

Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de Meyers y Miller (CABIOS, 1989, 4:11-17), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) usando 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 se puede determinar, alternativamente, mediante el uso del programa GAP en el paquete de software GCG mediante el uso de una matriz NWSgapdna.CMP. Los procedimientos comúnmente empleados para determinar el porcentaje de identidad entre secuencias incluyen, pero no se limitan a, los 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 públicamente. Los ejemplos de software informático para determinar la homología entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programa GCG, Devereux, J., y col., Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA Altschul, S. F. y col., J. Molec. Biol., 215, 403 (1990)).

Inhibir la expresión de un gen: Como se usa en esta invención, la frase "inhibir la expresión de un gen" significa causar una reducción en la cantidad de un producto de expresión del gen. El producto de expresión puede ser un ARN transcrito del gen (por ejemplo, un ARNm) o un polipéptido traducido de un ARNm transcrito del gen. Típicamente, una reducción en el nivel de un ARNm da como resultado una reducción en el nivel de un polipéptido traducido de este. El nivel de expresión se puede determinar utilizando técnicas estándar para medir ARNm o proteína.

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

In vivo: Como se usa en esta invención, el término "*in vivo*" se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo (por ejemplo, animal, planta o microbio o célula o tejido de este).

Aislado: Como se usa en esta invención, el término "aislado" se refiere a una sustancia o entidad que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que se asoció (ya sea en la naturaleza o en un entorno experimental). Las sustancias aisladas pueden tener diferentes niveles de pureza en relación con las sustancias de las que se han asociado. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 % o más de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. En algunos casos, los agentes aislados son más que aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más que aproximadamente el 99 % puros. Como se usa en esta invención, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. *Sustancialmente aislado:* Por "sustancialmente aislado" se entiende que el compuesto se separa sustancialmente del entorno en el que se formó o se detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en el compuesto de la presente descripción. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor del 60 %, al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 97 %, o al menos alrededor del 99 % en peso del compuesto de la presente descripción, o una sal de este. Los procedimientos para aislar compuestos y sus sales son rutinarios en la técnica.

Enlazador: Como se usa en esta invención, un enlazador se refiere a un grupo de átomos, por ejemplo, 10-1.000 átomos, y puede estar compuesto por los átomos o grupos tales como, pero no limitado a, carbono, amino, alquilamino, oxígeno, azufre, sulfóxido, sulfonilo, carbonilo e imina. El enlazador se puede unir a un nucleósido o nucleótido modificado en la nucleobase o resto de azúcar en un primer extremo, y a una carga útil, por ejemplo, un agente

detectable o terapéutico, en un segundo extremo. El enlazador puede ser de longitud suficiente para no interferir con la incorporación en una secuencia de ácido nucleico. El enlazador se puede utilizar para cualquier propósito útil, tal como formar multímeros (por ejemplo, mediante el enlace de dos o más polinucleótidos) o conjugados, así como para administrar una carga útil, tal como se describe en esta invención. Los ejemplos de grupos químicos que se pueden incorporar en el enlazador incluyen, pero no se limitan a, alquilo, alqueniilo, alquinilo, amido, amino, éter, tioéter, éster, alquilenilo, heteroalquilenilo, arilo o heterocicliilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido, como se describe en esta invención. Los ejemplos de enlazadores incluyen, pero no se limitan a, alcanos insaturados, polietilenglicoles (por ejemplo, unidades monoméricas de etileno o propilenglicol, por ejemplo, dietilenglicol, dipropilenglicol, trietilenglicol, tripropilenglicol, tetraetilenglicol o tetraetilenglicol) y polímeros de dextrano. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, restos escindibles dentro del enlazador, tales como, por ejemplo, un enlace disulfuro (-S-S-) o un enlace azo (-N=N-), que se pueden escindir usando un agente reductor o fotólisis. Los ejemplos no limitantes de un enlace que se puede escindir selectivamente incluyen un enlace amido que se puede escindir, por ejemplo, mediante el uso de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) u otros agentes reductores y/o fotólisis, así como un enlace éster que se puede escindir, por ejemplo, mediante hidrólisis ácida o básica.

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

De origen natural: Como se usa en esta invención, "de origen natural" significa que existe en la naturaleza sin ayuda artificial.

Vertebrados no humanos: Como se usa en esta invención, un "vertebrado no humano" incluye todos los vertebrados excepto *Homo sapiens*, incluyendo especies salvajes y domesticadas. Los ejemplos de vertebrados no humanos incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, tales como alpaca, banteng, bisonte, camello, gato, ganado, ciervo, perro, burro, gayal, cabra, conejillo de indias, caballo, llama, mulo, cerdo, conejo, reno, búfalo de agua de oveja y yak.

Fuera de la diana: Como se usa en esta invención, "fuera de la diana" se refiere a cualquier efecto no deseado en cualquiera de una o más transcripciones de diana, gen o celular.

Marco de lectura abierto: Como se usa en esta invención, "marco de lectura abierto" u "ORF" se refiere a una secuencia que no contiene un codón de terminación en un marco de lectura dado.

Enlazado operativamente: Como se usa en esta invención, la frase "enlazado operativamente" se refiere a una conexión funcional entre dos o más moléculas, construcciones, transcripciones, entidades, restos o similares.

Paratopo: Como se usa en esta invención, un "paratopo" se refiere al sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

Paciente: Como se usa en esta invención, "paciente" se refiere a un sujeto que puede buscar o necesitar tratamiento, requiere tratamiento, está recibiendo tratamiento, recibirá tratamiento o un sujeto que está bajo el cuidado de un profesional capacitado para una enfermedad o afección particular.

Opcionalmente sustituido: En esta invención, se pretende que una frase de la forma "X opcionalmente sustituido" (por ejemplo, alquilo opcionalmente sustituido) sea equivalente a "X, donde X es opcionalmente sustituido" (por ejemplo, "alquilo, donde dicho alquilo es opcionalmente sustituido"). No pretende significar que la característica "X" (por ejemplo, alquilo) *per se* sea opcional.

Péptido: Como se usa en esta invención, "péptido" es menor o igual que 50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud.

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

Excipientes farmacéuticamente aceptables: La frase "excipiente farmacéuticamente aceptable", como se usa en esta invención, se refiere a cualquier ingrediente que no sea 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, ayudas a la compresión, desintegrantes, colorantes (colores), emolientes, emulsionantes, rellenos (diluyentes), formadores o recubrimientos de película, sabores, fragancias, deslizantes (potenciadores de flujo), lubricantes, conservantes, tintas de impresión, sorbentes, agentes de suspensión o dispersión, edulcorantes y aguas de hidratación. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a:

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, almidón glicolato de sodio, sorbitol, almidón (maíz), ácido esteárico, sacarosa, talco, dióxido de titanio, vitamina A, vitamina E, vitamina C y xilitol.

Sales farmacéuticamente aceptables: La presente descripción también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en esta invención. Como se usa en esta invención, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos donde el compuesto original se modifica mediante la conversión de un ácido o resto base existente a su forma de sal (por ejemplo, mediante la reacción del grupo base libre con un ácido orgánico adecuado). Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales ácidas minerales u orgánicas de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfonato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, bromhidrato, clorhidrato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, 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, sales y similares. Las sales de metales alcalinotérreos o alcalinos representativas incluyen cationes de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como amonio no tóxico, amonio cuaternario y amina, que incluyen, pero no se limitan a, 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 original 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 original que contiene un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas ácidas o básicas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, Sales farmacéuticas: Propiedades, selección y uso, P.H. Stahl y C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008, y Berge y col., Journal of Pharmaceutical Science, 66, 1-19 (1977),

Farmacocinética: Como se usa en esta invención, "farmacocinética" se refiere a una o más propiedades de una molécula o compuesto en lo que se refiere a la determinación del destino de sustancias administradas a un organismo vivo. La farmacocinética se divide en varias áreas, incluyendo el grado y la tasa de absorción, distribución, metabolismo y excreción. Esto se conoce comúnmente como ADME donde: (A) Absorción es el proceso de una sustancia que entra en la circulación sanguínea; (D) Distribución es la dispersión o diseminación de sustancias a través de los fluidos y tejidos del cuerpo; (M) Metabolismo (o Biotransformación) es la transformación irreversible de compuestos originales en metabolitos hija; y (E) Excreción (o Eliminación) se refiere a la eliminación de las sustancias del cuerpo. En raras ocasiones, algunos fármacos se acumulan irreversiblemente en el tejido corporal.

Solvato farmacéuticamente aceptable: El término "solvato farmacéuticamente aceptable", como se usa en esta invención, significa un compuesto de la descripción donde las moléculas de un solvente adecuado se incorporan en la red cristalina. Un solvente adecuado es fisiológicamente tolerable en la dosificación administrada. Por ejemplo, los solvatos se pueden preparar mediante cristalización, recristalización o precipitación a partir de una solución que incluye solventes orgánicos, agua o una mezcla de estos. Los ejemplos de solventes adecuados son etanol, agua (por ejemplo, mono, di y tri-hidratos), N-metilpirrolidinona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), N,N'-dimetilformamida (DMF), N,N'-dimetilacetamida (DMAC), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMEU), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2-(1H)-pirimidinona (DMPU), acetonitrilo (ACN), propilenglicol, acetato de etilo, alcohol bencílico, 2-pirrolidona, benzoato de bencilo y similares. Cuando el agua es el solvente, el solvato se conoce como un "hidrato".

Fisicoquímica: Como se usa en esta invención, "fisicoquímica" significa o se relaciona con una propiedad física y/o química.

Prevención: Como se usa en esta invención, el término "prevención" se refiere a retrasar parcial o completamente el inicio de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección; retrasar parcial o completamente el inicio de uno o más síntomas, características o manifestaciones clínicas de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección particular; retrasar parcial o completamente el inicio de uno o más síntomas, características o manifestaciones de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección particular; retrasar parcial o completamente el progreso de una infección, una enfermedad, trastorno y/o afección particular; y/o disminuir el riesgo de desarrollar patología asociada con la infección, la enfermedad, el trastorno y/o la afección.

Profármaco: La presente descripción también incluye profármacos de los compuestos descritos en esta invención.

Como se usa en esta invención, "profármacos" se refiere a cualquier sustancia, molécula o entidad que se encuentra en una forma predicada para que esa sustancia, molécula o entidad actúe como terapéutica tras una alteración química o física. Los profármacos pueden unirse covalentemente o secuestrarse de alguna manera y que liberan o se convierten en el resto de fármaco activo antes, después o tras administrarse a un sujeto mamífero. Los profármacos se pueden preparar modificando los grupos funcionales presentes en los compuestos de tal manera que las modificaciones se escindan, ya sea en la manipulación de rutina o *in vivo*, a los compuestos originales. Los profármacos incluyen compuestos donde los grupos hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo se unen a cualquier grupo que, cuando se administra a un sujeto mamífero, se escinde para formar un grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo o carboxilo libre, respectivamente. La preparación y el uso de profármacos se trata en T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 de A.C.S. Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987.

Proliferar: Como se usa en esta invención, el término "proliferar" significa crecer, expandirse o aumentar o hacer que crezca, se expanda o aumente rápidamente. "Proliferativo" significa tener la capacidad de proliferar. "Antiproliferativo" significa que tiene propiedades contrarias o no aplicables a las propiedades proliferativas.

Sitio de escisión de proteínas: Como se usa en esta invención, "sitio de escisión de proteína" se refiere a un sitio donde la escisión controlada de la cadena de aminoácidos se puede lograr por medios químicos, enzimáticos o fotoquímicos.

Señal de escisión de proteína: Como se usa en esta invención, "señal de escisión de proteína" se refiere al menos a un aminoácido que señala o marca un polipéptido para la escisión.

Proteínas de interés: Como se usa en esta invención, los términos "proteínas de interés" o "proteínas deseadas" incluyen aquellas proporcionadas en esta invención y fragmentos, mutantes, variantes y alteraciones de estas.

Proximal: Como se usa en esta invención, el término "proximal" significa situado más cerca del centro o de un punto o región de interés.

Purificado: Como se usa en este documento, "purificar", "purificado", "purificación" significa hacer sustancialmente puro o claro desde componentes no deseados, contaminación del material, mezcla o imperfección.

Muestra: Como se usa en esta invención, el término "muestra" o "muestra biológica" se refiere a un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes (por ejemplo, fluidos corporales, que incluyen pero no se limitan a sangre, moco, líquido linfático, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido amniótico, sangre del cordón amniótico, orina, líquido vaginal y semen). Una muestra puede incluir además un homogeneizado, lisado o extracto preparado a partir de un organismo completo o un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes, o una fracción o parte de estos, que incluye pero no se limita a, por ejemplo, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, las secciones externas de la piel, tractos respiratorios, intestinales y genitourinarios, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores, órganos. Una muestra se refiere además a un medio, tal como un caldo o gel de nutrientes, que puede contener componentes celulares, tal como proteínas o molécula de ácido nucleico.

Secuencias de señales: Como se usa en esta invención, la frase "secuencias de señales" se refiere a una secuencia que puede dirigir el transporte o localización de una proteína.

Significativo o Significativamente: Como se usa en esta invención, los términos "significativo" o "significativamente" se usan como sinónimos con el término "sustancialmente".

Dosis unitaria única: Como se usa en esta invención, una "dosis unitaria única" es una dosis de cualquier agente terapéutico administrado en una dosis/a la vez/vía única/punto de contacto único, es decir, evento de administración única.

Similitud: Como se usa en esta invención, el término "similitud" se refiere a la relación general entre moléculas poliméricas, *por ejemplo*, entre moléculas de polinucleótidos (*por ejemplo*, moléculas de ADN y/o moléculas de ARN) y/o entre moléculas de polipéptidos. El cálculo del porcentaje de similitud de moléculas poliméricas entre sí se puede realizar de la misma manera que un cálculo del porcentaje de identidad, excepto que el cálculo del porcentaje de similitud tiene en cuenta las sustituciones conservadoras como se entiende en la técnica.

Dosis dividida: Como se usa en esta invención, una "dosis dividida" es la división de una sola dosis unitaria o dosis diaria total en dos o más dosis.

Estable: Como se usa en esta invención "estable" se refiere a un compuesto que es lo suficientemente robusto como para sobrevivir al aislamiento a un grado útil de pureza de una mezcla de reacción, y preferentemente capaz de formularse en un agente terapéutico eficaz.

Estabilizado: Como se usa en esta invención, el término "estabilizar", "estabilizado", "región estabilizada" significa hacer o volverse estable.

5 *Sujeto:* Como se usa en esta invención, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo al cual se le puede administrar una composición de acuerdo con la descripción, por ejemplo, con fines experimentales, diagnósticos, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y humanos) y/o plantas.

10 *Sustancialmente:* Como se usa en esta invención, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las artes biológicas comprenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o proceden a completarse o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en esta invención para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

15 *Sustancialmente igual:* Como se usa en esta invención en lo que se refiere a las diferencias de tiempo entre dosis, el término significa más/menos el 2 %.

Sustancialmente de forma simultánea: Como se usa en esta invención y como se refiere a múltiples dosis, el término significa dentro de 2 segundos.

20 *Que padece:* Un individuo "que padece" una enfermedad, trastorno y/o afección ha sido diagnosticado con o muestra uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afección.

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

35 *Sintético:* El término "sintético" significa producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. La síntesis de polinucleótidos o polipéptidos u otras moléculas de la presente descripción puede ser química o enzimática.

40 *Células diana:* Como se usa en esta invención, "células diana" se refiere a una o más células de interés. Las células pueden encontrarse *in vitro*, *in vivo*, *in situ* o en el tejido u órgano de un organismo. El organismo puede ser un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano y más preferentemente un paciente.

45 *Agente terapéutico:* El término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico, diagnóstico y/o profiláctico y/o produce un efecto biológico y/o farmacológico deseado.

50 *Cantidad terapéuticamente efectiva:* Como se usa en esta invención, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un agente que se va a administrar (por ejemplo, ácido nucleico, fármaco, agente terapéutico, agente de diagnóstico, agente profiláctico, etc.) que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o es susceptible de padecer una infección, enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, mejorar los síntomas, diagnosticar, prevenir y/o retrasar el inicio de la infección, enfermedad, trastorno y/o afección.

55 *Resultado terapéuticamente efectivo:* Como se usa en esta invención, el término "resultado terapéuticamente efectivo" significa un resultado que es suficiente en un sujeto que padece o es susceptible de padecer una infección, enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, mejorar los síntomas, diagnosticar, prevenir y/o retrasar el inicio de la infección, enfermedad, trastorno y/o afección.

Dosis diaria total: Como se usa en esta invención, una "dosis diaria total" es una cantidad dada o prescrita en un período de 24 horas. Puede administrarse como una sola dosis unitaria.

60 *Factor de transcripción:* Como se usa en esta invención, el término "factor de transcripción" se refiere a una proteína de unión a ADN que regula la transcripción de ADN en ARN, por ejemplo, mediante la activación o represión de la transcripción. Algunos factores de transcripción afectan a la regulación de la transcripción sola, mientras que otros actúan en conjunto con otras proteínas. Algunos factores de transcripción pueden activar y reprimir la transcripción bajo ciertas condiciones. En general, los factores de transcripción se unen a una secuencia diana específica o secuencias altamente similares a una secuencia de consenso específica en una región reguladora de un gen diana. Los factores de transcripción pueden regular la transcripción de un gen diana solo o en un complejo con otras

moléculas.

Tratamiento: Como se usa en esta invención, el término "tratamiento" se refiere a aliviar parcial o completamente, mejorar, favorecer, aliviar, retrasar el inicio, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una infección, enfermedad, trastorno y/o afección particular. Por ejemplo, "tratar" el cáncer puede referirse a la inhibición de la supervivencia, el crecimiento y/o la propagación de un tumor. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que no exhibe signos de una enfermedad, trastorno y/o afección y/o a un sujeto que exhibe solo signos tempranos de una enfermedad, trastorno y/o afección con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad, trastorno y/o afección.

No modificado: Como se usa en esta invención, "no modificado" se refiere a cualquier sustancia, compuesto o molécula antes de ser cambiado de cualquier manera. No modificado 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

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a los aspectos específicos de acuerdo con la descripción descrita en esta invención. El alcance de la presente descripción no pretende limitarse a la descripción anterior, sino que es como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

En las reivindicaciones, los artículos tales como «un», «una» y «el/la» pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o que sea evidente a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en o de otra manera relevantes para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o de otra manera sea evidente a partir del contexto. La descripción incluye aspectos en los que exactamente un miembro del grupo está presente en, empleado en, o de otra manera relevante a un producto o proceso dado. La descripción incluye aspectos en los que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en, o de otro modo relevantes para un producto o proceso dado.

También se observa que se pretende que el término "que comprende" sea abierto y permita, pero no requiere la inclusión de elementos o etapas adicionales. Cuando el término "que comprende" se usa en esta invención, el término "que consiste en" también se abarca y describe.

Cuando se dan intervalos, se incluyen los puntos finales. Además, se debe entender que, a menos que se indique lo contrario o que sea evidente a partir del contexto y la comprensión de un experto en la materia, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor o subintervalo específico dentro de los intervalos indicados en diferentes aspectos de la descripción a la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, debe entenderse que cualquier aspecto particular de la presente descripción que esté dentro de la técnica anterior puede excluirse explícitamente de cualquiera de una o más de las reivindicaciones. Dado que tales aspectos se consideran conocidos por un experto en la materia, pueden excluirse incluso si la exclusión no se establece explícitamente en esta invención. Cualquier aspecto particular de las composiciones de la descripción (*por ejemplo*, cualquier ácido nucleico o proteína codificada por este; cualquier procedimiento de producción; cualquier procedimiento de uso; *etc.*) puede excluirse de cualquiera de una o más reivindicaciones, por cualquier motivo, esté o no relacionado con la existencia de la técnica anterior.

EJEMPLOS

La presente descripción se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la descripción descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1. Transcripción *in vitro* de ARNm modificado

A. Materiales y procedimientos

Los ARNm modificados según la descripción se elaboran utilizando procedimientos y materiales de laboratorio estándar para la transcripción *in vitro* con la excepción de que la mezcla de nucleótidos contiene nucleótidos modificados. El marco de lectura abierto (ORF) del gen de interés está flanqueado por una región no traducida 5' (UTR) que contiene una fuerte señal de iniciación de traducción de Kozak y una UTR 3' alfa-globina que termina con una secuencia oligo(dT) para la adición de una cola de poliA para ARNm que no incorpora análogos de adenosina. Los ARNm que contienen adenosina se sintetizan sin una secuencia oligo (dT) para permitir la cola de poli- (A) polimerasa poli-(A) posterior a la transcripción.

Los ARNm modificados pueden modificarse para reducir la respuesta inmunitaria innata celular.

El ORF también puede incluir varias adiciones aguas arriba o aguas abajo (tal como, pero no limitado a, β -globina, etiquetas, etc.) se pueden ordenar desde un servicio de optimización tal como, pero limitado a, DNA2.0 (Menlo Park, CA) y puede contener múltiples sitios de clonación que pueden tener reconocimiento XbaI. Tras la recepción de la construcción, puede reconstituirse y transformarse en *E. coli* químicamente competente.

Para la presente descripción, se utiliza *E. coli* NEB DH5-alfa competente. Las transformaciones se realizan según las instrucciones de NEB utilizando 100 ng de plásmido. El protocolo es el siguiente:

Descongelar un tubo de células de *E. coli* NEB 5-alfa Competent en hielo durante 10 minutos.

Añadir 1-5 μ l que contenga 1 pg-100 ng de ADN de plásmido a la mezcla celular. Con cuidado, mover el tubo 4-5 veces para mezclar las células y el ADN. No hacer vórtices.

Colocar la mezcla en hielo durante 30 minutos. No mezclar.

Calentar el choque a 42 °C durante exactamente 30 segundos. No mezclar.

Colocar en hielo durante 5 minutos. No mezclar.

Pipetear 950 μ l de SOC a temperatura ambiente en la mezcla.

Colocar a 37 °C durante 60 minutos. Agitar vigorosamente (250 rpm) o girar.

Calentar las placas de selección a 37 °C.

Mezclar bien las células moviendo el tubo e invirtiendo.

Extender 50-100 μ l de cada dilución en una placa de selección e incubar durante la noche a 37 °C. Alternativamente, incubar a 30 °C durante 24-36 horas o 25 °C durante 48 horas.

A continuación, se usa una sola colonia para inocular 5 ml de medio de crecimiento LB usando el antibiótico apropiado y, a continuación, se deja crecer (250 RPM, 37° C) durante 5 horas. A continuación, se utiliza para inocular un medio de cultivo de 200 ml y se deja crecer durante la noche en las mismas condiciones.

Para aislar el plásmido (hasta 850 μ g), se realiza una preparación máxima utilizando el Kit Invitrogen PURELINK™ HiPure Maxiprep (Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con el fin de generar ADNc para la transcripción *in vitro* (IVT), el plásmido (un ejemplo de lo cual se muestra en la figura 3) se linealiza primero usando una enzima de restricción tal como XbaI. Un resumen de restricción típico con XbaI comprenderá lo siguiente: Plásmido 1,0 μ g; 10 \times Tampón 1,0 μ l; XbaI 1,5 μ l; dH₂O hasta 10 μ l; incubado a 37 ° C durante 1 hora Si se realiza a escala de laboratorio (< 5 μ g), la reacción se limpia utilizando el Micro Kit de PCR PURELINK™ de Invitrogen (Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Es posible que sea necesario realizar purificaciones a mayor escala con un producto que tenga una mayor capacidad de carga, como el kit de PCR PURELINK™ estándar de Invitrogen (Carlsbad, CA). Después de la limpieza, el vector linealizado se cuantifica usando NanoDrop y se analiza para confirmar la linealización usando electroforesis en gel de agarosa.

B. Electroforesis en gel de agarosa de ARNm modificado

Los ARNm modificados individuales (200-400 ng en un volumen de 20 μ l) se cargan en un pocillo en un gel E de agarosa al 1,2 % no desnaturizante (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se ejecutan durante 12-15 minutos según el protocolo del fabricante.

C. Electroforesis en gel de agarosa de productos RT-PCR

Los productos individuales de PCR con transcripción inversa (200-400 ng) se cargan en un pocillo de un gel E de agarosa al 1,2 % no desnaturizante (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se ejecutan durante 12-15 minutos según el protocolo del fabricante.

D. Datos espectrales de cuantificación de ARNm modificado por Nanodrop y UV

Los ARNm modificados en tampón TE (1 μ l) se utilizan para lecturas de absorbancia UV de Nanodrop para cuantificar el rendimiento de cada ARNm modificado de una reacción de transcripción *in vitro* (no se muestran trazas de absorbancia UV).

Ejemplo 2. Transfección de ARNm modificado**A. Transfección inversa**

5 Para los experimentos realizados en una placa de cultivo de tejidos recubierta con colágeno de 24 pocillos, los queratinocitos se siembran a una densidad celular de 1×10^5 . Para los experimentos realizados en una placa de cultivo de tejidos recubierta con colágeno de 96 pocillos, los queratinocitos se siembran a una densidad celular de $0,5 \times 10^5$. Para cada ARNm modificado que se va a transfectar, ARNm modificado: RNAIMAX™ se preparan como se describe y se mezclan con las células en la placa de múltiples pocillos dentro de las 6 horas posteriores a la siembra celular antes de que las células se hayan adherido a la placa de cultivo de tejidos.

B. Transfección hacia delante

15 En una placa de cultivo de tejidos recubierta de colágeno de 24 pocillos, los queratinocitos se siembran a una densidad celular de $0,7 \times 10^5$. Para los experimentos realizados en una placa de cultivo de tejidos recubierta con colágeno de 96 pocillos, los queratinocitos se siembran a una densidad celular de $0,3 \times 10^5$. A continuación, los queratinocitos crecen hasta una confluencia de $>70\%$ durante más de 24 horas. Para cada ARNm modificado que se va a transfectar, ARNm modificado: RNAIMAX™ se preparan como se describe y se transfectan en las células en la placa de múltiples pocillos durante 24 horas después de la siembra celular y la adherencia a la placa de cultivo de tejidos.

C. Pantalla de traducción de ARNm modificado: ELISA G-CSF

25 Los queratinocitos se cultivan en medio EpiLife con el suplemento S7 de Invitrogen a una confluencia de $>70\%$. Los queratinocitos se transfectan de forma inversa con 300 ng del ARNm químicamente modificado indicado en complejo con RNAIMAX™ de Invitrogen. Alternativamente, los queratinocitos se transfectan de forma directa con ARNm modificado de 300 ng en complejo con RNAIMAX™ de Invitrogen. El ARN: El complejo RNAIMAX™ se forma primero incubando el ARN con medios EPILIFE® sin suplemento en una dilución volumétrica 5X durante 10 minutos a temperatura ambiente.

30 En un segundo vial, el reactivo RNAIMAX™ se incuba con medio EPILIFE® sin suplemento en una dilución volumétrica de 10X durante 10 minutos a temperatura ambiente. El vial de ARN se mezcla a continuación con el vial de RNAIMAX™ y se incuba durante 20-30 a temperatura ambiente antes de añadirse a las células de forma gota a gota. La concentración de huG-CSF secretada en el medio de cultivo se mide a las 18 horas posteriores a la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente por triplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de queratinocitos humanos transfectados se cuantifica utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems (Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

D. Dosis y duración de ARNm modificado: ELISA G-CSF

40 Los queratinocitos se cultivan en medio EPILIFE® con el suplemento S7 de Invitrogen a una confluencia de $>70\%$. Los queratinocitos se transfectan inversamente con ARNm modificado 0ng, 46,875ng, 93,75ng, 187,5ng, 375ng, 750ng o 1500ng en complejo con RNAIMAX™ de Invitrogen. El ARNm modificado: El complejo de RNAIMAX™ se forma como se describe. Se mide la concentración de huG-CSF secretada en el medio de cultivo a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas posteriores a la transfección para cada concentración de cada ARNm modificado por triplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de queratinocitos humanos transfectados se cuantifica utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes.

Ejemplo 3. Respuesta inmunitaria celular innata a ácidos nucleicos modificados: ELISA IFN-beta y ELISA TNF-alfa

50 Un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el Factor de necrosis tumoral humano- α (TNF- α), el Interferón- β humano (IFN- β) y el Factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) secretados de células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* se evalúa para la detección de una respuesta inmunitaria innata celular.

55 Los queratinocitos se cultivan en medio EPILIFE® con suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos en ausencia de hidrocortisona de Invitrogen en una confluencia de $>70\%$. Los queratinocitos se transfectan de forma inversa con 0ng, 93,75ng, 187,5ng, 375ng, 750ng, 1500ng o 3000ng del ARNm químicamente modificado indicado en complejo con RNAIMAX™ de Invitrogen como se describe por triplicado. El TNF- α secretado en el medio de cultivo se mide 24 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente usando un kit ELISA de Invitrogen según los protocolos del fabricante.

65 Se mide IFN- β secretado 24 horas después de la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente usando un kit ELISA de Invitrogen según los protocolos del fabricante. La concentración de huG-CSF secretada se mide a las 24 horas posteriores a la transfección para cada uno de los ARNm modificados químicamente. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de queratinocitos humanos transfectados se

cuantifica utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems (Minneapolis, MN) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Estos datos indican qué ARNm modificado son capaces de provocar una respuesta inmunitaria innata celular reducida en comparación con polinucleótidos naturales y otros polinucleótidos modificados químicamente o compuestos de referencia mediante la medición de citocinas tipo 1 de ejemplo TNF-alfa e IFN-beta.

5 **Ejemplo 4. Ensayo de proliferación celular inducida por ARNm modificado por factor estimulante de colonias de granulocitos humanos**

10 Los queratinocitos humanos se cultivan en medio EPILIFE® con el suplemento S7 de Invitrogen a una confluencia de >70 % en una placa de cultivo de tejidos TRANSWELL® recubierta con colágeno de 24 pocillos (Corning, Lowell, MA). Los queratinocitos se transfectan de forma inversa con 750 ng del ARNm químicamente modificado indicado en complejo con RNAIMAX™ de Invitrogen como se describe por triplicado. El ARNm modificado: El complejo de RNAIMAX™ se forma como se describe. Los medios de queratinocitos se intercambian 6-8 horas después de la transfección. 42 horas después de la transfección, el inserto de placa TRANSWELL® de 24 pocillos con una membrana de poliéster semipermeable de poro de 0,4 µm se coloca en la placa de cultivo que contiene queratinocito de ARNm transfectado modificado con hu-G-CSF.

15 Las células de mieloblasto humano, células Kasumi-1 o KG-1 ($0,2 \times 10^5$ células), se siembran en el pocillo de inserción y la proliferación celular se cuantifica 42 horas después del inicio del co-cultivo usando el ensayo de proliferación celular directa CyQuant (Invitrogen) en un volumen de 100-120 µl en una placa de 96 pocillos. La proliferación celular de mieloblasto inducida por ARNm modificado que codifica hu-G-CSF se expresa como un porcentaje de proliferación celular normalizada a pocillos de control de co-cultivo de queratinocitos/mieloblasto no transfectados. Se midió la concentración de hu-G-CSF secretada en los pocillos de co-cultivo de inserción de queratinocitos y mieloblastos a las 42 horas posteriores al inicio del co-cultivo para cada ARNm modificado por duplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) se cuantifica utilizando un kit ELISA de Invitrogen siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

20 El ARNm modificado con hu-G-CSF transfectado en células alimentadoras de queratinocitos humanos y células de mieloblastos humanos no transfectadas se detectan mediante RT-PCR. El ARN total de las células de muestra se extrae y se lisa utilizando el kit RNAEASY® (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. El ARN total extraído se somete a RT-PCR para la amplificación específica de ARNm modificado-G-CSF usando PROTOSCRIPT® M-MuLV Taq RT-PCR kit (New England BioLabs, Ipswich, MA) según las instrucciones del fabricante con cebadores específicos de hu-G-CSF. Los productos de RT-PCR se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2 %.

35 **Ejemplo 5. Citotoxicidad y apoptosis**

Este experimento demuestra la viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis para distintas células de queratinocitos humanos transfectadas *in vitro* con ARNm modificado. Los queratinocitos se cultivan en medio EPILIFE® con suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos en ausencia de hidrocortisona de Invitrogen en una confluencia de >70 %. Los queratinocitos se transfectan inversamente con 0ng, 46,875ng, 93,75ng, 187,5ng, 375ng, 750ng, 1500ng, 3000ng o 6000ng de ARNm modificado en complejo con RNAIMAX™ de Invitrogen. El ARNm modificado: Se forma el complejo RNAIMAX™. Se mide la concentración de huG-CSF secretada en el medio de cultivo a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas posteriores a la transfección para cada concentración de cada ARNm modificado por triplicado. La secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos humanos (G-CSF) de queratinocitos humanos transfectados se cuantifica utilizando un kit ELISA de Invitrogen o R&D Systems siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes. La viabilidad celular, la citotoxicidad y la apoptosis se miden a las 0, 12, 48, 96 y 192 horas después de la transfección utilizando el kit APOTOX-GLO™ de Promega (Madison, WI) según las instrucciones del fabricante.

50 **Ejemplo 6. Entorno de co-cultivo**

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

65 En otro ejemplo, una célula altamente transfectable tal como un fibroblasto se transfecta con determinados factores de crecimiento para soportar y simular el crecimiento, mantenimiento o diferenciación de células madre embrionarias poco transfectables o células madre pluripotentes inducidas.

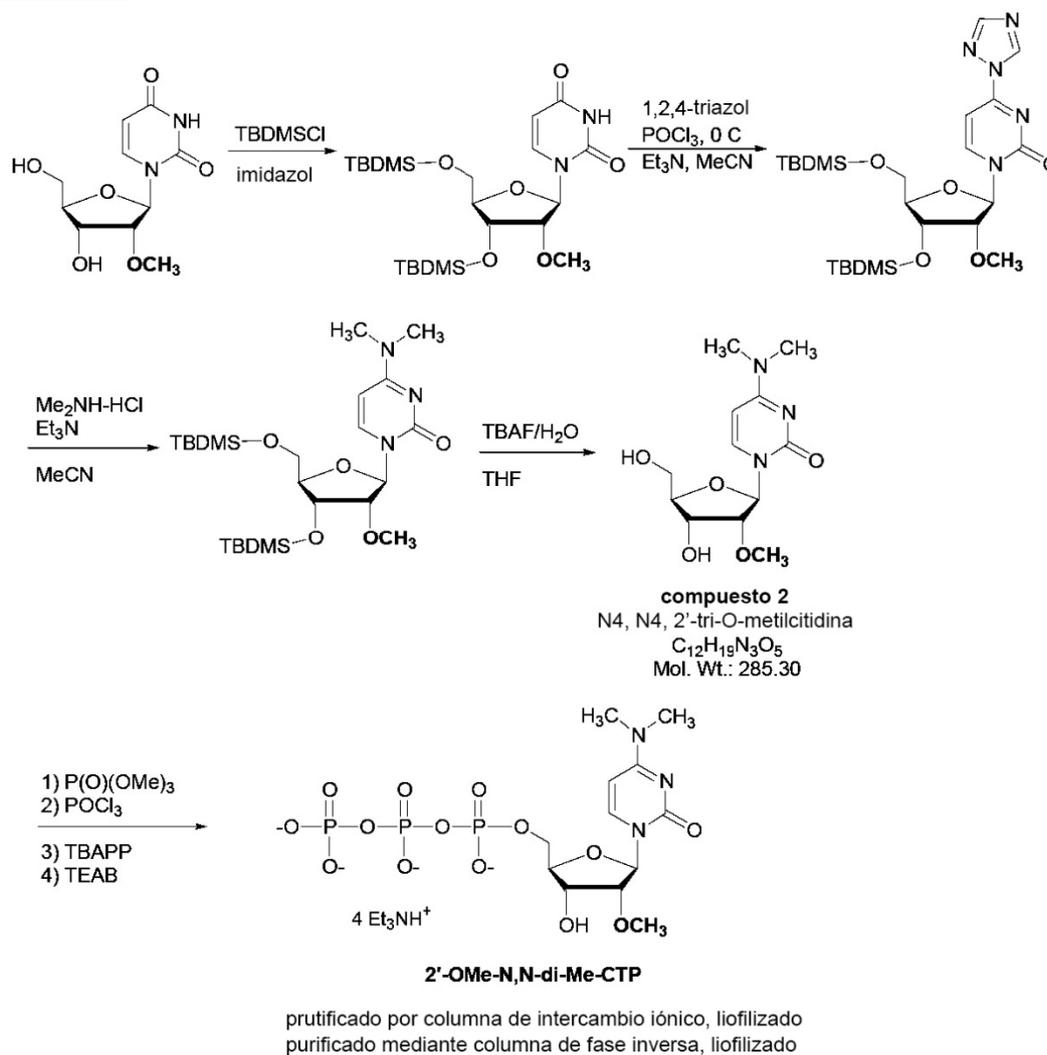
Ejemplo 7. Recubrimiento de 5'-guanosina en ácidos nucleicos modificados (ARNm modificados)**A. Materiales y procedimientos**

5 La clonación, síntesis génica y secuenciación de vectores se realizó mediante DNA2.0 Inc. (Menlo Park, CA). El ORF se digirió con restricción usando XbaI y se utilizó para la síntesis de ADNc usando PCR de cola o sin cola. El producto de ADNc de PCR en cola se utilizó como plantilla para la reacción de síntesis de ARNm modificado usando 25 mM de cada mezcla de nucleótidos modificada (todos los nucleótidos modificados se sintetizaron a medida o se adquirieron de TriLink Biotech, San Diego, CA excepto pirrolo-C trifosfato adquirido de Glen Research, Sterling VA; los nucleótidos no modificados se adquirieron de Epicenter Biotechnologies, Madison, WI) y el kit de síntesis de ARNm completo CellScript MEGASCRIP™ (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI). La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo durante 4 horas a 37 °C. Los ARNm modificados que incorporan análogos de adenosina fueron poli (A) con cola usando poli (A) polimerasa de levadura (Affymetrix, Santa Clara, CA). La reacción de PCR utilizó HiFi PCR 2X MASTER MIX™ (Kapa Biosystems, Woburn, MA). Los ARNm modificados se taparon post-transcripcionalmente usando la enzima de recubrimiento del virus Vaccinia recombinante (New England BioLabs, Ipswich, MA) y una 2'-o-metiltransferasa recombinante (Epicenter Biotechnologies, Madison, WI) para generar la estructura Tapa 1 de 5'-guanosina. La estructura de Tapa 2 y las estructuras de Tapa 2 se pueden generar usando 2'-o-metiltransferasas adicionales. El producto de ARNm transcrito *in vitro* se ejecutó en un gel de agarosa y se visualizó. El ARNm modificado se purificó con el kit de purificación MEGAClear RNA™ Ambion/Applied Biosystems (Austin, TX). PCR utilizó el kit de purificación PURELINK™ PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). El producto se cuantificó en NANODROP™ Absorbancia UV (ThermoFisher, Waltham, MA). La calidad, la calidad de absorbancia UV y la visualización del producto se realizaron en un gel de agarosa al 1,2 %. El producto se resuspendió en tampón TE.

B. Estructura de ácido nucleico modificado con recubrimiento 5' (ARNm)

El recubrimiento 5' de ARNm modificado se puede completar de forma concomitante durante la reacción de transcripción *in vitro* utilizando los siguientes análogos químicos de tapa de ARN para generar la estructura de tapa de 5'-guanosina según los protocolos del fabricante: 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G (la tapa ARCA); G(5')ppp(5')A; G(5')ppp(5')G; m⁷G(5')ppp(5')A; m⁷G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). El recubrimiento 5' del ARNm modificado se puede completar post-transcripcionalmente usando una enzima de tapa del virus Vaccinia para generar la estructura "Tapa 0": m⁷G(5')ppp(5')G (New England BioLabs, Ipswich, MA). La estructura de tapa 1 se puede generar usando tanto la enzima de recubrimiento del virus de la Vaccinia como una 2'-O metil-transferasa para generar: m⁷G(5')ppp(5')G-2'-O-metilo. La estructura de Tapa 2 se puede generar a partir de la estructura de Tapa 1 seguida de la 2'-o-metilación del nucleótido antepenúltimo 5' usando una 2'-O metil-transferasa. La estructura de Tapa 3 se puede generar a partir de la estructura de Tapa 2 seguida de la 2'-o-metilación del nucleótido preantepenúltimo 5' usando una 2'-O metil-transferasa. Las enzimas se derivan preferentemente de una fuente recombinante.

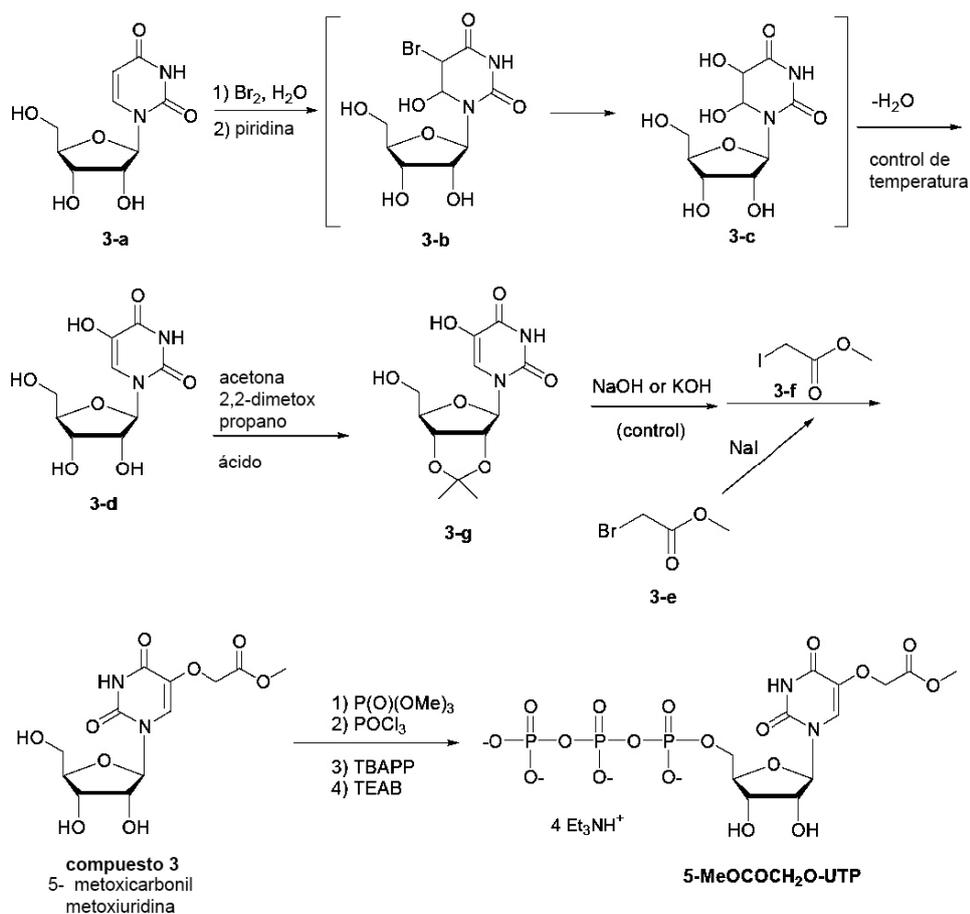
40 Cuando se transfectan en células de mamífero, los ARNm modificados tienen una estabilidad de 12-18 horas o más de 18 horas, por ejemplo, 24, 36, 48, 60, 72 o más de 72 horas.

Ejemplo 9. Síntesis de 2'-OMe-N,N-di-Me-citidina (compuesto 2) y 2'-OMe-N,N-di-Me-CTP (NTP de dicho compuesto)

Se silió 2'-O-metiluridina para proporcionar el compuesto di-sililado. La uridina 2'-O-metil-3',5'-di-O-TBDMS purificada se activó con POCl_3 re-distilado e imidazol en condiciones anhidras, seguido de la sustitución nucleofílica con clorhidrato de dimetilamina en un entorno de trietilamina para retener HCl. El compuesto intermedio N4,N4,2'-tri-O-metil-3',5'-bis-O-TBDMS uridina se purificó mediante cromatografía ultra-rápida y se obtuvo como una espuma blanca. El compuesto resultante se desprotegió con TBAF y, a continuación, se purificó para proporcionar ~400 mg de compuesto del producto final 2 como espuma blanca. ES MS: m/z 308 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 386 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; HPLC: pureza, 99,49 % (Figuras 3A-3C).

Para sintetizar el NTP correspondiente, 70 mg del compuesto de nucleósido 2 proporcionaron 23 mg de 2'-OMe-N, N-di-Me-CTP después de la purificación mediante columnas de intercambio iónico y de fase inversa. HPLC: pureza, 95 % (Fig. 4).

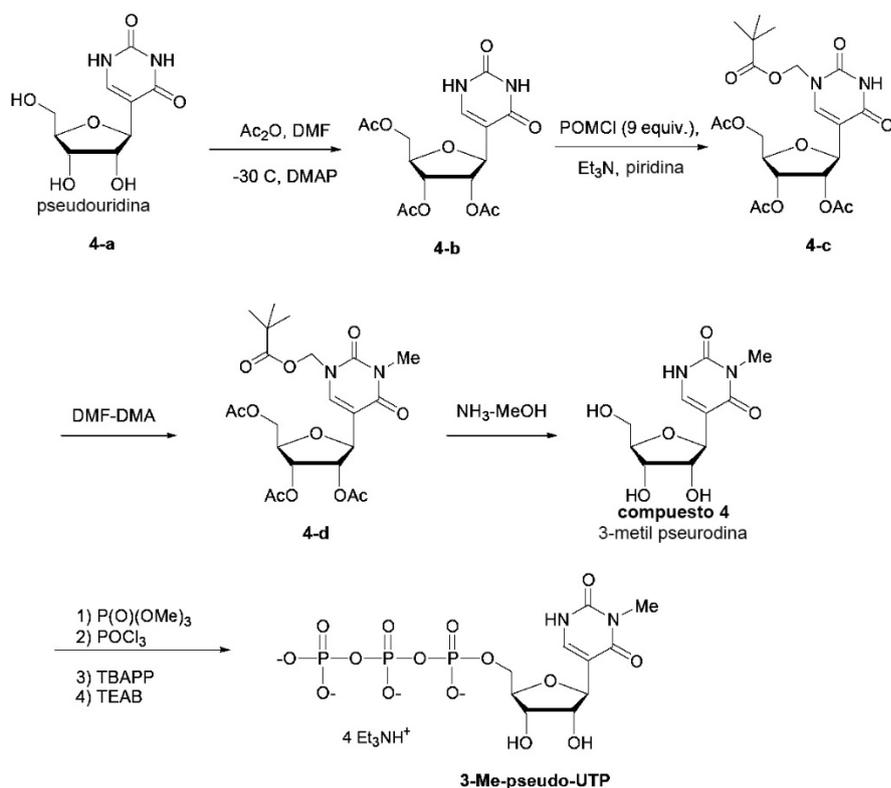
Ejemplo 10. Síntesis de 5-metoxicarbonilmetoxi uridina (compuesto 3) y 5-metoxicarbonilmetoxi-UTP (NTP de dicho compuesto)



5 La uridina 3-a en agua se trató con exceso de cantidad de bromo y, a continuación, se aclaró con aire para eliminar el bromo. La mezcla de reacción se trató con piridina a una velocidad y temperatura controladas. Durante la reacción, el bromo-intermedio 3-b inestable se convirtió gradualmente en el intermedio 3-c de dihidroxilo, que presumiblemente se deshidrató en la 5-hidroxiuridina 3-d estable. A continuación, la 5-hidroxiuridina se protegió con un grupo 2',3'-isopropilideno para proporcionar el compuesto 3-g. La reacción con el compuesto 3-f proporcionó el compuesto 3.

10 60-70 mg del nucleósido proporcionaron >21 mg del trifosfato deseado después de dos etapas de purificación de columna de HPLC y dos etapas de liofilización. HPLC: pureza, 98% (Fig. 5).

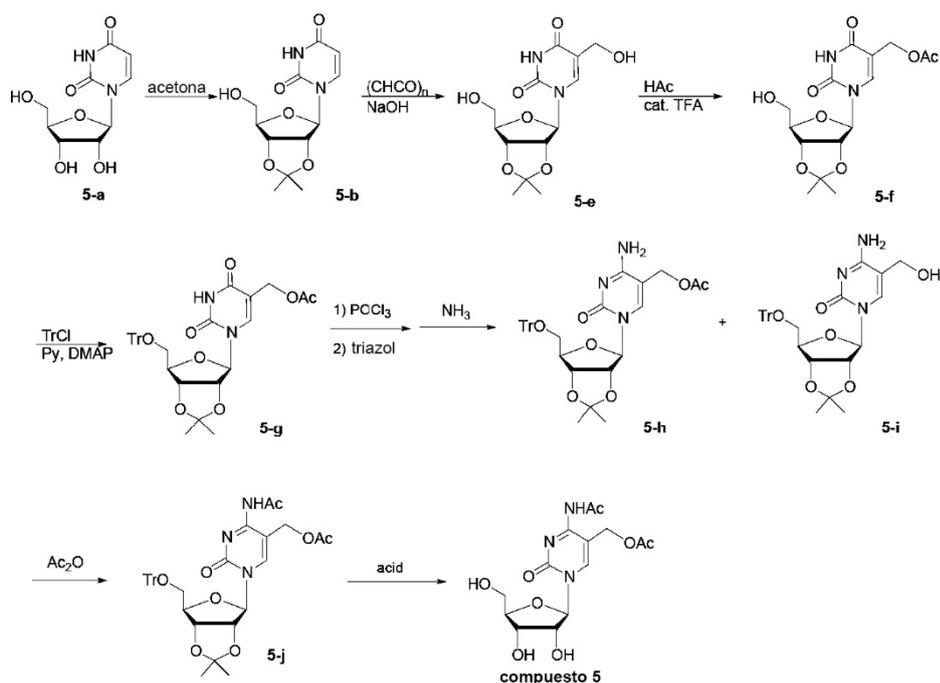
Ejemplo 11. Síntesis de 3-metil pseudouridina (compuesto 4) y 3-metil pseudo-UTP (NTP de dicho compuesto)



Se hizo reaccionar pseudouridina 4-a con AC₂O para proporcionar pseudouridina 4-b protegida con acetilo. A continuación, N1 se protegió selectivamente con POM para proporcionar el compuesto 4-c. La metilación de N3, seguida por el compuesto 4 (400 mg) proporcionado, desprotegido. Fórmula molecular: C₁₀H₁₄N₂O₆, peso molecular: 258,23g/mol; apariencia: sólido blanco; condiciones de almacenamiento: almacenar a 25 °C; HPLC: pureza, 98,51%; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 11,17 (d, 1H, *J* = 3,0 Hz), 7,56 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz), 4,91 (d, 1H, *J* = 3,6 Hz), 4,79 (t, 1H, *J* = 4,2Hz), 4,70 (d, 1H, *J* = 4,2Hz), 4,49 (d, 1H, *J* = 3,0Hz), 3,82-3,88 (m, 2H), 3,66-3,67 (m, 1H), 3,57-3,61 (m, 1H), 3,40-3,47 (m, 1H), 3,09 (s, 3H); MS: 281 (M + Na)⁺ (Fig. 6A y 6B).

Se podrían aplicar rutas alternativas para obtener el compuesto 4. Por ejemplo, se podría hacer reaccionar pseudouridina con un grupo protector O (por ejemplo, como se describe en esta invención, tal como TMS) y hacer reaccionar con un grupo protector N (por ejemplo, como se describe en esta invención, tal como acetilo en N1). A continuación, N3 de la nucleobase podría hacerse reaccionar con un agente alquilante (p. ej., dimetilamina/dimetoximetilo) para proporcionar el compuesto 4 que tiene grupos protectores de N y O. Finalmente, el compuesto resultante se desprotegería (por ejemplo, en condiciones básicas, tal como NH₃/MeOH) para proporcionar el compuesto 4.

Ejemplo 12. Síntesis de N-Ac, 5-Ac-OCH₂-citidina (compuesto 5)



La uridina 5-a se protegió para obtener el compuesto de isopropilideno 5-b, que se hizo reaccionar con $(\text{CHCO})_n$. Se empleó ácido acético con una cantidad de catalizador de TFA para obtener el compuesto acilado selectivamente deseado 5-f (rendimiento del 30 %). La tritilación adicional del grupo 5'-OH dio como resultado el compuesto 5-g protegido ortogonalmente deseado.

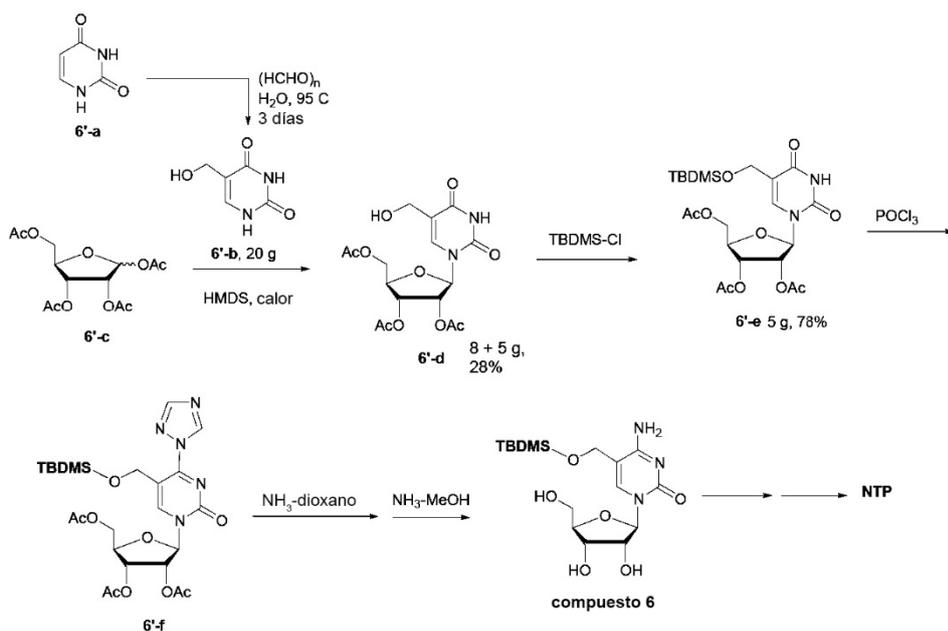
El compuesto 5-g se trató con POCl_3 y triazol para proporcionar el compuesto 5-h junto con el compuesto 5-i desacilado. La acetilación de estos dos compuestos proporcionó el compuesto 5-j completamente protegido y di-acilado. La desprotección del compuesto 5-j con ácido acético en condiciones de calentamiento dio como resultado tres productos, uno de los cuales fue el compuesto 5.

Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Se podrían aplicar rutas alternativas para obtener el compuesto 5, tal como al comenzar con citidina como material de partida. En tales procedimientos, la posición 5 podría hacerse reaccionar con un halógeno o un agente de halogenación (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención, tal como ácido I_2 / meta-cloroperoxibenzoico), que puede desplazarse con un agente alquilante. Además, tales procedimientos podrían incluir el uso de uno o más grupos protectores de N u O (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención, tal como silylación o acetilación) para proteger el grupo amino de citidina y/o grupos hidroxilo del resto de azúcar.

Ejemplo 13. Síntesis de 5-TBDMS-OCH₂-citidina (compuesto 6)

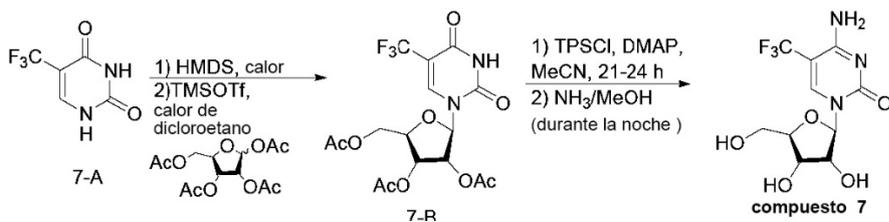
25



Se glicosiló un compuesto de 5-hidroxuracilo 'b para obtener el compuesto 6'-d (28 % de rendimiento), que se siliizó para proporcionar el compuesto 6'-e. La activación de la uridina protegida proporcionó el compuesto deseado 6 después de la aminación y desprotección adicionales (800 mg del compuesto final). Fórmula molecular: C₁₆H₂₉N₃O₆Si; peso molecular: 387,50 g/mol; apariencia: sólido blanco; condiciones de almacenamiento: almacenar a 25 °C; HPLC: pureza, 97,57 %; ¹H NMR (CDCl₃): δ 7,81 (s, 1H), 7,40 (bs, 1H), 6,49 (bs, 1H), 5,79 (d, 1H, J = 2,4 Hz), 5,3-5,32 (m, 1H), 5,00-5,07 (m, 2H), 4,30—4,45 (m, 2H), 3,90—3,94 (m, 2H), 3,80—3,83 (m, 1H), 3,50-3,70 (m, 2H), 0,87 (s, 9H), 0,05 (s, 6H); MS: 388 (M + H)⁺, 410 (M + Na)⁺ (Figs. 7A-7C).

Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

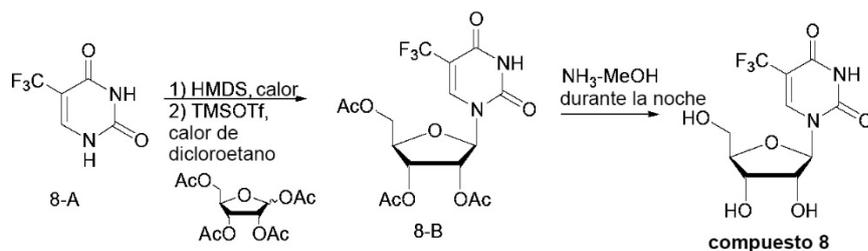
15 Ejemplo 14. Síntesis de 5-trifluorometil citidina (compuesto 7)



El compuesto 7-A se glicosiló para proporcionar el compuesto 7-B, que se trató con cloruro de 2,4,6-triisopropilbenceno sulfonilo (TPSCI) para activar el grupo carbonilo y promover la aminación reductora. La desprotección proporcionó el compuesto 7. Se podrían utilizar agentes activadores alternativos en lugar de TPSCI, tales como cloruro de 2,4,6-trimetilbenceno sulfonilo.

Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

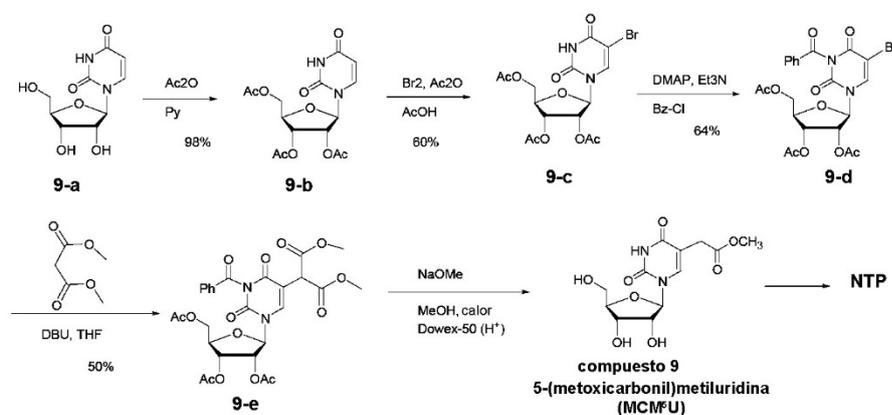
Ejemplo 15. Síntesis de 5-trifluorometil uridina (compuesto 8)



5 Se glicosiló 5-trifluorometiluracilo 8-A con ribosa de tetra-O-acetilo y se obtuvo el 5-trifluorometiluridina 8-B triprotegido deseado con buen rendimiento. La desprotección adicional proporcionó el compuesto deseado 8, que se caracterizó con resultados de RMN, MS y HPLC. MS: 313 (M + H)⁺, 335 (M + Na)⁺; HPLC: pureza, 98,87 %, ((Figuras 8A-8C).

10 Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 16. Síntesis de 5-(metoxicarbonil)metil uridina (compuesto 9)

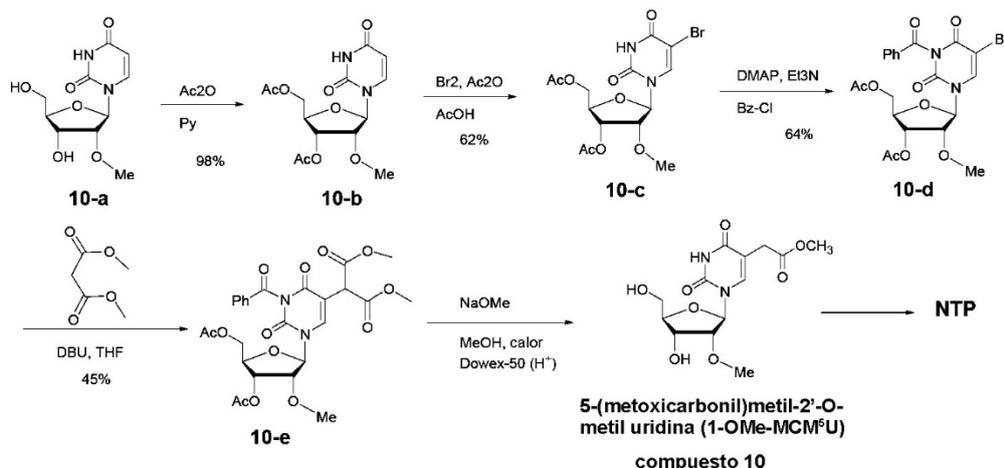


15 La uridina 9-a se protegió para proporcionar el compuesto 9-b (rendimiento del 98 %). Este compuesto se bromó con exceso de bromo en presencia de anhídrido acético y ácido acético. El análogo de 5-bromo 9-c se obtuvo (rendimiento del 60 %) y se benzoiló adicionalmente para proporcionar el compuesto deseado 9-d (rendimiento del 64 %). El compuesto de 5-bromo 9-d se condensó con malonato de dimetilo en condiciones básicas para proporcionar el malonato arilado y el diéster completamente protegido 9-e (rendimiento del 50 %). Después de la descarboxilación y desprotección, se obtuvo el compuesto 9 verificado mediante RMN (Fig. 9).

20

25 Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

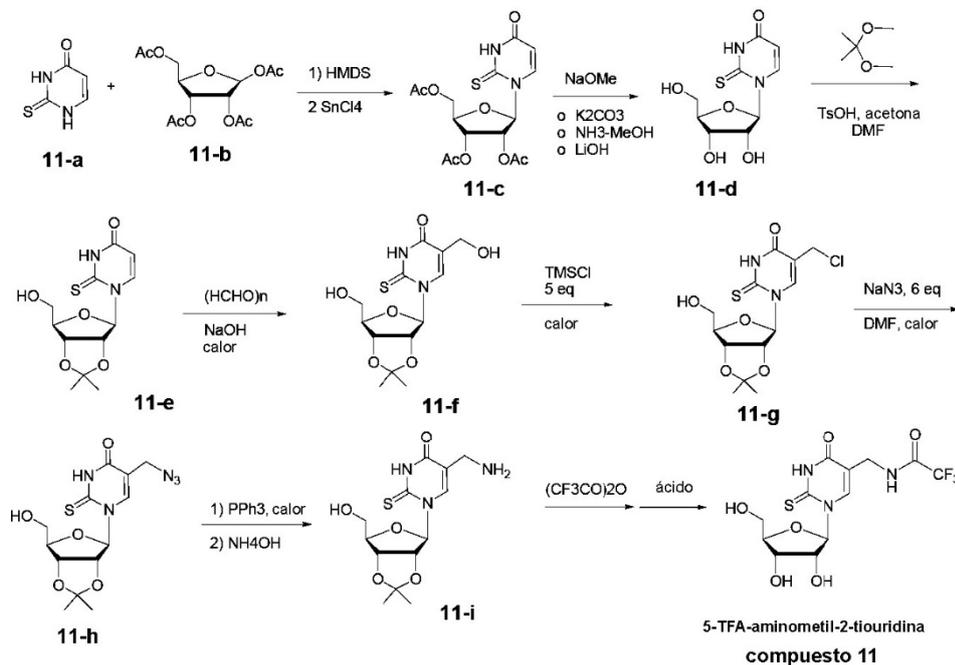
Ejemplo 17. Síntesis de 5-(metoxicarbonil)metil-2'-O-metil uridina (2-OMe-MCM5U) (compuesto 10)



5 Estrategia similar a la síntesis del compuesto 9 anterior, se aciló 2'-O-metiluridina 10-a y se bromó para obtener el compuesto 10-c. La benzoiación adicional proporcionó un análogo de 5-bromo 10-d, que se condensó con malonato de dimetil para proporcionar el producto deseado 10-e (rendimiento del 45 %). La descarboxilación y desprotección proporcionaron el compuesto 10.

10 Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 18. Síntesis de 5-trifluoroacetil-aminometil-2-tiouridina (compuesto 11)

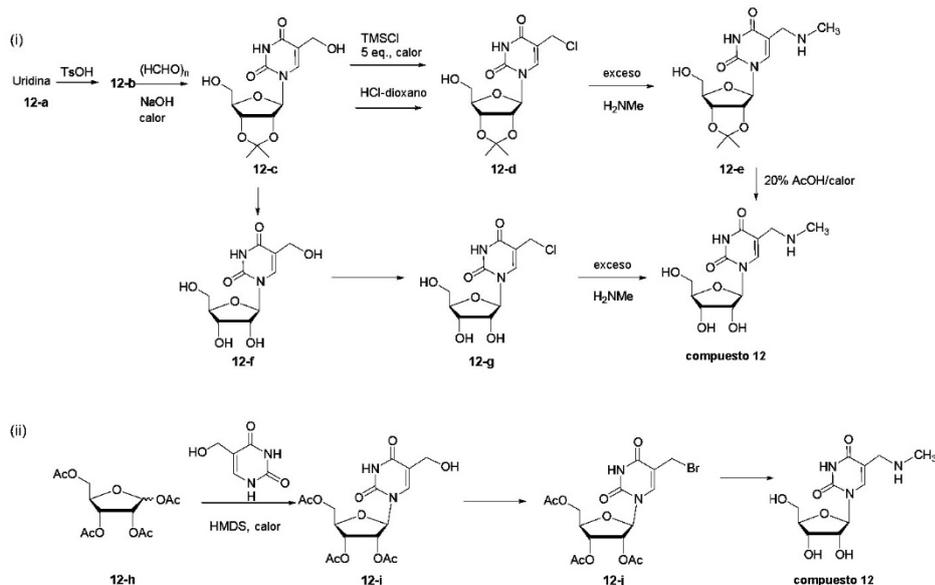


15 La glicosilación de 2-tiouracilo 11-a proporcionó el compuesto 11-c, que se puede desproteger con cualquier reactivo de desprotección útil. En particular, LiOH proporcionó el producto deseado 11-d (80-90 % de rendimiento). La protección de isopropilideno proporcionó el compuesto 11-e (90 % de rendimiento). La 5-hidroximetilación adicional proporcionó el compuesto 11-f. La cloración, la azidación y la reducción adicional proporcionaron el compuesto de metilamina 11-i, que se acetiló para proporcionar el compuesto 11.

20

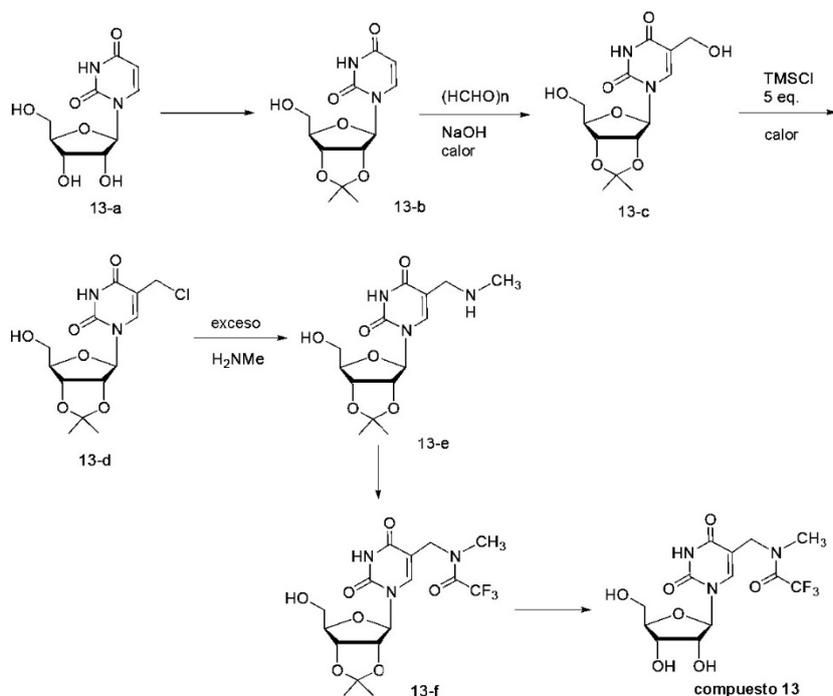
25 Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 19. Síntesis de 5-metilaminometil-2-uridina (compuesto 12)



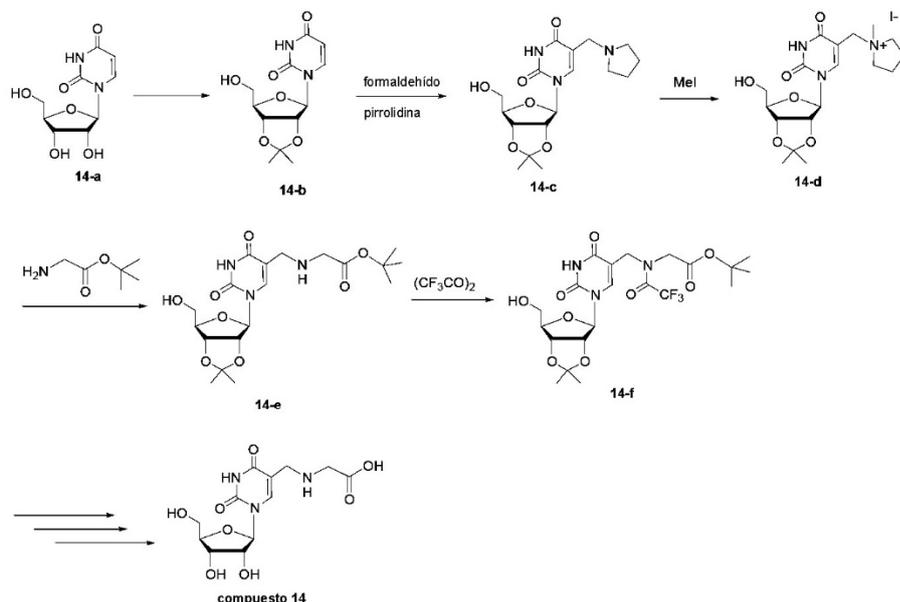
El compuesto 12 se puede obtener mediante cualquier procedimiento útil (por ejemplo, véanse los esquemas (i) y (ii) anteriores). Por ejemplo, el uracilo protegido se puede glicosilar y posteriormente aminorar para proporcionar el compuesto 12. Se pueden llevar a cabo etapas adicionales de protección, desprotección y activación según sea necesario. Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

10 **Ejemplo 20. Síntesis de 5-TFA-metilaminometil-2-uridina (compuesto 13)**



La uridina 13-a se protegió con isopropilideno para proporcionar el compuesto 13-b y, a continuación, se 5-hidroximetiló para proporcionar el compuesto 13-c. La cloración y posterior aminación proporcionaron el compuesto 13-e, que se puede proteger para proporcionar 13-f. La desprotección posterior proporcionó el compuesto 13.

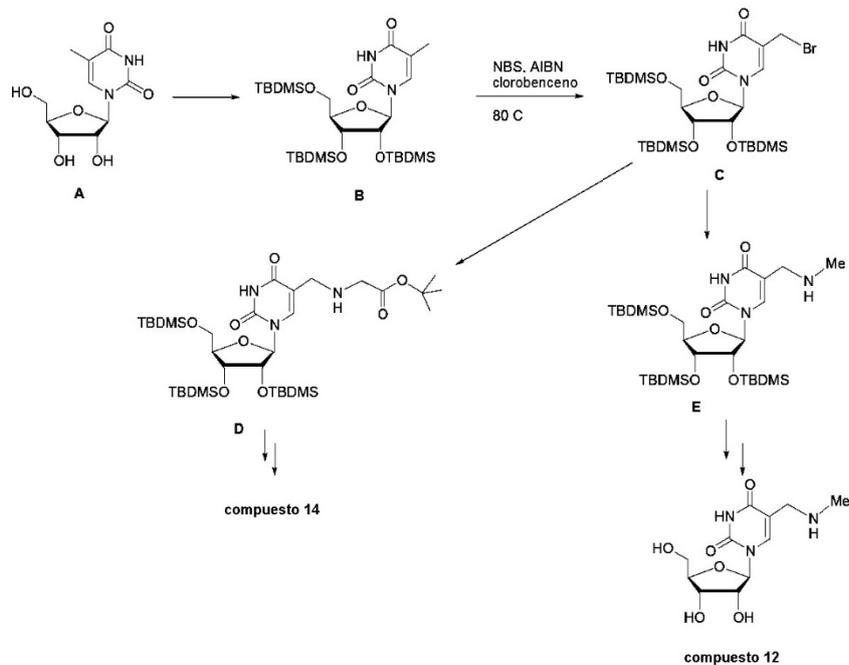
Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 21. Síntesis de 5-carboximetilaminometil uridina (compuesto 14)

5

La uridina 14-a se protegió con isopropilideno para proporcionar el compuesto 14-b y, a continuación, se 5-aminoalquiló con la reacción de Mannich para proporcionar el compuesto 14-c. La metilación proporcionó amina cuaternaria 14-d. Las etapas posteriores de aminación y desprotección se pueden utilizar para proporcionar el compuesto 14. Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

10

Ejemplo 22. Síntesis alternativa de 5-metilaminometil-2-uridina (compuesto 12) y 5-carboximetilaminometil-2-uridina (compuesto 14)

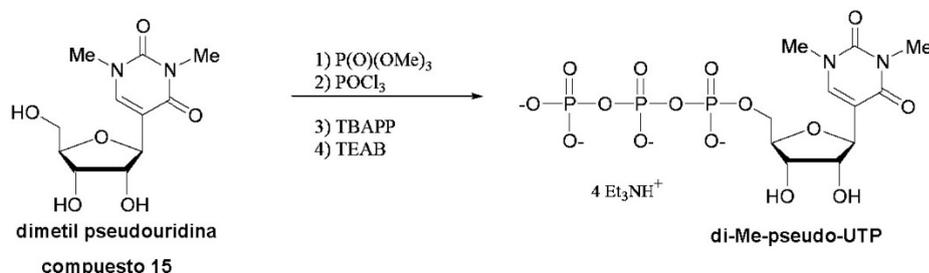
15

20

Además de las estrategias proporcionadas anteriormente para los compuestos 12 y 14, también se puede implementar la siguiente estrategia. La 5-metiluridina A se puede siliar para proporcionar el compuesto B. Después de la monobromación radical, el bromuro intermedio C resultante se puede utilizar para la preparación del compuesto 12 y los análogos del compuesto 14. La alquilaminación posterior del compuesto de bromuro C podría proporcionar los compuestos D y E, que se pueden desproteger para proporcionar los compuestos 14 y 12, respectivamente. Para

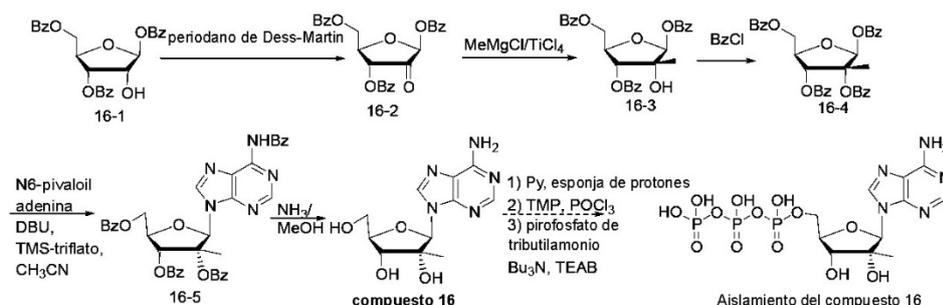
obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

5 **Ejemplo 23. Síntesis de dimetil-pseudouridina (compuesto 15) y dimetil-pseudo-UTP (NTP de dicho compuesto)**



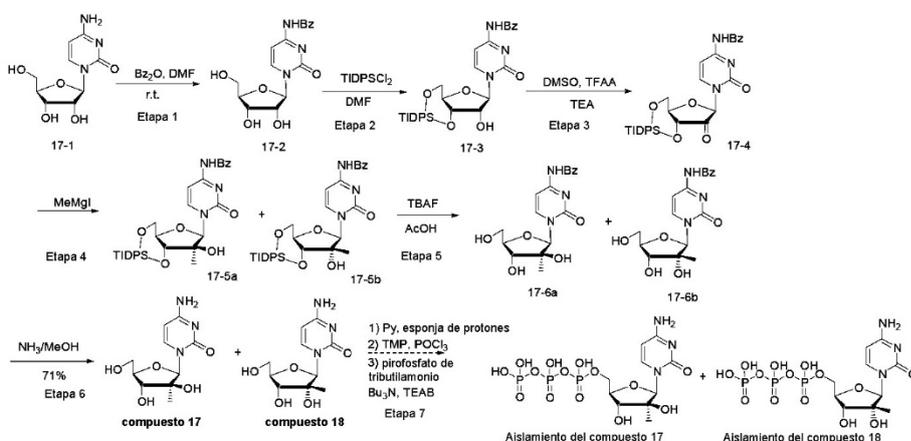
10 Los nucleósidos se pueden fosforilar mediante cualquier procedimiento útil. Por ejemplo, como se muestra anteriormente, los nucleósidos pueden hacerse reaccionar con oxiclورو de fósforo y posteriormente tratarse con un intermedio de monofosfato con bis(tributilamonio)pirofosfato (TBAPP) para proporcionar el trifosfato.

15 **Ejemplo 24. Síntesis de 2'-C-metil adenosina (compuesto 16) y 2'-C-metil ATP (NTP de dicho compuesto)**

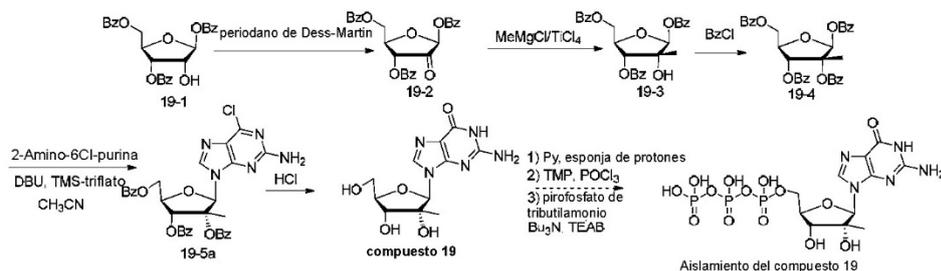


20 Se preparó alrededor de 5 g del compuesto 16-2 a partir de 5 g del compuesto 16-1 mediante una reacción de periodano de Dess-Martin. El compuesto 16-2 se hizo reaccionar con MeMgI/TiCl₄/-78 °C para proporcionar el compuesto 16-3, y el compuesto bruto 16-3 (6g) se hizo reaccionar directamente con cloruro de bencilo para preparar el compuesto 16-4. La reacción con la nucleobase y la desprotección proporcionó el compuesto 16 (0,56 g).

25 **Ejemplo 25. Síntesis de isómeros de 2'-C-metil-citidina (compuesto 17 y compuesto 18) y 2'-C-metil UTP (NTP de dichos compuestos)**



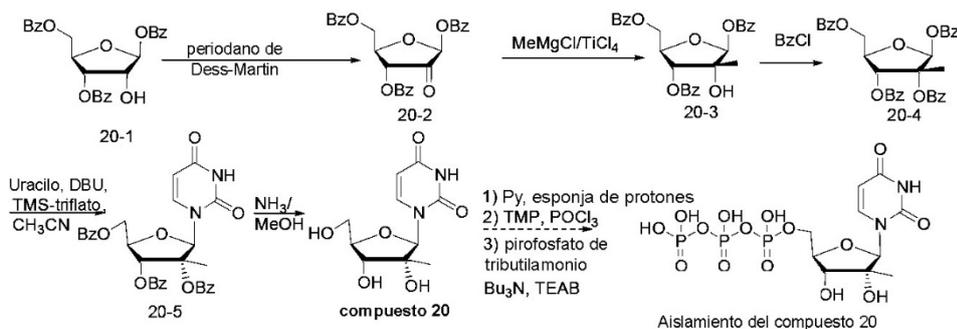
30 Se preparó alrededor de 17,4 g del compuesto 17-3 a partir de 20 g del compuesto 17-1. A continuación, la oxidación y alquilación 2' con MeMgI proporcionó 300 mg del compuesto 17-5a y 80 mg del compuesto 17-5b. Se prepararon alrededor de 9 g del compuesto 17-5a (alrededor de 90 % puro) y 2,1 g del compuesto 17-5b (puro) a partir de 17,4 g del compuesto 17-3 en 2 lotes. La desprotección de N y O proporcionó los compuestos 17 y 18.

Ejemplo 26. Síntesis de 2'-C-metil guanosina (compuesto 19) y 2'-C-metil GTP (NTP de dicho compuesto)

- 5 La oxidación 2' de ribosa 19-1 protegida y la alquilación posterior con MeMgCl proporcionaron el compuesto 19-3. El compuesto resultante se protegió adicionalmente para proporcionar el compuesto 19-4 y se prepararon 1,56 g del compuesto 19-5a a partir de 3,1 g del compuesto 19-4. La oxidación y desprotección posteriores proporcionaron el compuesto 19 (alrededor del 90 % puro, 50 mg).
- 10 Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 27. Síntesis de 2'-C-metil uridina (compuesto 20) y 2'-C-metil UTP (NTP de dicho compuesto)

15

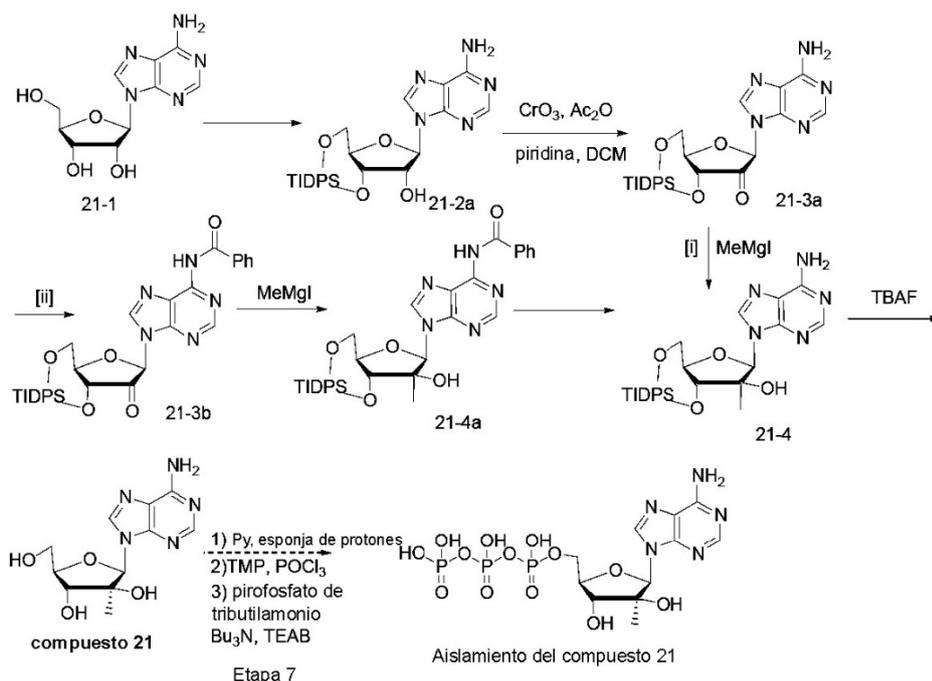


- La oxidación 2' de ribosa 20-1 protegida y la alquilación posterior con MeMgCl proporcionaron el compuesto 20-3. El compuesto resultante se protegió adicionalmente para proporcionar el compuesto 20-4. La reacción con uracilo y desprotección proporcionó el compuesto puro 20 (50 mg).

- Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

25

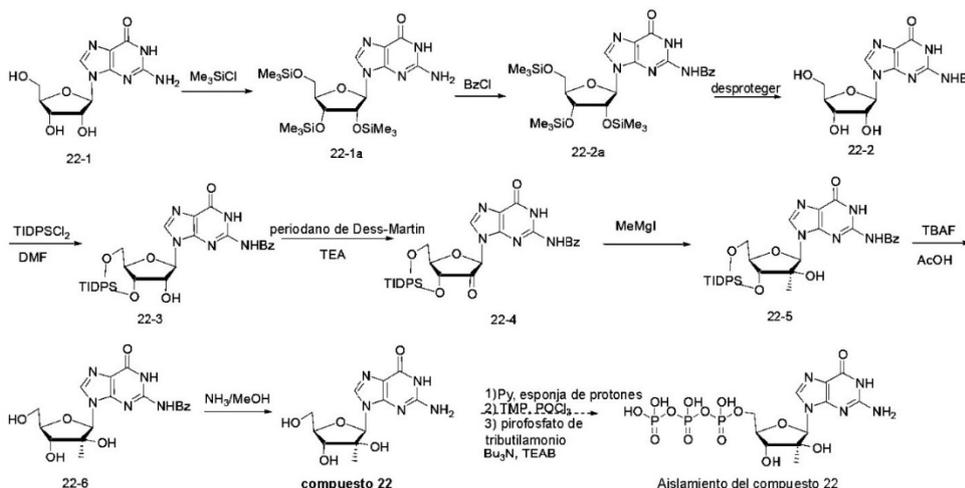
Ejemplo 28. Síntesis de (S)-2'-C-metil adenosina (compuesto 21) y (S)-2'-C-metil ATP (NTP de dicho compuesto)



El compuesto 21-1 (5g) se protegió para formar el compuesto 21-2a, y la oxidación de cromo proporcionó el compuesto 21-3a. Alquilación por la vía [i] (5eq. MeMgI en éter a -50 °C) proporcionó el compuesto 21-4. Opcionalmente, el rendimiento podría mejorarse mediante la vía [ii] protegiendo el grupo amino para proporcionar el compuesto 21-3b y, a continuación, alquilando en la posición 2'-C para proporcionar el compuesto 21-4a. El compuesto 21-3a se alquiló para proporcionar el compuesto bruto 21-4 (3g, 20 % del compuesto 3a en este producto bruto), donde el producto se puede purificar opcionalmente. La desprotección del compuesto 21-4 proporcionó el compuesto 21 (rendimiento del 50 %).

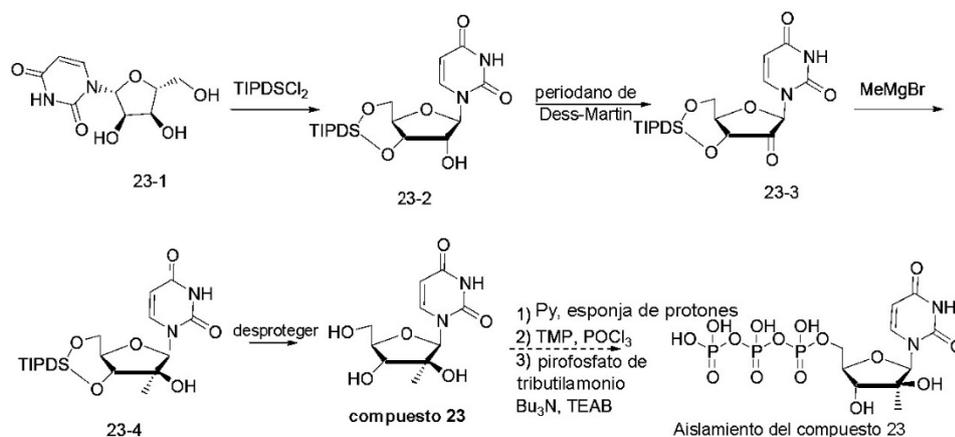
Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 29. Síntesis de (S)-2'-C-metil guanosina (compuesto 22) y (S)-2'-metil GTP (NTP de dicho compuesto)



Se silió alrededor de 30 g del compuesto 22-1 para proporcionar el compuesto 22-2 en tres etapas. La protección adicional proporcionó el compuesto 22-3, y la oxidación de periodano de Dess-Martin proporcionó el compuesto 22-4 (1,6 g) en dos lotes. 2'-C alquilación (5eq. MeMgI en éter, -50 °C a TA) proporcionó el compuesto 22-5 y las etapas de desprotección adicionales proporcionaron el compuesto 22.

Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 30. Síntesis de (S)-2'-C-metil uridina (compuesto 23) y de (S)-2'-C-metil UTP (NTP de dicho compuesto)

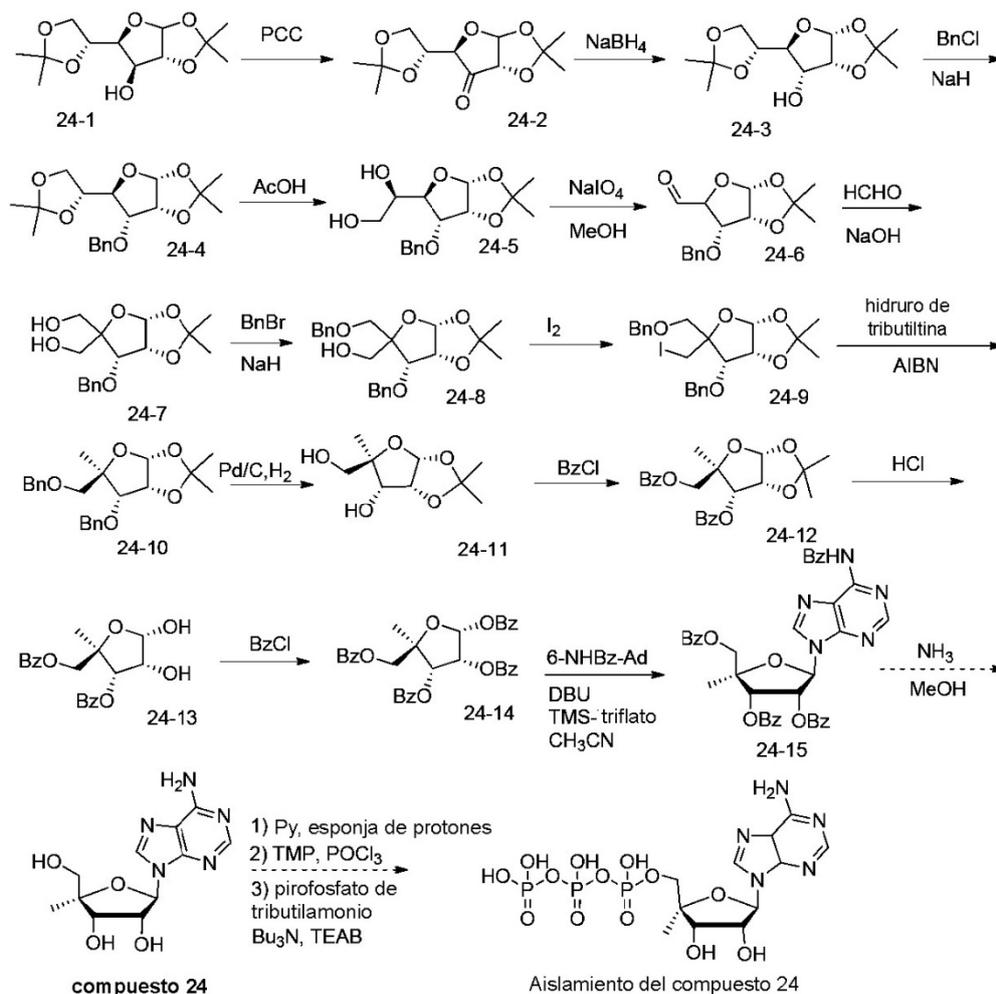
5

La uridina 23-1 (2,0 g) se protegió con TIPDSCl₂ (1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano) para proporcionar el compuesto 23-2. La oxidación proporcionó el compuesto 23-3 y la alquilación 2'-C proporcionó el compuesto 23-4, que se puede purificar opcionalmente con Prep-HPLC antes de la siguiente etapa. A continuación, la desprotección proporcionó el compuesto deseado 23.

10

Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

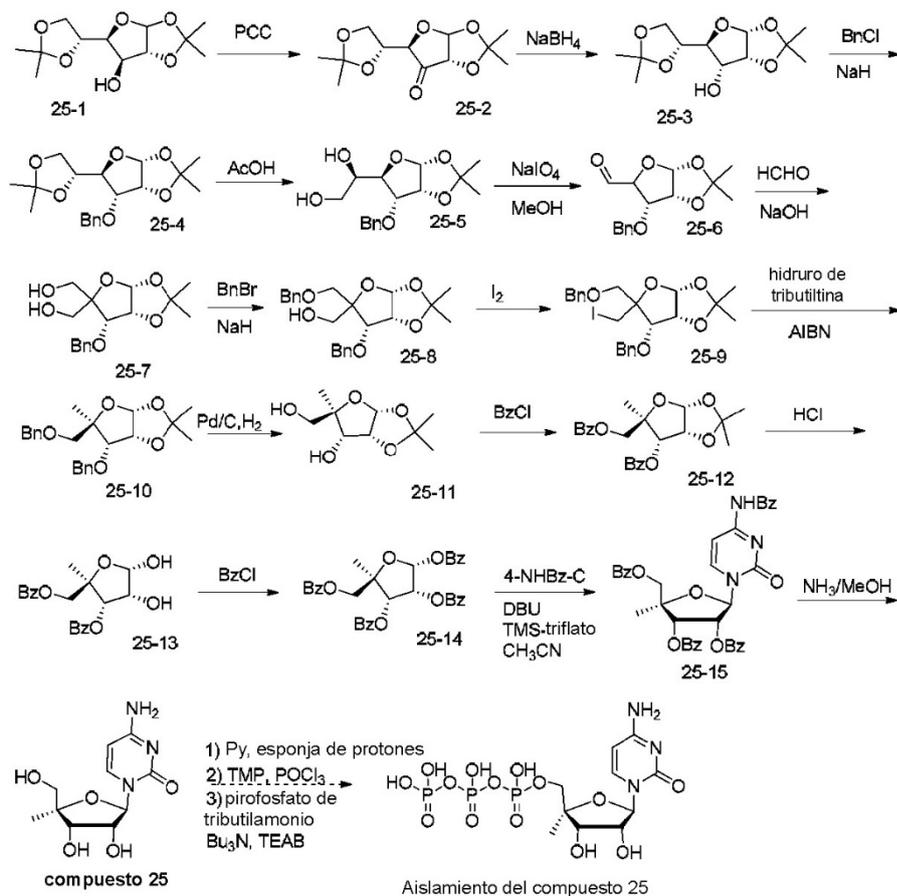
15 **Ejemplo 31. Síntesis de 4'-C-metil adenosina (compuesto 24) y 4'-C-metil ATP (NTP de dicho compuesto)**



5 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranosa 24-1 se convirtió mediante oxidación secuencial, reducción y etapas de protección para proporcionar el compuesto 24-4. La primera etapa de oxidación para proporcionar el compuesto 24-2 se puede implementar con cualquier reactivo útil, tal como dicromato de piridinio (PDC) 0,75 eq., con 1 eq. Ac_2O o 1.2 eq. de periodano Dess-Martin. La desprotección, formilación y reducción posteriores proporcionaron el compuesto 24-7, que se siguió con las etapas de protección y desoxigenación para proporcionar el compuesto 24-10. Se preparó alrededor de 0,4 g del compuesto 24-14 a partir de 1 g del compuesto 24-10 mediante etapas de protección y desprotección sucesivas. La adición de N6-benzoiladenina y la posterior desprotección proporcionaron el compuesto 24.

15 Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 32. Síntesis de 4'-C-metil citidina (compuesto 25) y 4'-C-metil CTP (NTP de dicho compuesto)

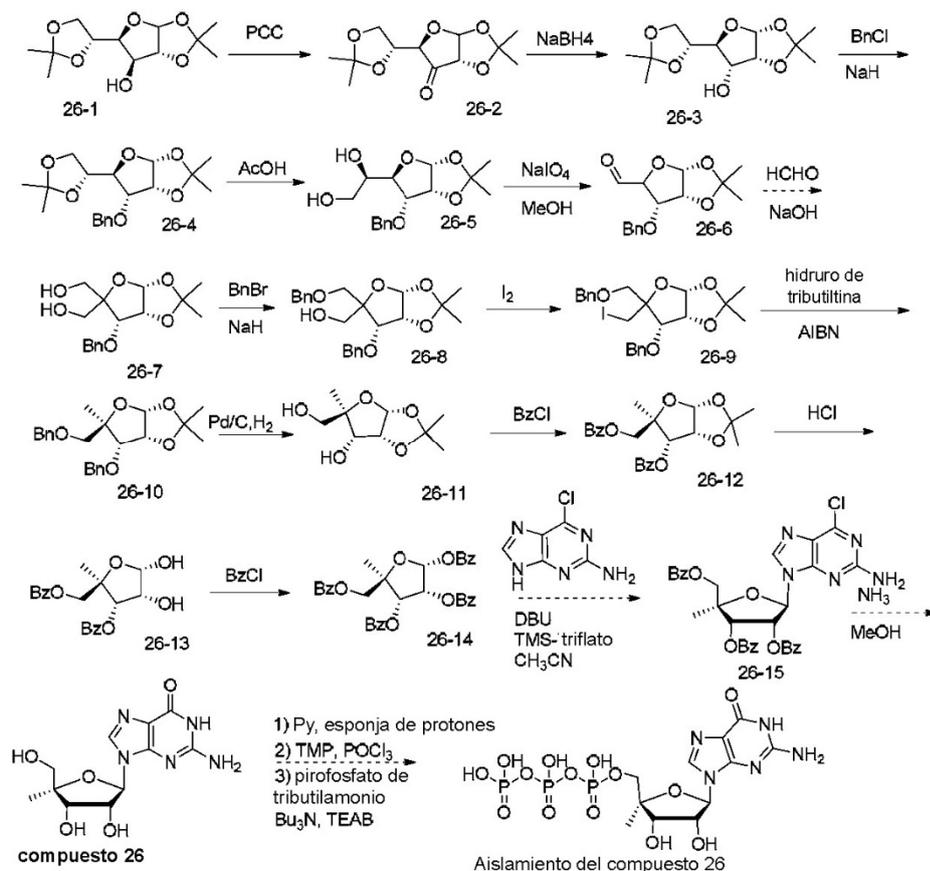


De manera similar a la estrategia proporcionada anteriormente para el compuesto 24, el compuesto 25-14 se produjo con el compuesto 25-1. La adición de citidina y la desprotección posterior proporcionaron el compuesto 25.

5

Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

10 **Ejemplo 33. Síntesis de 4'-C-metil guanosina (compuesto 26) y 4'-C-metil GTP (NTP de dicho compuesto)**



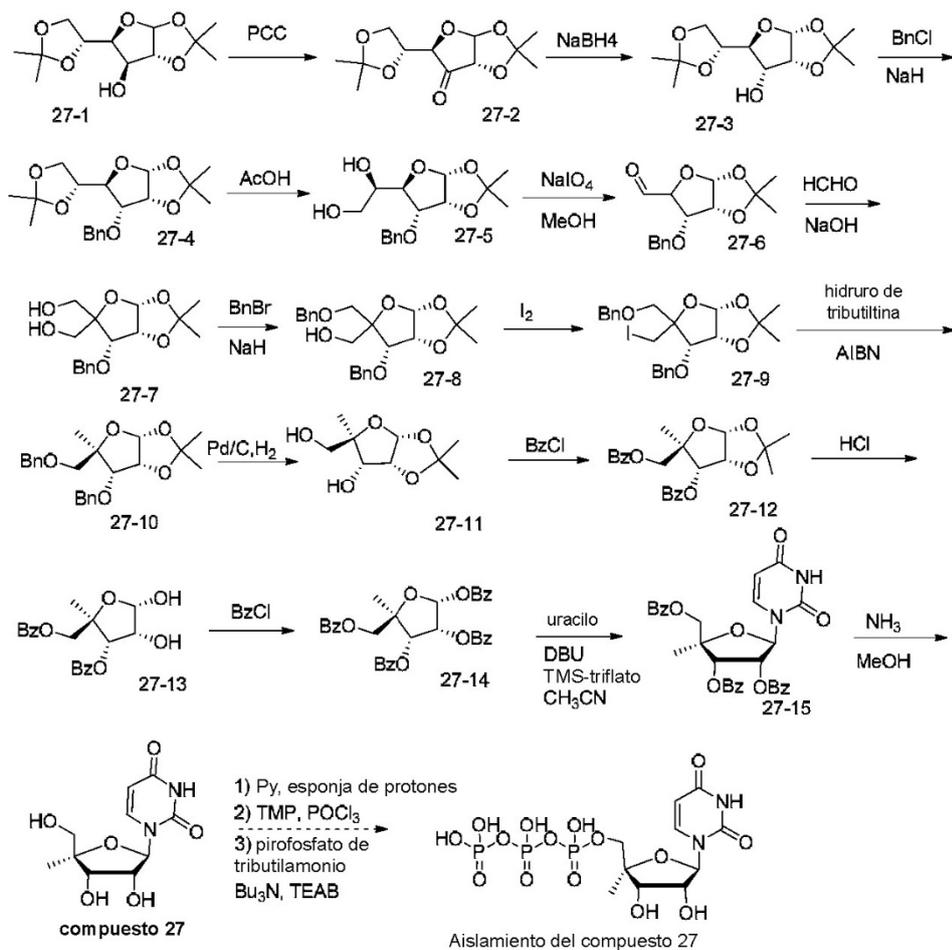
De manera similar a la estrategia proporcionada anteriormente para el compuesto 24, el compuesto 26-14 se produjo con el compuesto 26-1. La adición de 2-amino-6-cloropurina, la oxidación posterior y, a continuación, la desprotección proporcionaron el compuesto 26.

5

Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

10

Ejemplo 34. Síntesis de 4'-C-metil uridina (compuesto 27) y 4'-C-metil UTP (NTP de dicho compuesto)

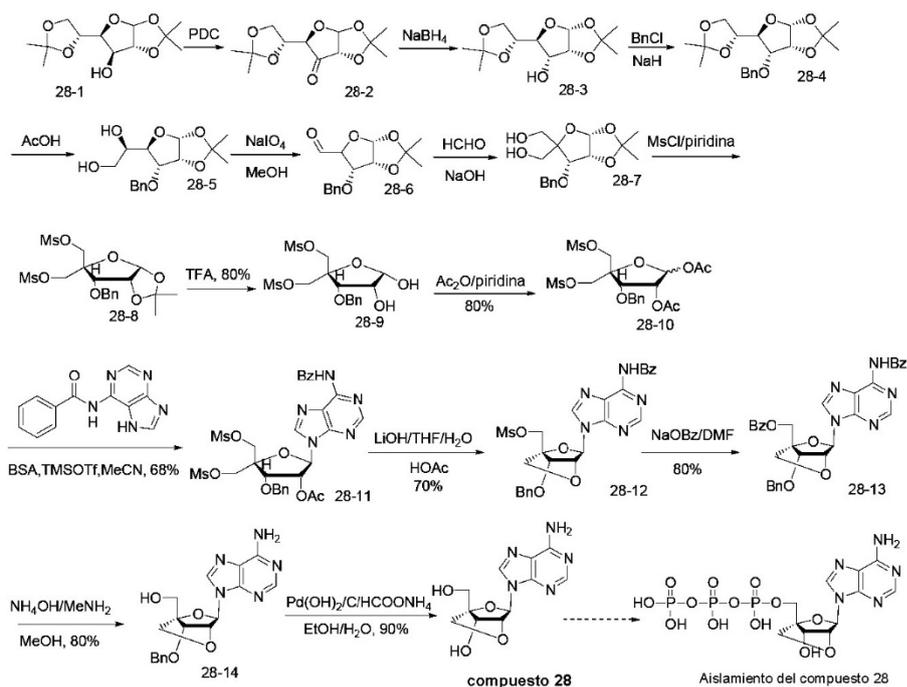


De manera similar a la estrategia proporcionada anteriormente para el compuesto 24, el compuesto 27-14 se produjo con el compuesto 27-1. La adición de uracilo y la desprotección posterior proporcionaron el compuesto 27.

5

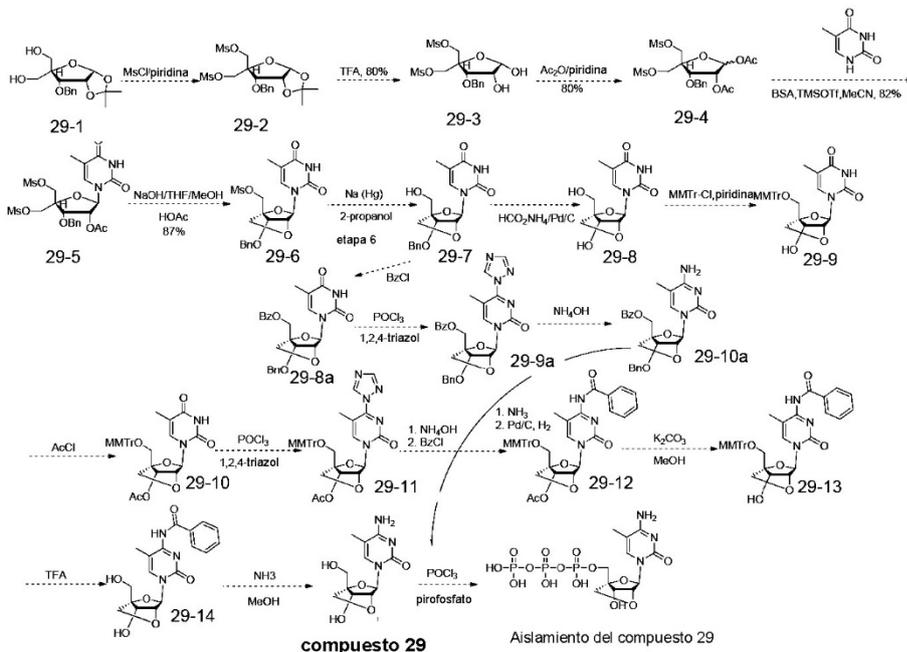
Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

10 **Ejemplo 35. Síntesis de 2'-O,4'-C-metileno adenosina (compuesto 28) y 2'-O,4'-C-metileno ATP (NTP de dicho compuesto)**



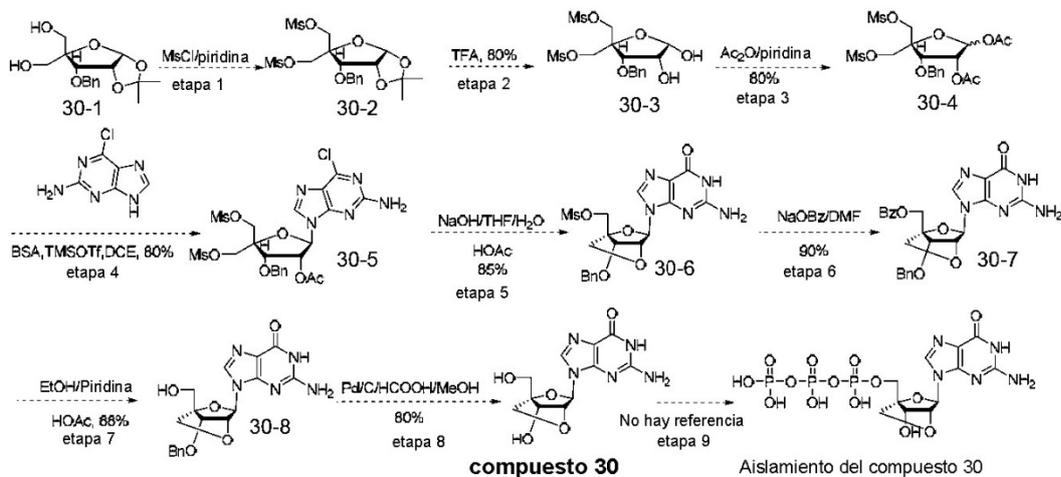
De manera similar a la estrategia proporcionada anteriormente para el compuesto 24, el compuesto 28-7 se produjo con el compuesto 28-1. La mesilación, desprotección y acetilación posteriores proporcionaron el compuesto 28-10, que fue seguido de la adición de N6-benzoiladenina y la ciclización interna posterior. Varias etapas de protección y desprotección proporcionaron el compuesto 28.

Ejemplo 36. Síntesis de 5-metil-2'-O,4'-C-metileno citidina (compuesto 29) y 5-metil-2'-O,4'-C-metileno CTP (NTP de dicho compuesto)



El compuesto de aldofuranosa 29-1 se hizo reaccionar mediante varias etapas de protección y, a continuación, se añadió 5-metiluracilo para proporcionar el compuesto 29-5. Las etapas posteriores de ciclización interna, desprotección, protección y aminación proporcionaron el compuesto 29.

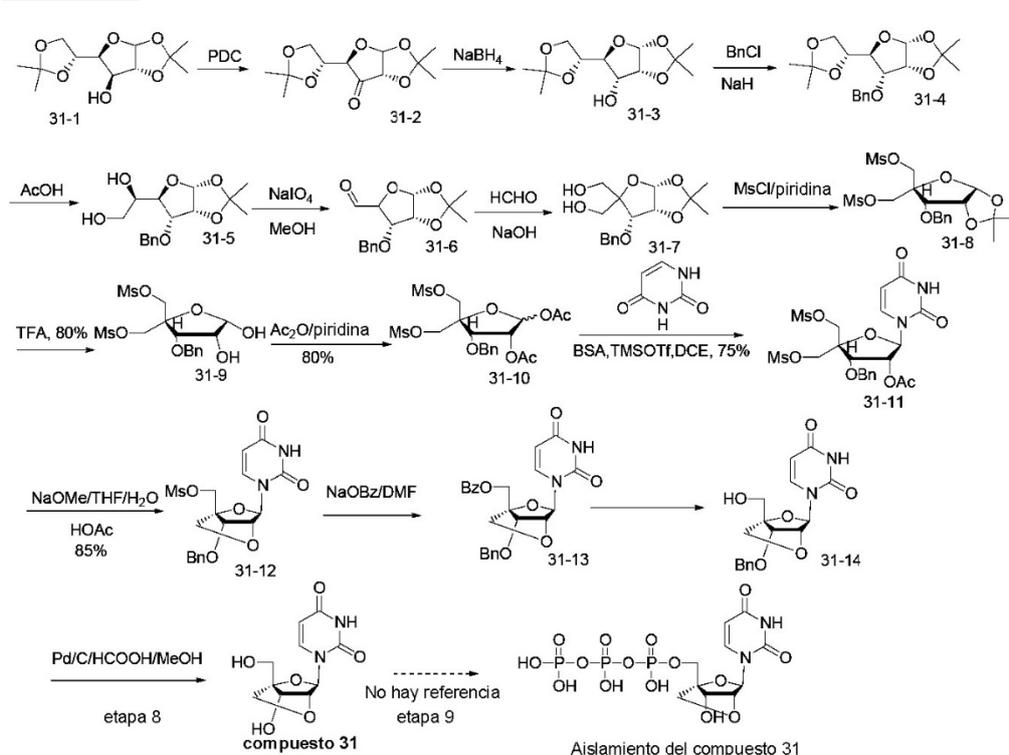
Ejemplo 37. Síntesis de 2'-O,4'-C-metileno guanosina (compuesto 30) y 2'-O,4'-C-metileno GTP (NTP de dicho compuesto)



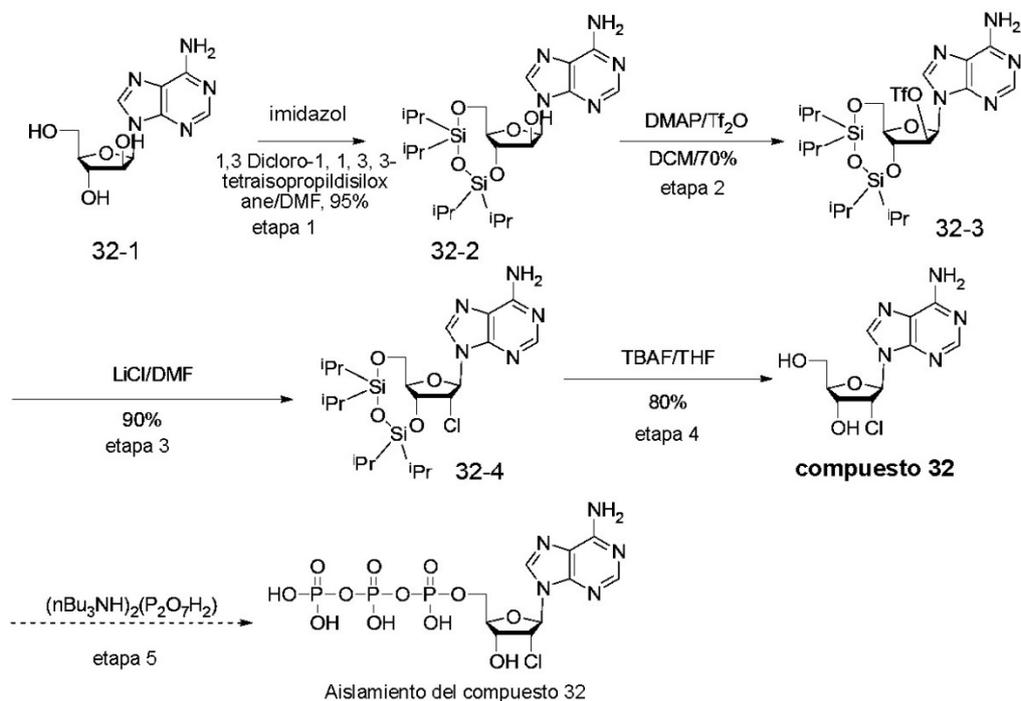
De manera similar a la estrategia proporcionada anteriormente para el compuesto 29, el compuesto de aldofuranosa 30-1 se hizo reaccionar mediante diversas etapas de protección y, a continuación, se añadió 2-amino-6-cloropurina para proporcionar el compuesto 30-5. Las etapas posteriores de ciclización interna, aminación y desprotección proporcionaron el compuesto 30.

Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 38. Síntesis de 2'-O,4'-C-metileno uridina (compuesto 31) y 2'-O,4'-C-metileno UTP (NTP de dicho compuesto)



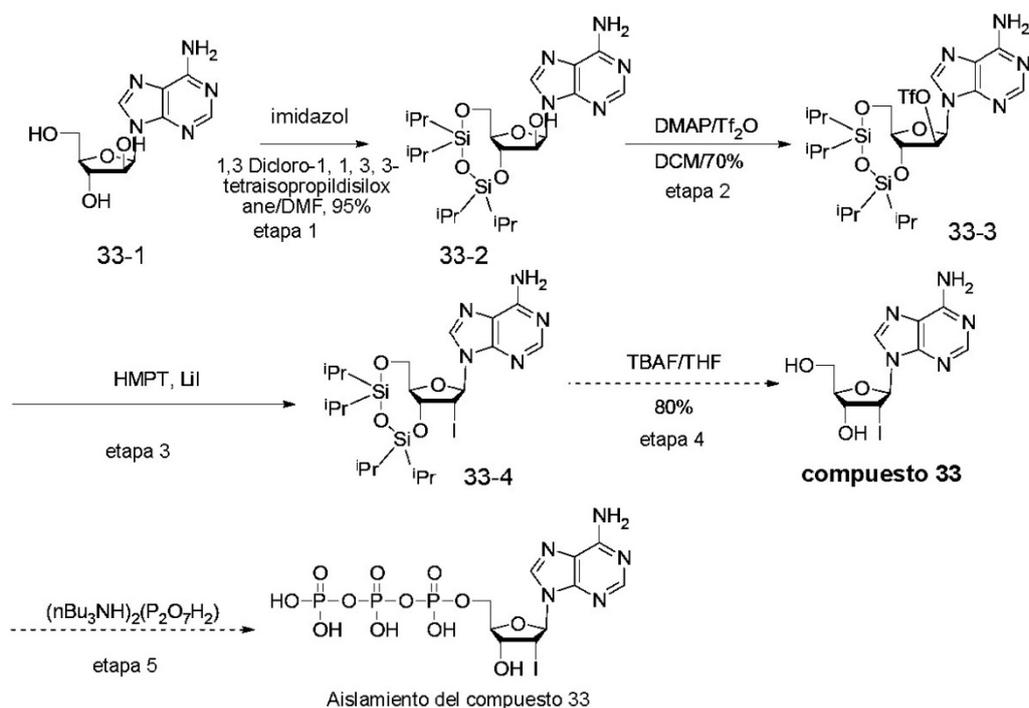
De manera similar a la estrategia proporcionada anteriormente para el compuesto 24, el compuesto 31-7 se produjo con el compuesto 31-1. La mesilación, desprotección y acetilación posteriores proporcionaron el compuesto 30-10. La adición de uracilo y la ciclización interna posterior proporcionaron el compuesto 31-12, y varias etapas de protección y desprotección proporcionaron el compuesto 31. Una reacción de trifosfato posterior (p. ej., como se describe en esta invención) proporcionó el NTP del compuesto 31, que se puede purificar opcionalmente (p. ej., con HPLC).

Ejemplo 39. Síntesis de 2'-cloro adenosina (compuesto 32) y 2'-cloro ATP (NTP de dicho compuesto)

- 5 La arabinoadenosina 32-1 se protegió mediante las etapas 1 y 2 y, a continuación, se cloró para proporcionar el compuesto 32-4. La desprotección posterior proporcionó el compuesto 32, y la reacción de trifosfato proporcionó el NTP del compuesto 32.

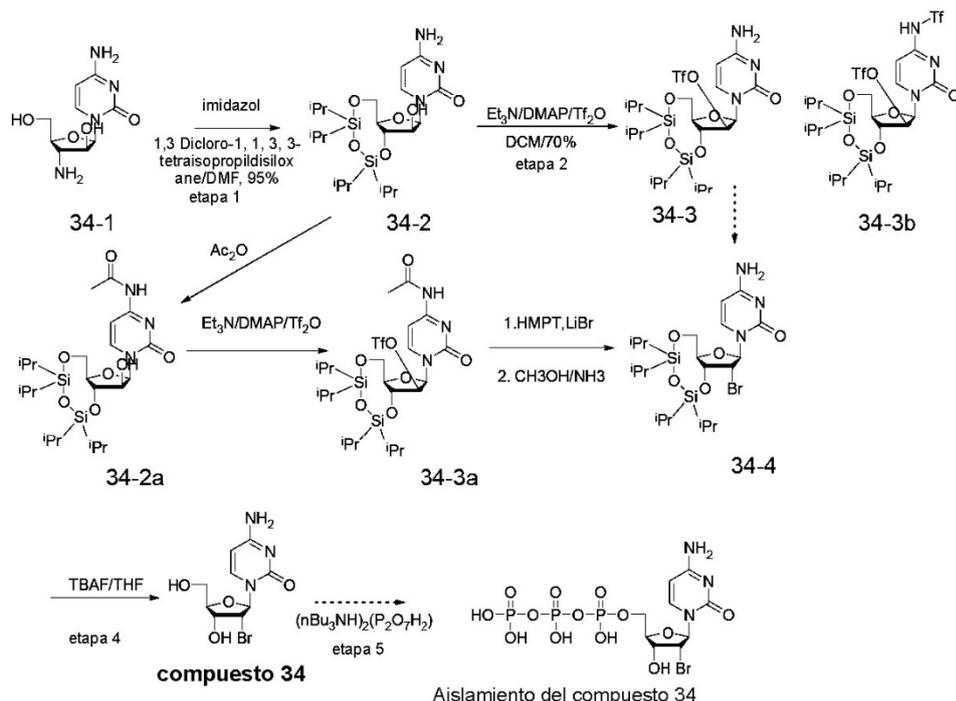
Ejemplo 40. Síntesis de 2'-yodo adenosina (compuesto 33) y 2'-yodo ATP (NTP de dicho compuesto)

10



- 15 La arabinoadenosina 33-1 se protegió mediante las etapas 1 y 2 y, a continuación, se yodó para proporcionar el compuesto 33-4. La desprotección posterior proporcionó el compuesto 33, y la reacción de trifosfato en DMF proporcionó el NTP del compuesto 33.

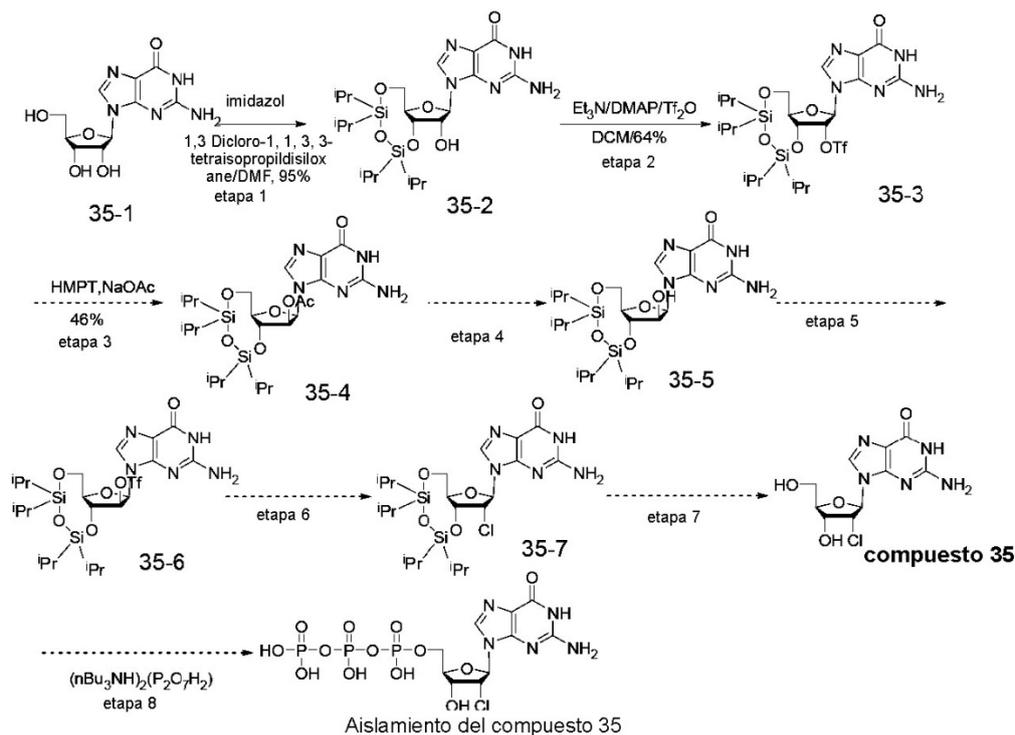
Ejemplo 41. Síntesis de 2'-bromo citidina (compuesto 34) y 2'-bromo CTP (NTP de dicho compuesto)



5 La arabinocitidina 34-1 se protegió en diversas condiciones y, a continuación, se bromó para proporcionar el compuesto 34-4. Opcionalmente, la reacción puede proporcionar el compuesto 34-4 a través del compuesto 34-3a bajo cualquier reacción de protección útil, tal como (i) 1.5 eq. Et₃N, 1 eq. DMAP, 1.2 eq. TfCl, en DCM (10mL); (ii) 3 eq. DMAP, 1.2 eq. TfCl en DCM (15mL); o (iii) 15 eq. DMAP, 1.5 eq. Tf₂O, en DCM (15mL) a -10°C a 0°C durante 2 horas. En particular, se obtuvieron 55 mg del compuesto 34-3a a partir de la condición de reacción (iii). La desprotección posterior proporcionó el compuesto 34, y la reacción de trifosfato en DMF proporcionó el NTP del compuesto 34. El producto bruto 34 podría purificarse opcionalmente antes de la fosforilación.

10

Ejemplo 42. Síntesis de 2'-cloro guanosina (compuesto 35) y 2'-cloro GTP (NTP de dicho compuesto)



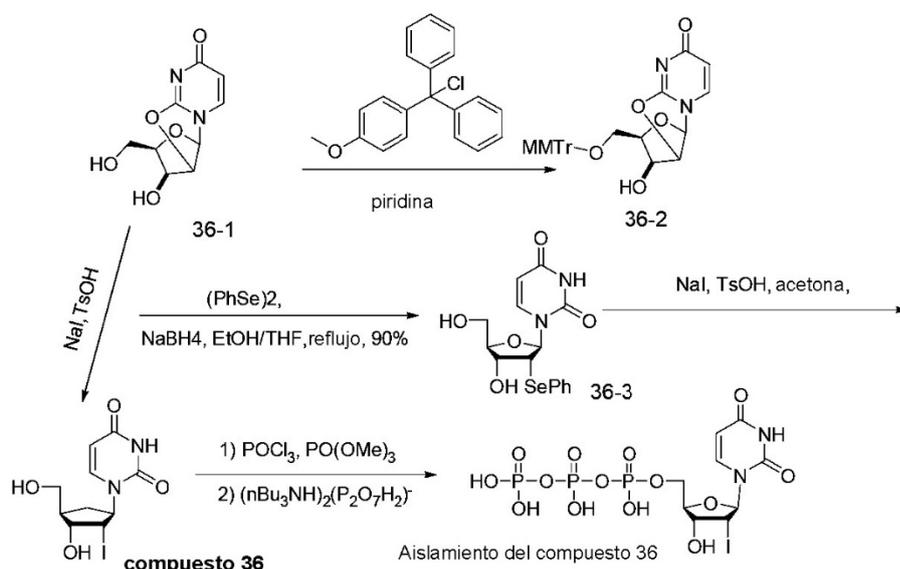
La guanosina 35-1 se protegió en diversas condiciones y, a continuación, se acetiló para proporcionar el compuesto 35-4. La reacción del compuesto 35-2 al compuesto 35-3 se llevó a cabo con 2 eq. DMAP, 2 eq. Et₃N, 3 eq. Tf₂O en 1,2-dicloroetano (10mL) a 40°C durante 4 horas. Se obtuvieron alrededor de 55 mg del compuesto 35-3 después de la purificación.

5

El compuesto deseado 35 se puede obtener mediante cualquier procedimiento útil. Por ejemplo, como se muestra anteriormente, el compuesto 35-4 puede tratarse con etapas posteriores de protección, cloración y desprotección para proporcionar el compuesto 35. Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

10

Ejemplo 43. Síntesis de 2'-yodo uridina (compuesto 36) y 2'-yodo UTP (NTP de dicho compuesto)

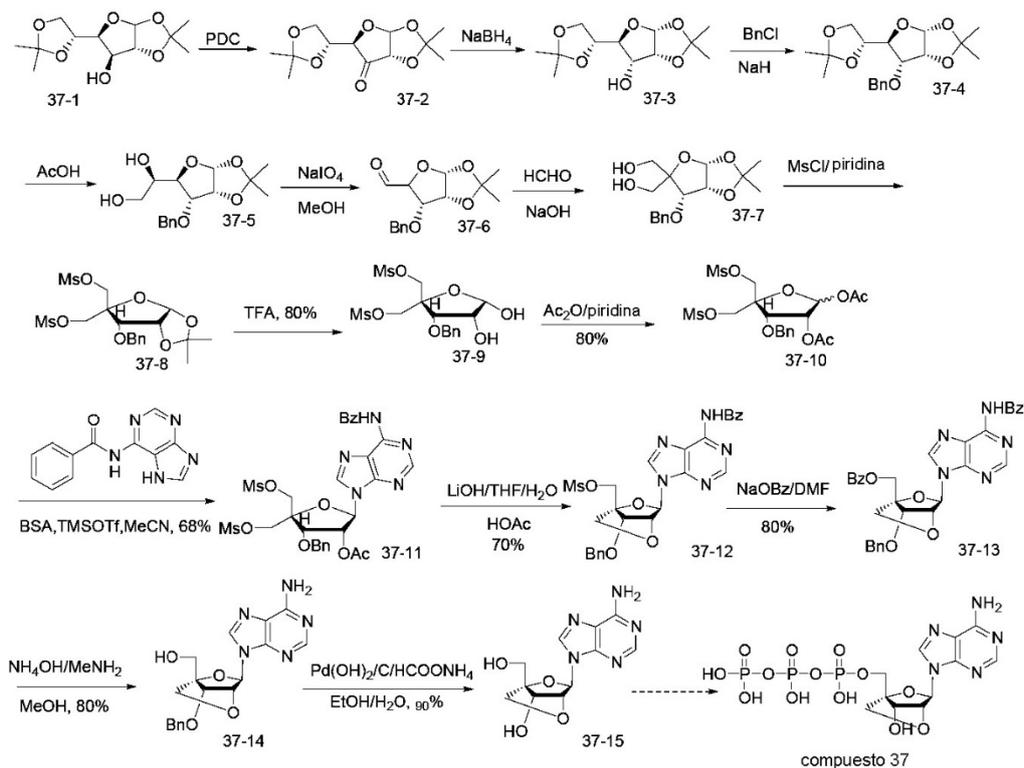


15

O²,2'-Ciclouridina 36-1 se protegió para proporcionar el compuesto 36-2. La yodación posterior, opcionalmente mediada con selenio, proporcionó el compuesto 36. Se llevó a cabo una reacción de trifosfato para proporcionar el NTP del compuesto 36. Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

20

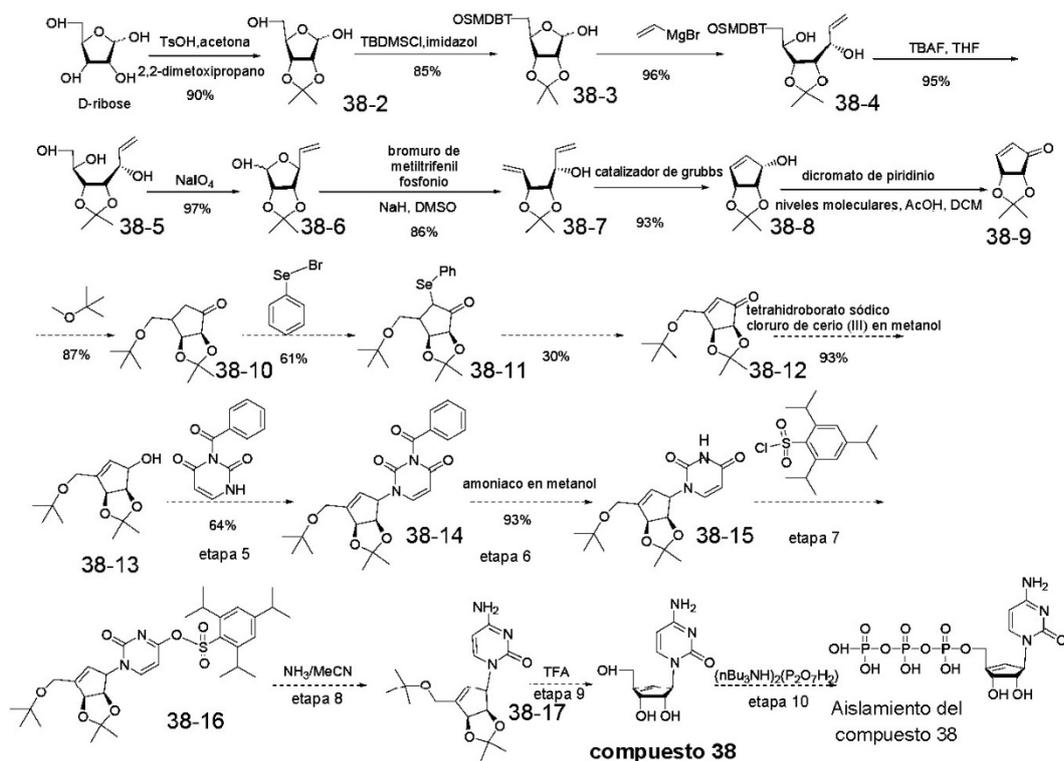
Ejemplo 44. Síntesis de 2'-O,4'-C-metileno adenosina (compuesto 37) y 2'-O,4'-C-metileno ATP (NTP de dicho compuesto)



De manera similar a la estrategia proporcionada anteriormente para el compuesto 24, el compuesto 37-7 se produjo con el compuesto 37-1. La mesilación, desprotección y acetilación posteriores proporcionaron el compuesto 37-10. La adición de uracilo y la ciclación interna posterior proporcionaron el compuesto 37-12. Varias etapas de protección y desprotección proporcionaron el compuesto 37.

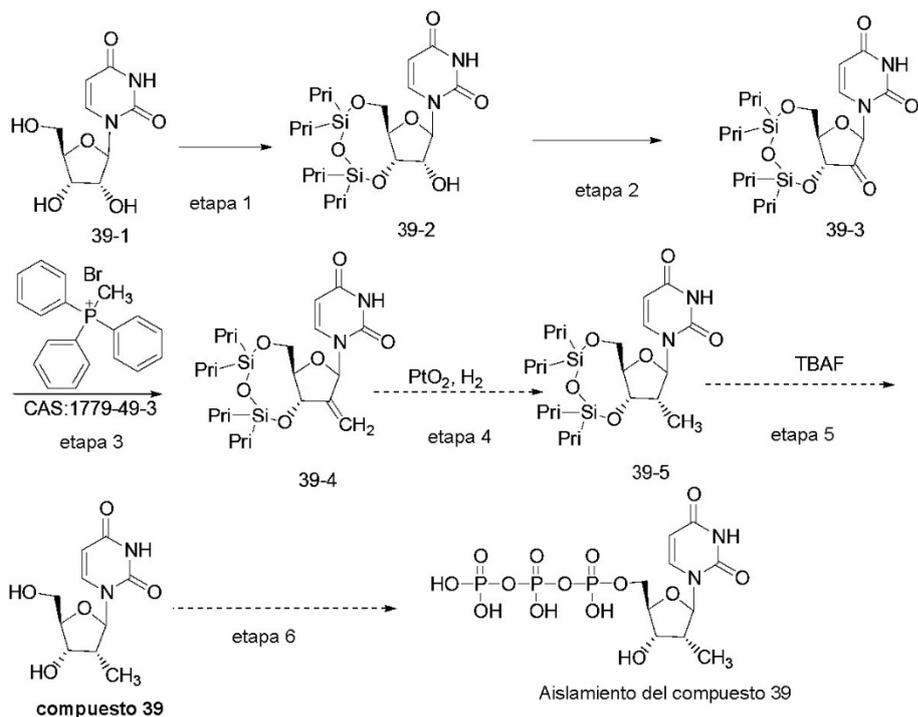
Para obtener el NTP correspondiente, se puede realizar una reacción de trifosfato (por ejemplo, cualquiera descrito en esta invención). Opcionalmente, el NTP se puede purificar (p. ej., usando una columna Sephadex DEAE-A25), liofilizar o evaporar (p. ej., a partir de EtOH).

Ejemplo 45. Síntesis de ciclopenteno diol citidina (compuesto 38) y ciclopenteno diol CTP (NTP de dicho compuesto)



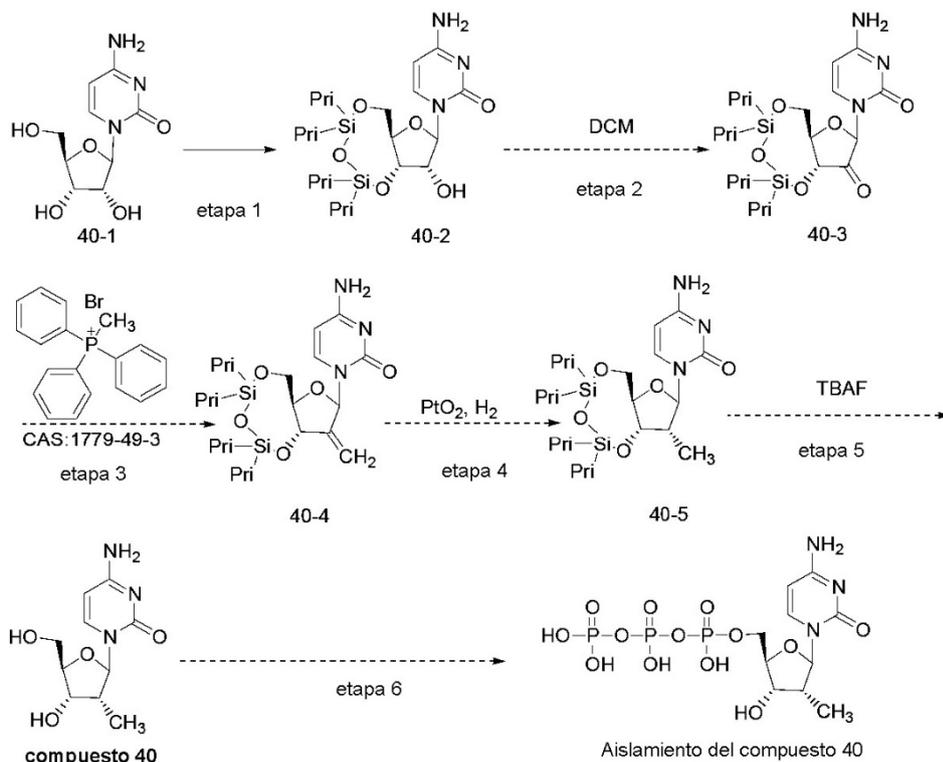
Se protegió D-ribose y, a continuación, se allió para proporcionar el compuesto 38-4, que posteriormente se ciclizó y se redujo para proporcionar el compuesto 38-7. La metátesis de olefina y la oxidación posterior proporcionaron el compuesto 38-9, y las reacciones de reducción adicionales y la adición de N-benzoiluracilo proporcionaron el compuesto 38-14. Las reacciones de desprotección y protección adicionales proporcionaron el compuesto 38 y la reacción de trifosfato (por ejemplo, con cualquier condición de reacción útil, tal como las descritas en esta invención o en la patente de EE. UU. N.º 7.893.227) proporcionó el NTP del compuesto 38.

10 **Ejemplo 46. Síntesis de 2'-metil uridina (compuesto 39) y 2'-metil UTP (NTP de dicho compuesto)**



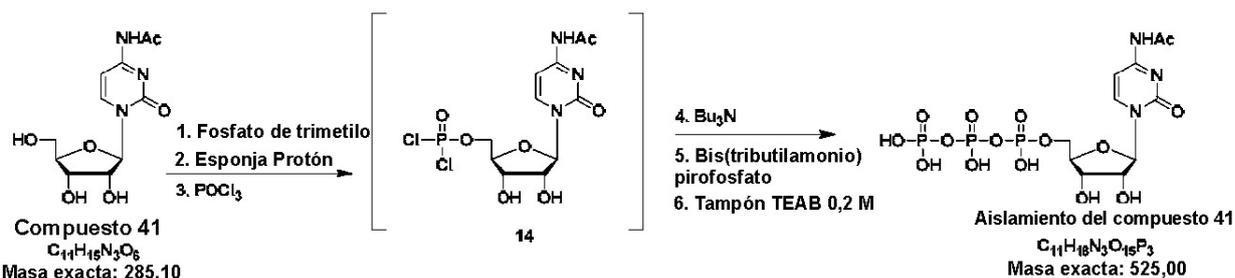
La uridina 39-1 se protegió y, a continuación, se oxidó con 2 eq. de periodano Dess-Martin para proporcionar el compuesto 39-3. Las etapas de reacción, hidrogenación y desprotección posteriores de Wittig proporcionaron el compuesto 39.

5 **Ejemplo 47. Síntesis de 2'-metil citidina (compuesto 40) y 2'-metil CTP (NTP de dicho compuesto)**



La citidina 40-1 se protegió y, a continuación, se oxidó para proporcionar el compuesto 40-3. Las etapas de reacción, hidrogenación y desprotección posteriores de Wittig proporcionaron el compuesto 40.

10 **Ejemplo 48. Síntesis de N-acetil citidina (compuesto 41) y N-acetil CTP (NTP de dicho compuesto)**

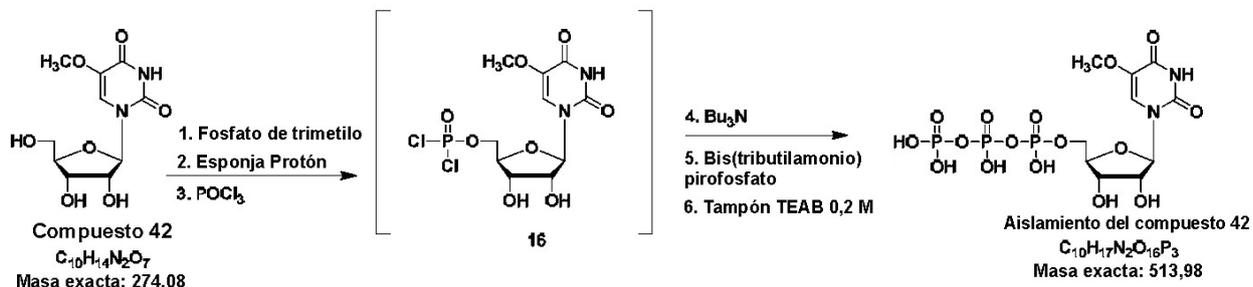


Se añadió una solución de N-acetil-citidina (compuesto 41) (103,0 mg, 0,36 mmol) a una esponja de protones (115,72 mg, 0,54 mmol, 1,50 equiv.) en 1,0 ml de trimetilfosfato (TMP) y 1,0 ml de tetrahidrofurano anhidro (THF). La solución se agitó durante 10 minutos a 0 °C. Se añadió gota a gota oxocloruro de fósforo (POCl_3) (67,2 ul, 0,72 mmol, 2,0 equiv.) a la solución antes de mantenerse agitando durante 2 horas bajo atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistrilammonio (TBAPP o $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (1,28 g, 2,34 mmol, 6,5 equiv.) y tributilamina (350,0 ul, 1,45 mmol, 4,0 equiv.) en 2,5 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 24,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 16,81-17,80 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y se liofilizaron para producir el NTP del compuesto 41. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos

y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.

Ejemplo 49. Síntesis de uridina 5-metoxi (compuesto 42) y UTP 5-metoxi (NTP de dicho compuesto)

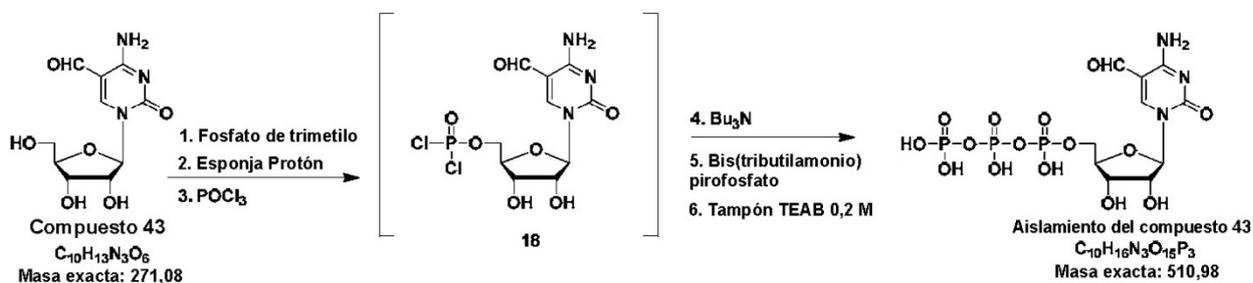
5



Se añadió una solución de 5-metoxi uridina (compuesto 42) (69,0 mg, 0,25 mmol, más calor para hacerla soluble) a una esponja de protones (80,36 mg, 0,375 mmol, 1,50 equiv.) en 0,7 ml de trimetilfosfato (TMP) y se agitó durante 10 minutos a $0^\circ C$. Se añadió oxocloruro de fósforo ($POCl_3$) (46,7 μ l, 0,50 mmol, 2,0 equiv.) gota a gota a la solución antes de mantener la agitación durante 2 horas en una atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$) (894,60 mg, 1,63 mmol, 6,50 equiv.) y tributilamina (243,0 μ l, 1,00 mmol, 4,0 equiv.) en 2,0 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 17,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, $250 \times 21,20$ mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 16,57-17,51 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y se liofilizaron para producir el NTP del compuesto 42. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.

Ejemplo 50. Síntesis de 5-formil citidina (compuesto 43) y 5-formil CTP (NTP de dicho compuesto)

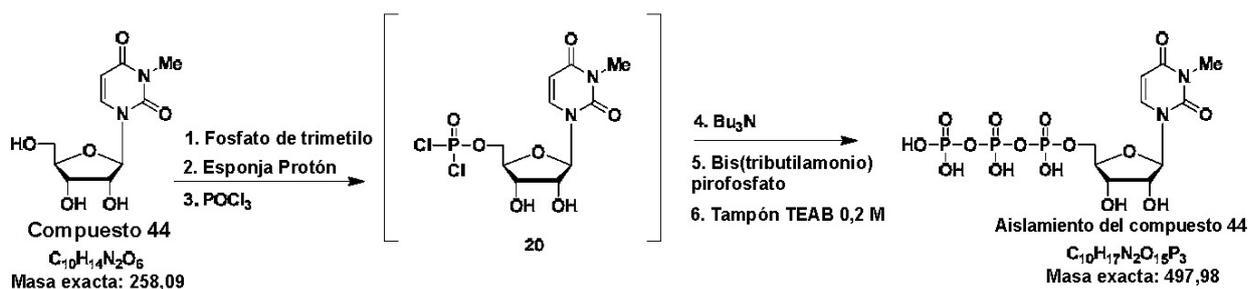
25



Se añadió una solución de 5-formil citidina (compuesto 43) (48,4 mg, 0,18 mmol, más calor para hacerla soluble) a una esponja de protones (57,86 mg, 0,27 mmol, 1,50 equiv.) en 0,7 ml de trimetilfosfato (TMP) y se agitó durante 10 minutos a $0^\circ C$. Se añadió oxocloruro de fósforo ($POCl_3$) (33,6 μ l, 0,36 mmol, 2,0 equiv.) gota a gota a la solución antes de mantener la agitación durante 2 horas en una atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$) (642,0 mg, 1,17 mmol, 6,50 equiv.) y tributilamina (175,0 μ l, 0,72 mmol, 4,0 equiv.) en 1,7 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 12,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, $250 \times 21,20$ mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 17,04-17,87 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y liofilizaron para proporcionar el NTP del compuesto 43. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.

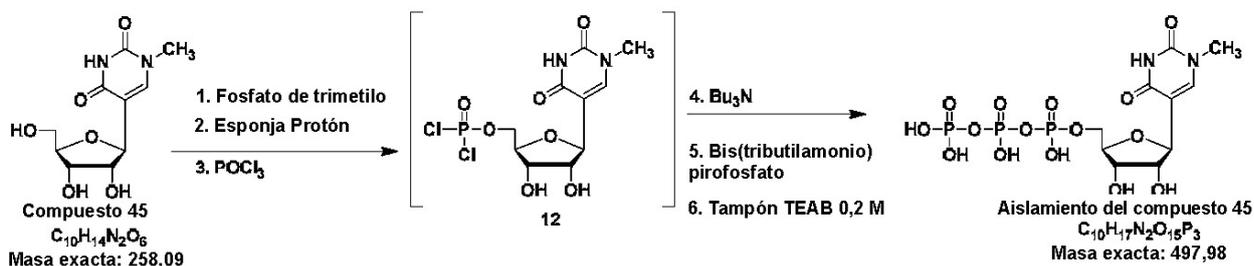
Ejemplo 51. Síntesis de 3-metil uridina (compuesto 44) y 3-metil UTP (NTP de dicho compuesto)

45



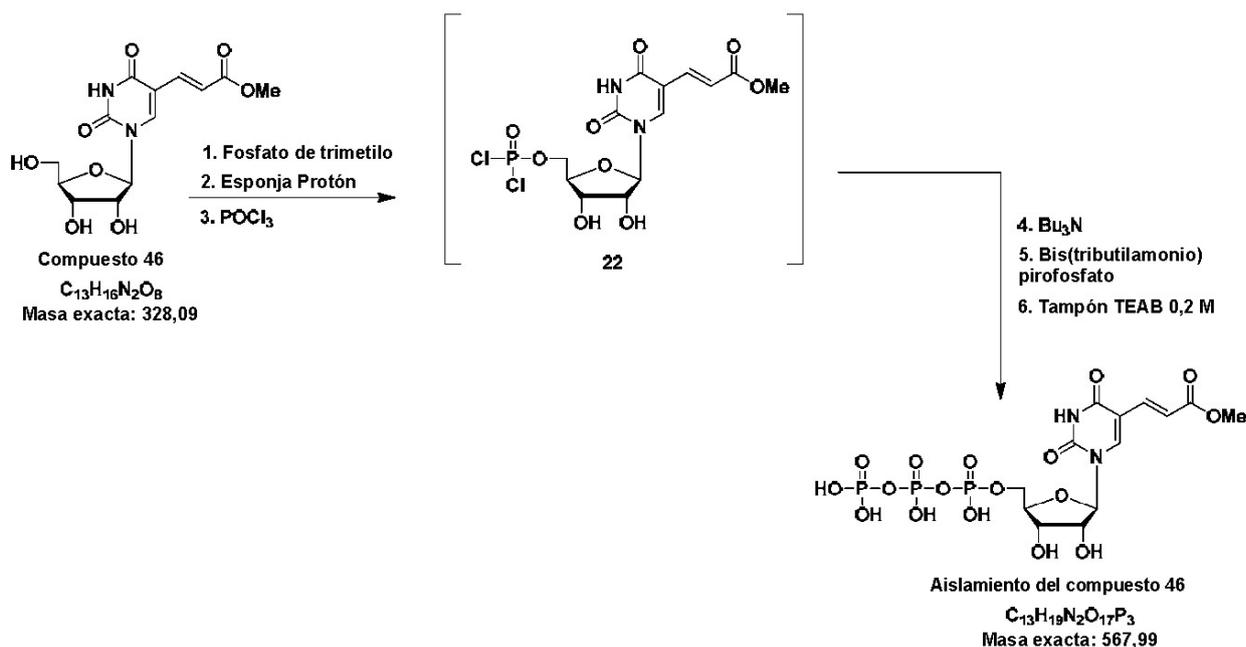
Se añadió una solución de 3-metil uridina (compuesto 44) (45,80 mg, 0,18 mmol) a una esponja de protones (57,86 mg, 0,27 mmol, 1,50 equiv.) en 0,5 ml de trimetilfosfato (TMP) y se agitó durante 10 minutos a 0 °C. Se añadió gota a gota oxocloruro de fósforo (POCl_3) (33,6 ul, 0,36 mmol, 2,0 equiv.) a la solución antes de mantener la agitación durante 2 horas en una atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (652,0 mg, 1,19 mmol, 6,60 equiv.) y tributilamina (175,0 ul, 0,72 mmol, 4,0 equiv.) en 1,3 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 12,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 18,52-19,57 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y liofilizaron para proporcionar el NTP del compuesto 44. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.

Ejemplo 52. Síntesis de N1-metil pseudouridina (compuesto 45) y N1-metil pseudoUTP (NTP de dicho compuesto)



Se añadió una solución de N1-metil pseudouridina (compuesto 45) (96,6 mg, 0,374 mmol, más calor para hacerlo soluble) a una esponja de protones (120,0 mg, 0,56 mmol, 1,50 equiv.) en 0,8 ml de trimetilfosfato (TMP) y se agitó durante 10 minutos a 0 °C. Se añadió oxocloruro de fósforo (POCl_3) (70,0 ul, 0,75 mmol, 2,0 equiv.) gota a gota a la solución antes de mantener la agitación durante 2 horas en una atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (1,36g, 2,47 mmol, 6,60 equiv.) y tributilamina (362,0 ul, 1,5 mmol, 4,0 equiv.) en 2,5 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 17,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 15,91-17,01 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y se liofilizaron para someterse a una reacción de trifosforilación para proporcionar el NTP del compuesto 45. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.

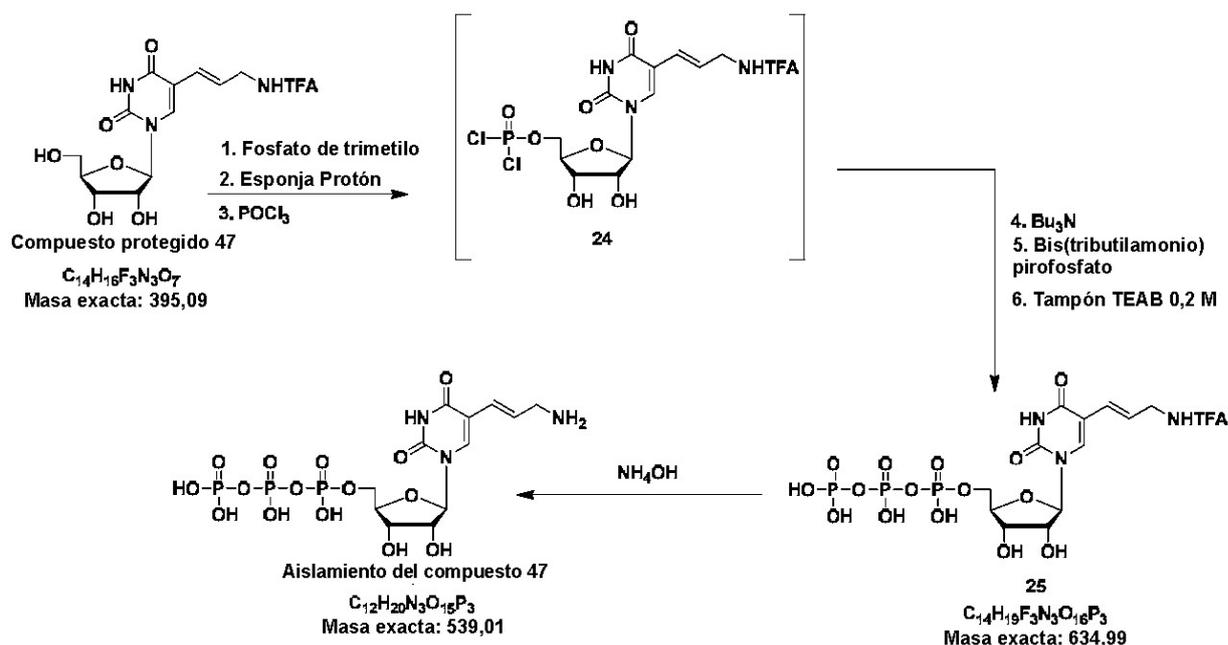
Ejemplo 53. Síntesis de 5-metoxycarboniletetil uridina (compuesto 46) y 5-metoxycarboniletetil UTP (NTP de dicho compuesto)



- Se añadió una solución de 5-metoxycarboniletenil uridina (compuesto 46) (102,0 mg, 0,31 mmol) a una esponja de protones (99,65 mg, 0,46 mmol, 1,50 equiv.) en 0,8 mL de trimetilfosfato (TMP) y se agitó durante 10 minutos a 0 °C.
- 5 Se añadió gota a gota oxiclورو de fósforo ($POCl_3$) (57,8 ul, 0,62 mmol, 2,0 equiv.) a la solución antes de mantener la agitación durante 2 horas en una atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$) (1,12g, 2,05 mol, 6,60 equiv.) y tributilamina (300,0 ul, 1,24 mmol, 4,0 equiv.) en 2,5 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 20,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 21,56-23,21 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y liofilizaron para proporcionar el NTP del compuesto 46. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.
- 10
- 15

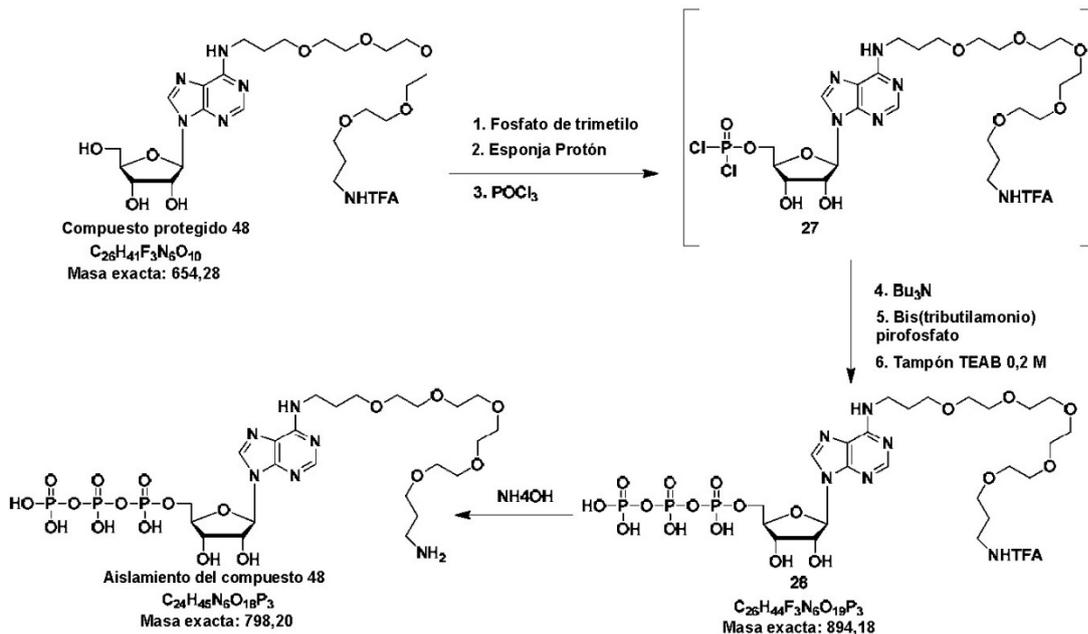
Ejemplo 54. Síntesis de 5-aminopropenil uridina (compuesto 47) y 5-aminopropenil UTP (NTP de dicho compuesto)

20



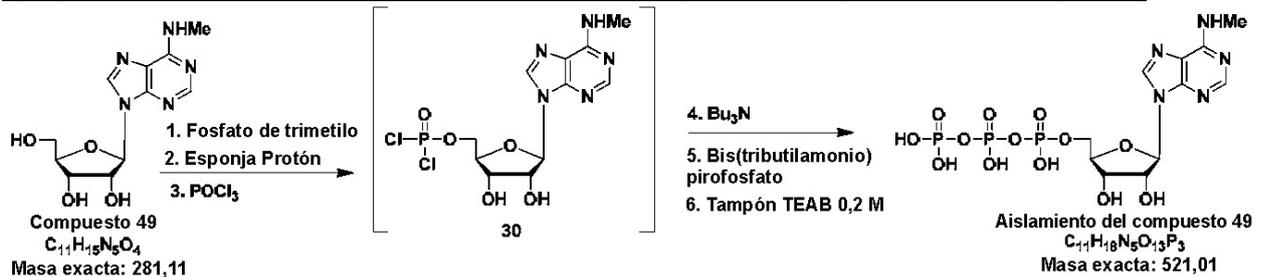
Se protegió 5-aminopropenil uridina 47 y se añadió una solución del compuesto protegido 47 (86,0 mg, 0,22 mmol) a una esponja de protones (70,7 mg, 0,33 mmol, 1,50 equiv.) en 0,7 mL de trimetilfosfato (TMP) y se agitó durante 10 minutos a 0 °C. Se añadió gota a gota oxiclورو de fósforo ($POCl_3$) (41,1 ul, 0,44 mmol, 2,0 equiv.) a la solución antes de mantener la agitación durante 2 horas en una atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$) (784,6 mg, 1,43 mmol, 6,50 equiv.) y tributilamina (213,0 ul, 0,88 mmol, 4,0 equiv.) en 1,6 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 15,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Se añadieron 18,0 ml de hidróxido de amonio concentrado a la mezcla de reacción para retirar el grupo trifluoroacetilo. A continuación, se almacenó agitando durante la noche. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 16,14-17,02 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y liofilizaron para proporcionar el NTP del compuesto 47. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.

20 **Ejemplo 55. Síntesis de adenosina N-PEG (compuesto 48) y N-PEG ATP (NTP de dicho compuesto)**



Se protegió adenosina 48 de N-PEG y se añadió una solución del compuesto protegido 48 (100,0 mg, 0,15 mmol) a una esponja de protones (49,3 mg, 0,23 mmol, 1,50 equiv.) en 0,65 mL de trimetilfosfato (TMP) y se agitó durante 10 minutos a 0 °C. Se añadió gota a gota oxocloruro de fósforo ($POCl_3$) (28,0 ul, 0,3 mmol, 2,0 equiv.) a la solución antes de mantener la agitación durante 2 horas en una atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$) (537,7 mg, 0,98 mmol, 6,50 equiv.) y tributilamina (146,0 ul, 0,6 mmol, 4,0 equiv.) en 1,2 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 10,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Se añadieron 18,0 ml de hidróxido de amonio concentrado a la mezcla de reacción para retirar el grupo trifluoroacetilo. A continuación, se almacenó agitando durante la noche. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 24,5-25,5 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y liofilizaron para proporcionar el NTP del compuesto 48. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.

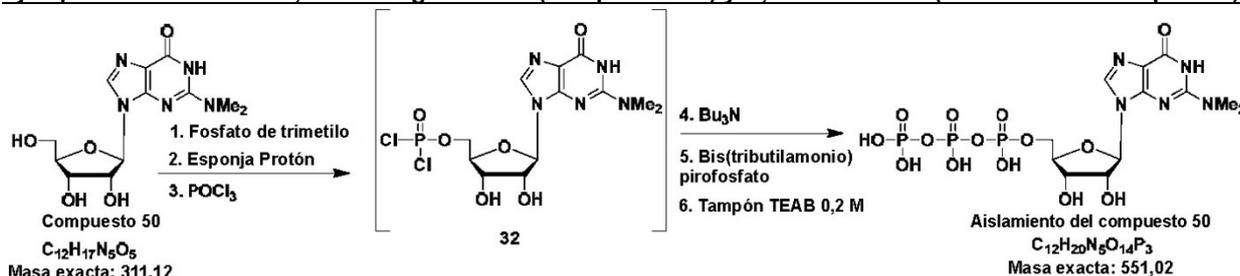
Ejemplo 56. Síntesis de N-metil adenosina (compuesto 49) y N-metil ATP (NTP de dicho compuesto)



Se añadió una solución de N-metil adenosina (compuesto 49) (70,0 mg, 0,25 mmol) a una esponja de protones (79,29 mg, 0,37 mmol, 1,50 equiv.) en 0,7 ml de trimetilfosfato (TMP) y se agitó durante 10 minutos a 0 °C. Se añadió gota a gota oxocloruro de fósforo ($POCl_3$) (46,66 ul, 0,50 mmol, 2,0 equiv.) a la solución antes de mantener la agitación durante 2 horas en una atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$) (888,85 mg, 1,62 mmol, 6,50 equiv.) y tributilamina (241,0 ul, 1,0 mmol, 4,0 equiv.) en 1,3 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 16,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 19,62-20,14 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y liofilizaron para proporcionar el NTP del compuesto 49. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso.

vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.

Ejemplo 57. Síntesis de N,N-dimetil guanosina (compuesto 50) y N,N-dimetil GTP (NTP de dicho compuesto)



5

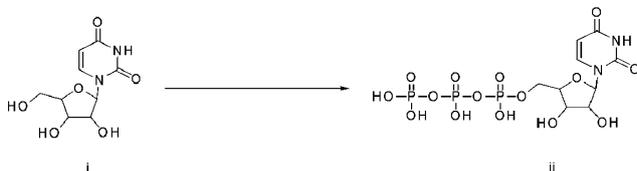
Se añadió una solución de N,N-dimetil guanosina (compuesto 50) (65,8 mg, 0,21 mmol) a una esponja de protones (68,58 mg, 0,32 mmol, 1,50 equiv) en 0,7 ml de trimetilfosfato (TMP) y se agitó durante 10 minutos a 0 °C. Se añadió oxocloruro de fósforo ($POCl_3$) (39,20 ul, 0,42 mmol, 2,0 equiv.) gota a gota a la solución antes de mantener la agitación durante 2 horas en una atmósfera de N_2 . Después de 2 horas, la solución se hizo reaccionar con una mezcla de pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$) (751,67 mg, 1,37 mmol, 6,50 equiv.) y tributilamina (204,0 ul, 0,84 mmol, 4,0 equiv.) en 1,5 ml de dimetilformamida. Después de aproximadamente 15 minutos, la reacción se apagó con 14,0 ml de bicarbonato de trietilamonio 0,2 M (TEAB) y la solución transparente se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se liofilizó durante la noche y la mezcla de reacción bruta se purificó mediante HPLC (Shimadzu, Kyoto Japón, columna preparativa Phenomenex C18, 250 × 21,20 mm, 10,0 micrones; gradiente: 100 % A durante 3,0 min, a continuación 1 % B/min, A = 100 mM de tampón TEAB, B = ACN; caudal: 10,0 ml/min; tiempo de retención: 19,27-19,95 min). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se agruparon y liofilizaron para proporcionar el NTP del compuesto 50. Las reacciones de trifosforilación se llevaron a cabo en un matraz de dos cuellos secado al fuego bajo atmósfera de N_2 . Los nucleósidos y la esponja de proteína se secaron sobre P_2O_5 al vacío durante la noche antes de su uso. La formación de monofosfatos se monitoreó mediante LCMS.

10

15

20

Ejemplo 58. Procedimientos generales para la síntesis de trifosfatos de NTPS



25

El nucleósido i se puede fosforilar mediante cualquier procedimiento útil para proporcionar un compuesto de trifosfato ii. Por ejemplo, el nucleósido se puede añadir a la esponja de protones y trimetilfosfato (TMP) y enfriar (por ejemplo, a -40 °C). El oxocloruro de fósforo ($POCl_3$) se puede agregar gota a gota antes de reaccionar con pirofosfato de bistributilamonio (TBAPP o $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$) y tributilamina. La reacción se puede apagar rápidamente con bicarbonato de trietilamonio (TEAB). Se proporcionan condiciones de ejemplo en las patentes de EE. UU. n.º 7.893.227.

30

Después de la reacción de fosforilación, la mezcla de reacción se puede liofilizar opcionalmente, purificar (por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico y/o HPLC) o convertir en una sal de sodio (por ejemplo, mediante la disolución en MeOH y la adición de perclorato de sodio en acetona).

35

Ejemplo 59: PCR para la producción de ADNc

Los procedimientos de PCR para la preparación de ADNc se realizan utilizando 2x KAPA HIFI™ HotStart ReadyMix de Kapa Biosystems (Woburn, MA). Este sistema incluye 2x KAPA ReadyMix 12,5 µl; cebador directo (10 uM) 0,75 µl; cebador inverso (10 uM) 0,75 µl; ADNc de plantilla 100 ng; y dH_2O diluido a 25,0 µl. Las condiciones de reacción son a 95° C durante 5 minutos y 25 ciclos de 98° C durante 20 segundos, a continuación 58° C durante 15 segundos, a continuación 72° C durante 45 segundos, a continuación 72° C durante 5 minutos y a continuación 4° C hasta la terminación.

40

45

El cebador inverso de la presente descripción incorpora una poli-T₁₂₀ para una poli-A₁₂₀ en el ARNm. Se pueden usar otros cebadores inversos con tramos de poli-T más largos o más cortos para ajustar la longitud de la cola de poli-A en el ARNm.

50

La reacción se limpia con el Micro Kit de PCR PURELINK™ de Invitrogen (Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante (hasta 5 µg). Las reacciones más grandes requerirán una limpieza utilizando un producto con una mayor capacidad. Después de la limpieza, el ADNc se cuantifica usando NanoDrop y se analiza mediante electroforesis en

gel de agarosa para confirmar que el ADNc es el tamaño esperado. A continuación, el ADNc se somete a análisis de secuenciación antes de proceder a la reacción de transcripción *in vitro*.

Ejemplo 60. Transcripción *in vitro* (IVT)

5 La reacción de transcripción *in vitro* genera ARNm que contiene nucleótidos modificados o ARN modificado. La mezcla de nucleótido trifosfato de entrada (NTP) se realiza internamente utilizando NTP naturales y no naturales.

Una reacción de transcripción *in vitro* típica incluye lo siguiente:

Plantilla de ADNc	1,0 µg
10x tampón de transcripción (Tris-HCl 400 mM pH 8.0, MgCl ₂ 190 mM, DTT 50 mM, espermidina 10 mM)	2,0 µl
NTP personalizados (25 mM cada uno)	7,2 µl
Inhibidor de RNasa	20 U
ARN polimerasa T7	3000 U
dH ₂ O	up a 20,0 µl

10 Incubación a 37° C durante 3 h-5 h.

15 La mezcla de IVT cruda se puede almacenar a 4° C durante la noche para su limpieza al día siguiente. A continuación, se utiliza 1 U de DNasa libre de RNasa para digerir la plantilla original. Después de 15 minutos de incubación a 37° C, el ARNm se purifica utilizando el kit MEGACLEAR™ de Ambion (Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit puede purificar hasta 500 µg de ARN. Después de la limpieza, el ARN se cuantifica utilizando NanoDrop y se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar que el ARN es del tamaño adecuado y que no se ha producido degradación del ARN.

20 La ARN polimerasa T7 puede seleccionarse de, ARN polimerasa T7, ARN polimerasa T3 y polimerasas mutantes tales como, pero no se limitan a, las nuevas polimerasas capaces de incorporar NTP modificadas, así como aquellas polimerasas descritas por Liu (Esvelt y col. (Nature (2011) 472(7344):499-503 y la publicación de EE. UU. n.º 20110177495) que reconocen promotores alternativos, Ellington (Chelliserrykatil y Ellington, Nature Biotechnology (2004) 22(9):1155-1160) que describe una variante de polimerasa de ARN T7 para transcribir ARN 2'-O-metil y Sousa (Padilla y Sousa, Nucleic Acids Research (2002) 30(24): e128) que describe un doble mutante de polimerasa de ARN T7.

Ejemplo 61. Recubrimiento enzimático de ARNm

30 El recubrimiento del ARNm se realiza de la siguiente manera cuando la mezcla incluye: ARN IVT 60 µg-180 µg y dH₂O hasta 72 µl. La mezcla se incuba a 65° C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN y, a continuación, se transfiere inmediatamente al hielo.

35 A continuación, el protocolo implica la mezcla de 10x de tampón de recubrimiento (0,5 M de Tris-HCl (pH 8.0), 60 mM de KCl, 12,5 mM de MgCl₂) (10,0 µl); 20 mM de GTP (5,0 µl); 20 mM de S-adenosil metionina (2,5 µl); inhibidor de RNasa (100 U); 2'-O-metiltransferasa (400 U); enzima de recubrimiento de Vaccinia (Guanilil transferasa) (40 U); dH₂O (hasta 28 µl); e incubación a 37 °C durante 30 minutos para 60 µg de ARN o hasta 2 horas para 180 µg de ARN.

40 A continuación, el ARNm se purifica utilizando el kit MEGACLEAR™ de Ambion (Austin, TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la limpieza, el ARN se cuantifica utilizando NANODROP™ (ThermoFisher, Waltham, MA) y se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar que el ARN es del tamaño adecuado y que no se ha producido degradación del ARN. El producto de ARN también se puede secuenciar mediante la ejecución de una PCR de transcripción inversa para generar el ADNc para la secuenciación.

Ejemplo 62. Reacción de cola PolvA

50 Sin un poli-T en el ADNc, se debe realizar una reacción de cola poli-A antes de limpiar el producto final. Esto se hace mezclando ARN IVT recubierto (100 µl); inhibidor de RNasa (20 U); tampón de cola 10× (Tris-HCl 0,5 M (pH 8.0), NaCl 2,5 M, MgCl₂ 100 mM)(12,0 µl); ATP 20 mM (6,0 µl); polimerasa Poli-A (20 U); dH₂O hasta 123,5 µl e incubación a 37 °C durante 30 min. Si la cola de poli-A ya está en la transcripción, entonces la reacción de cola puede omitirse y proceder directamente a la limpieza con el kit MEGACLEAR™ de Ambion (Austin, TX) (hasta 500 µg). La polimerasa Poli-A es preferentemente una enzima recombinante expresada en levadura.

55 Para los estudios realizados y descritos en esta invención, la cola de poli-A se codifica en la plantilla IVT para comprender 160 nucleótidos de longitud. Sin embargo, debe entenderse que la procesividad o integridad de la reacción

de cola de poli-A puede no siempre resultar exactamente en 160 nucleótidos. Por lo tanto, las colas de poli-A de aproximadamente 160 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 150-165, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164 o 165 están dentro del alcance de la descripción.

5 **Ejemplo 63. Procedimiento de detección para la expresión de proteínas**

A. Ionización por electropulverización

10 Se prepara y analiza una muestra biológica que puede contener proteínas codificadas por ARN modificado administrado al sujeto según el protocolo del fabricante para la ionización por electropulverización (ESI) utilizando 1, 2, 3 o 4 analizadores de masas. Una muestra biológica también se puede analizar usando un sistema de espectrometría de masas ESI en tándem.

15 Los patrones de fragmentos de proteína, o proteínas enteras, se comparan con controles conocidos para una proteína dada y la identidad se determina por comparación.

B. Desorción/ionización láser asistida por matriz

20 Se prepara y analiza una muestra biológica que puede contener proteínas codificadas por ARN modificado administrado al sujeto según el protocolo del fabricante para la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI).

Los patrones de fragmentos de proteína, o proteínas enteras, se comparan con controles conocidos para una proteína dada y la identidad se determina por comparación.

25 **C. Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas-Espectrometría de masas**

Una muestra biológica, que puede contener proteínas codificadas por ARN modificado, se puede tratar con una enzima tripsina para digerir las proteínas contenidas dentro. Los péptidos resultantes se analizan mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas-espectrometría de masas (LC/MS/MS). Los péptidos se fragmentan en el espectrómetro de masas para proporcionar patrones de diagnóstico que se pueden emparejar con bases de datos de secuencias de proteínas mediante algoritmos informáticos. La muestra digerida puede diluirse para lograr 1 ng o menos de material de partida para una proteína dada. Las muestras biológicas que contienen un fondo tampón simple (por ejemplo, agua o sales volátiles) son susceptibles de digerirse directamente en solución; los fondos más complejos (por ejemplo, detergente, sales no volátiles, glicerol) requieren una etapa de limpieza adicional para facilitar el análisis de la muestra.

30

35

Los patrones de fragmentos de proteína, o proteínas enteras, se comparan con controles conocidos para una proteína dada y la identidad se determina por comparación.

40 **Ejemplo 64. Estudio de citocinas: PBMC**

A. Aislamiento y cultivo de PBMC

45 Se recibieron 50 mL de sangre humana de dos donantes de Research Blood Components (lotes KP30928 y KP30931) en tubos de heparina de sodio. Para cada donante, la sangre se agrupó y se diluyó a 70 mL con DPBS (SAFC Bioscience 59331C, lote 071M8408) y se dividió uniformemente entre dos tubos cónicos de 50 mL. 10 mL de Ficoll Paque (GE Healthcare 17-5442-03, lote 10074400) se dispensó suavemente debajo de la capa de sangre. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 30 minutos con baja aceleración y frenado. Los tubos se retiraron y las capas de PBMC de capa esponjosa se transfirieron suavemente a un cónico fresco de 50 mL y se lavaron con DPBS. Los tubos se centrifugaron a 1450 rpm durante 10 minutos.

50

El sobrenadante se aspiró y las pastillas de PBMC se resuspendieron y se lavaron en 50 mL de DPBS. Los tubos se centrifugaron a 1250 rpm durante 10 minutos. Esta etapa de lavado se repitió, y las pastillas de PBMC se resuspendieron en 19 mL de Optimem I (Gibco 11058, lote 1072088) y se contaron. Las suspensiones celulares se ajustaron a una concentración de $3,0 \times 10^6$ células / ml de células vivas.

55

Estas células se colocaron en placas en cinco placas de fondo redondo tratadas con cultivo de tejido de 96 pocillos (Costar 3799) por donante a 50 uL por pocillo. En 30 minutos, se añadieron mezclas de transfección a cada pocillo a un volumen de 50 uL por pocillo. Después de 4 horas después de la transfección, el medio se complementó con 10 uL de suero bovino fetal (Gibco 10082, lote 1012368)

60

B. Preparación para la transfección

65 ARNm modificado que codifica G-CSF humano (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; Tapa 5', Tapa 1) (que contiene (1) NTP naturales, (2) 100 % de sustitución con 5-metilcitosina y pseudouridina, o (3) 100 % de sustitución con 5-metilcitosina y N1-metil

pseudouridina; ARNm que codifica luciferasa (secuencia de ADNc IVT mostrada en SEQ ID NO: 2; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3, la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia, tapa 5', Tapa 1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) (que contiene (1) NTP naturales o (2) 100 % de sustitución con 5-metilcitosina y pseudouridina) y agonista de TLR R848 (Invivogen tlr1-r848) se diluyeron a 38,4 ng / uL en un volumen final de 2500 uL Optimem I.

Por separado, 110 uL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668-027, lote 1070962) se diluyó con 6,76 mL de Optimem I. En una placa de 96 pocillos, se agregaron nueve alícuotas de 135 uL de cada ARNm, control positivo (R-848) o control negativo (Optimem I) a 135 uL de Lipofectamine 2000 diluida. La placa que contiene el material que se va a transfectar se incubó durante 20 minutos. Las mezclas de transfección se transfirieron a continuación a cada una de las placas de PBMC humana a 50 uL por pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C. A las 2, 4, 8, 20 y 44 horas, cada placa se retiró de la incubadora y los sobrenadantes se congelaron.

Después de retirar la última placa, los sobrenadantes se analizaron utilizando un kit de ELISA G-CSF humano (Invitrogen KHC2032) y un kit de ELISA IFN-alfa humano (Thermo Scientific 41105-2). Cada condición se hizo por duplicado.

C. Análisis de proteína y respuesta inmune innata

Se evaluó la capacidad del ARNm no modificado y modificado para producir la proteína codificada (producción de G-CSF) a lo largo del tiempo, así como la capacidad del ARNm para activar el reconocimiento inmunitario innato medido por la producción de interferón-alfa. El uso de cultivos de PBMC *in vitro* es una forma aceptada de medir el potencial inmunoestimulante de los oligonucleótidos (Robbins y col., Oligonucleótidos 2009 19:89-102).

Los resultados se interpolaron contra la curva estándar de cada placa de ELISA utilizando un ajuste de curva logística de cuatro parámetros. En las Tablas 4 y 5 se muestra el promedio de 3 donantes de PBMC separados de la producción de G-CSF, interferón-alfa (IFN-alfa) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) a lo largo del tiempo según lo medido por ELISA específico.

En el ELISA de G-CSF, la señal de fondo de la condición no tratada de Lipofectamine 2000 (LF2000) se restó en cada punto temporal. Los datos demostraron que la producción específica de proteína G-CSF humana mediante mononucleares de sangre periférica humana se observa con ARNm de G-CSF que contiene NTP naturales, 100 % de sustitución con 5-metilcitosina y pseudouridina, o 100 % de sustitución con 5-metilcitosina y N1-metil pseudouridina. La producción de G-CSF aumentó significativamente mediante el uso de ARNm modificado con 5-metilcitosina y N1-metil pseudouridina en relación con ARNm modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina.

Con respecto al reconocimiento inmunitario innato, aunque ambas químicas de ARNm modificado impidieron en gran medida la producción de IFN-alfa y TNF-alfa con respecto a los controles positivos (R848, p(I)p(C)), existían diferencias significativas entre las químicas. 5-metil citidina y ARNm modificado con pseudouridina dieron como resultado niveles bajos pero detectables de producción de IFN-alfa y TNF-alfa, mientras que 5-metil citidina y ARNm modificado con N1-metil pseudouridina no dieron como resultado producción de IFN-alfa y TNF-alfa detectables.

En consecuencia, se ha determinado que, además de la necesidad de revisar más de un marcador de citocinas de la activación de la respuesta inmunitaria innata, se ha encontrado sorprendentemente que las combinaciones de modificaciones proporcionan diferentes niveles de respuesta celular (producción de proteínas y activación inmunitaria). La modificación, N1-metil pseudouridina, en este estudio ha demostrado transmitir protección adicional sobre la combinación estándar de 5-metilcitosina/pseudouridina explorada por otros que resulta en el doble de proteína y casi 150 veces la reducción en la activación inmune (TNF-alfa).

Dado que la PBMC contiene una gran variedad de sensores de reconocimiento de ARN inmunitario innatos y también es capaz de traducir proteínas, ofrece un sistema útil para probar la interdependencia de estas dos vías. Se sabe que la traducción de ARNm puede verse afectada negativamente por la activación de dichas vías inmunitarias innatas (Kariko y col. Immunity (2005) 23:165-175; Warren y col. Cell Stem Cell (2010) 7:618-630). Usando PBMC como un sistema de ensayo *in vitro* es posible establecer una correlación entre la traducción (en este caso la producción de proteína G-CSF) y la producción de citocinas (en este caso ejemplificada por la producción de proteína IFN-alfa y TNF-alfa). Una mejor producción de proteínas se correlaciona con una menor inducción de la vía de activación inmunitaria innata, y las nuevas químicas se pueden juzgar favorablemente en función de esta relación (Tabla 6).

En este estudio, la relación PC para las dos modificaciones químicas, pseudouridina y N1-metil pseudouridina, ambas con 5-metilcitosina fue 4742/141=34 en comparación con 9944/1=9944 para la citocina IFN-alfa. Para la citocina, TNF-alfa, las dos sustancias químicas tenían proporciones de PC de 153 y 1243, respectivamente, lo que sugiere que para cualquiera de las citocinas, la N1-metilpseudouridina es la modificación superior. En las Tablas 4 y 5, "NT" significa no probado.

Tabla 4. G-CSF

G-CSF: 3 Promedio de donantes (pg/ml)	
G-CSF	4742
5-metil citosina/ pseudouridina	
G-CSF	9944
5-metilcitosina/ N1-metilpseudouridina	
Luciferasa	18
LF2000	16

Tabla 5. IFN-alfa y TNF-alfa

	IFN-alfa: 3 Promedio de donantes (pg/ml)	TNF-alfa: 3 Promedio de donantes (pg/ml)
G-CSF	141	31
5-metil citosina/ pseudouridina		
G-CSF	1	8
5-metilcitosina/ N1-metilpseudouridina		
P(I)P(C)	1104	NT
R-848	NT	1477
LF2000	17	25

Tabla 6. Proporciones de G-CSF a citocinas

	G-CSF/ IFN-alfa (relación)			G-CSF/TNF-alfa (relación)		
	5-metil citosina/ pseudouridina	5-metilcitosina/ metilpseudouridina	N1-	5-metil citosina/ pseudouridina	5-metilcitosina/ metilpseudouridina	N1-
Relación PC	34	9944		153	1243	

5

Ejemplo 65. Intervalos de modificación química de ARNm modificado

Se ha demostrado que los nucleósidos modificados tales como, pero no limitados a, las modificaciones químicas 5-metilcitosina y pseudouridina reducen la respuesta inmunitaria innata y aumentan la expresión de ARN en células de mamífero. Sorprendentemente y no conocido previamente, los efectos manifestados por estas modificaciones químicas se pueden titular cuando la cantidad de modificación química de un nucleótido particular es inferior al 100 %. Anteriormente, se creía que el beneficio de la modificación química podría derivarse del uso de un reemplazo menos que completo de un nucleósido modificado y los informes publicados sugieren que no hay pérdida de beneficio hasta que el nivel de sustitución con un nucleósido modificado sea inferior al 50 % (Kariko y col., Immunity (2005) 23:165-175).

Sin embargo, ahora se ha demostrado que los beneficios de la modificación química están directamente correlacionados con el grado de modificación química y deben considerarse en vista de más de una sola medida de respuesta inmune. Tales beneficios incluyen una producción mejorada de proteínas o traducción de ARNm y reducción o evitación de la estimulación de la respuesta inmunitaria innata según lo medido por perfiles de citocinas y métricas de desencadenantes de respuesta inmunitaria.

La traducción mejorada de ARNm y la reducción o falta de estimulación inmunitaria innata se observan con una sustitución del 100 % con un nucleósido modificado. Menores porcentajes de sustitución dan como resultado menos traducción de ARNm y más estimulación inmunitaria innata, con ARNm no modificado que muestra la traducción más baja y la estimulación inmunitaria innata más alta.

25

Estudios *in vitro* de PBMC: Porcentaje de modificación

Se transfectaron 480 ng de ARNm de G-CSF modificado con 5-metilcitosina (5mC) y pseudouridina (pseudoU) o ARNm de G-CSF no modificado con 0,4 uL de Lipofectamine 2000 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres donantes de sangre normales (D1, D2 y D3). El ARNm de G-CSF (SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) se modificó completamente con 5mC y pseudo (100 % de modificación), no se modificó con 5mC y pseudo (0 % de modificación) o se modificó parcialmente con 5mC y pseudoU, por lo que el ARNm contendría un 75 % de modificación, un 50 % de modificación o un 25 % de modificación. Una muestra de control de luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1; 5mC y pseudoU completamente modificados) también se analizó para determinar la expresión de G-CSF. Para las muestras de control de TNF-alfa e IFN-alfa de Lipofectamine2000, LPS, R-848, Luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa1; 5mC y pseudo completamente modificados) y P(I)P(C) también se analizaron. El sobrenadante se recolectó y se ejecutó mediante ELISA 22 horas después de la transfección para determinar la expresión de la proteína. La expresión de G-CSF se muestra en la Tabla 7 y la expresión de IFN-alfa y TNF-alfa se muestra en la Tabla 8. La expresión de IFN-alfa y TNF-alfa puede ser un efecto secundario de la transfección del ARNm de G-CSF. Las Tablas 7, 8 y la Figura 10 muestran que la cantidad de modificación química de G-CSF, interferón alfa (IFN-alfa) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) se puede valorar cuando el ARNm no se modifica completamente y la tendencia valorable no es la misma para cada objetivo.

Como se mencionó anteriormente, usando PBMC como un sistema de ensayo *in vitro* es posible establecer una correlación entre la traducción (en este caso la producción de proteína G-CSF) y la producción de citocinas (en este caso ejemplificada por la producción de proteína IFN-alfa). La mejor producción de proteínas se correlaciona con una menor inducción de la vía de activación inmunitaria innata, y el porcentaje de modificación de una química se puede juzgar favorablemente en función de esta relación (Tabla 9). Como se calcula a partir de las Tablas 7 y 8 y se muestra en la Tabla 9, la modificación completa con 5-metilcitosina y pseudouridina muestra una relación mucho mejor de producción de proteína/citocina que sin ninguna modificación (ARNm de G-CSF natural) (100 veces para IFN-alfa y 27 veces para TNF-alfa). La modificación parcial muestra una relación lineal con cada vez menos modificación que resulta en una relación proteína/citocina más baja.

Tabla 7. Expresión G-CSF

	Expresión G-CSF (pg/ml)		
	D1	D2	D3
100 % de modificación	1968,9	2595,6	2835,7
75 % de modificación	566,7	631,4	659,5
50 % de modificación	188,9	187,2	191,9
25 % de modificación	139,3	126,9	102,0
0 % de modificación	194,8	182,0	183,3
Luciferasa	90,2	0,0	22,1

Tabla 8. Expresión de IFN-alfa y TNF-alfa

	Expresión de IFN-alfa (pg/ml)			Expresión de TNF-alfa (pg/ml)		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3
100 % de modificación	336,5	78,0	46,4	115,0	15,0	11,1
75 % de modificación	339,6	107,6	160,9	107,4	21,7	11,8
50 % de modificación	478,9	261,1	389,7	49,6	24,1	10,4
25 % de modificación	564,3	400,4	670,7	85,6	26,6	19,8
0 % de modificación	1421,6	810,5	1260,5	154,6	96,8	45,9
LPS	0,0	0,6	0,0	0,0	12,6	4,3
R-848	0,5	3,0	14,1	655,2	989,9	420,4
P(I)P(C)	130,8	297,1	585,2	765,8	2362,7	1874,4
Solo lípidos	1952,2	866,6	855,8	248,5	82,0	60,7

Tabla 9. Relación PC y Efecto de Porcentaje de Modificación

% Modificación	G-CSF (pg/ml)	IFN-a (pg/ml)	TNF-a (pg/ml)	G-CSF/ (relación PC)	IFN-alfa (relación PC)	G-CSF/TNF-alfa (relación PC)
100	2466	153	47	16		52
75	619	202	47	3,1		13
50	189	376	28	0,5		6,8
25	122	545	44	0,2		2,8
0	186	1164	99	0,16		1,9

Ejemplo 66. ARN modificado transfectado en PBMC

5 Se transfectaron 500 ng de ARNm de G-CSF modificado con 5-metilcitosina (5mC) y pseudouridina (pseudoU) o ARNm de G-CSF no modificado con 0,4 uL de Lipofectamine 2000 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres donantes de sangre normales (D1, D2 y D3). El ARNm de G-CSF (SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; Tapa 5', Tapa1) se modificó completamente con 5mC y pseudo (100 % de modificación), no se modificó con 5mC y pseudo (0 % de modificación) o se modificó parcialmente con 5mC y pseudoU, por lo que el ARNm contendría un 50 % de modificación, 25 % de modificación, 10 % de modificación, 5 % de modificación, 1 % de modificación o 0,1 % de modificación. Una muestra de control de mCherry (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; Tapa 5', Tapa1; 5mC y pseudouridina completamente modificados) y G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (G-CSF de control) también se analizó para determinar la expresión de G-CSF. Para las muestras de control del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) e interferón-alfa (IFN-alfa) de Lipofectamina2000, LPS, R-848, Luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa1; 5mC y pseudo completamente modificados) y P(I)P(C) también se analizaron. El sobrenadante se recolectó 6 horas y 18 horas después de la transfección y se ejecutó mediante ELISA para determinar la expresión de la proteína. La expresión de G-CSF, IFN-alfa y TNF-alfa para el Donante 1 se muestra en la Tabla 10, el Donante 2 se muestra en la Tabla 11 y el Donante 3 se muestra en la Tabla 12.

25 La modificación completa del 100 % con 5-metilcitosina y pseudouridina dio como resultado la mayor traducción de proteínas (G-CSF) y la menor cantidad de citocina producida en los tres donantes de PBMC humanos. La disminución de las cantidades de modificación da como resultado una mayor producción de citocinas (IFN-alfa y TNF-alfa), lo que resalta aún más la importancia de la modificación completa para reducir las citocinas y mejorar la traducción de proteínas (como se evidencia aquí por la producción de G-CSF).

Tabla 10. Donante 1

	G-CSF (pg/ml)		IFN-alfa (pg/ml)		TNF-alfa (pg/ml)	
	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas
100 % Mod	1815	2224	1	13	0	0
75 % Mod	591	614	0	89	0	0
50 % Mod	172	147	0	193	0	0
25% Mod	111	92	2	219	0	0
10% Mod	138	138	7	536	18	0
1 % Mod	199	214	9	660	18	3
0,1 % Mod	222	208	10	597	0	6
0 % Mod	273	299	10	501	10	0
Control G-CSF	957	1274	3	123	18633	1620
mCherry	0	0	0	10	0	0
Sin tratamiento	N/A	N/A	0	0	1	1

Tabla 11. Donante 2

	G-CSF (pg/ml)		IFN-alfa (pg/ml)		TNF-alfa (pg/ml)	
	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas
100% Mod	2184	2432	0	7	0	11
75 % Mod	935	958	3	130	0	0
50 % Mod	192	253	2	625	7	23
25 % Mod	153	158	7	464	6	6
10 % Mod	203	223	25	700	22	39
1 % Mod	288	275	27	962	51	66
0,1 % Mod	318	288	33	635	28	5
0 % Mod	389	413	26	748	1	253
Control G-CSF	1461	1634	1	59	481	814
mCherry	0	7	0	1	0	0
Sin tratamiento	N/A	N/A	1	0	0	0

Tabla 12. Donante 3

	G-CSF (pg/ml)		IFN-alfa (pg/ml)		TNF-alfa (pg/ml)	
	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas	6 horas	18 horas
100 % Mod	6086	7549	7	658	11	11
75 % Mod	2479	2378	23	752	4	35
50 % Mod	667	774	24	896	22	18
25 % Mod	480	541	57	1557	43	115
10 % Mod	838	956	159	2755	144	123
1 % Mod	1108	1197	235	3415	88	270
0,1 % Mod	1338	1177	191	2873	37	363
0 % Mod	1463	1666	215	3793	74	429
Control G-CSF	3272	3603	16	1557	731	9066
mCherry	0	0	2	645	0	0
Sin tratamiento	N/A	N/A	1	1	0	8

Ejemplo 67. Pantalla de modificaciones de mutación inversa de microames

5

Antecedentes y procedimientos

La pantalla de micro nombres es una versión del ensayo completo de preincubación de Ames. Detecta mutaciones de sustitución tanto de cambio de marco como de par de bases utilizando cuatro cepas de prueba de *Salmonella* (TA97a, TA98, TA100 y TA1535) y una cepa de *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* pKM101). Las cepas TA97a y TA98 detectan mutaciones de cambio de marco, y TA100, TA1535 y WP2 *uvrA* pKM101 detectan mutaciones de sustitución de par de bases. Esta prueba de Ames a escala reducida utiliza un compuesto mínimo, se lleva a cabo con y sin activación metabólica (fracción S9) y utiliza placas de múltiples pocillos. Esta prueba es un ensayo microbiano para detectar el potencial mutagénico de los compuestos de prueba.

15

El cribado de microAmes para el artículo de prueba de 5-metilcitosina, pseudouridina o N'-metilpseudouridina se probó por duplicado con las cepas TA97a, TA98, TA100, TA1535 y WP2 *uvrA* pKM101 en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica (fracción microsomal S9 de hígado de rata inducida por AROCLOR™ 1254) a 0,25, 2,5, 12,5, 25, 75 y 250 ug/pocillo. Se utilizaron compuestos de control positivo a 4 concentraciones diferentes para garantizar que el sistema de ensayo fuera sensible a compuestos mutagénicos conocidos. Se usó DMSO como el control de vehículo. Los controles positivos y del vehículo produjeron los resultados esperados, lo que demuestra que la pantalla de microAmes es lo suficientemente sensible como para detectar mutágenos.

20

Resultados

25

Para la 5-metilcitosina, no se observaron precipitados con ninguna cepa de prueba, ya sea con o sin activación

metabólica. No se observó citotoxicidad (reducción en el cespel de fondo y/o número de revertientes) en ninguna cepa con o sin activación metabólica. No hubo aumento en el número de colonias revertidas en comparación con el vehículo de control en ninguna cepa con o sin activación metabólica. Por lo tanto, la 5-metilcitolina no fue mutagénica hasta 250 ug/pocillo en las cepas TA97a, TA98, TA100, TA1535 y WP2 uvrA pKM101 con o sin activación metabólica bajo las condiciones de la pantalla de microAmes.

No se observaron precipitados con ninguna cepa de prueba con o sin activación metabólica para pseudouridina. Se observó citotoxicidad (reducción en el número de revertidos) con la cepa TA100 sin activación metabólica. No se observó citotoxicidad (reducción en el césped de fondo y/o número de revertientes) en ninguna otra cepa, ya sea con o sin activación metabólica. No hubo aumento en el número de colonias revertidas en comparación con el vehículo de control en ninguna cepa con o sin activación metabólica. Por lo tanto, la pseudouridina no fue mutagénica hasta 75 ug/pocillo en la cepa TA100 sin activación metabólica y hasta 250 µg/pocillo en las cepas TA97a, TA98, TA1535 y WP2 uvrA pKM101 con o sin activación metabólica y la cepa TA100 sin activación metabólica bajo las condiciones de este cribado de microAmes.

Para la modificación, no se observaron precipitados de N1-metilpseudouridina con ninguna cepa de prueba, ya sea con o sin activación metabólica. No se observó citotoxicidad (reducción en el cespel de fondo y/o número de revertientes) en ninguna cepa con o sin activación metabólica. No hubo aumento en el número de colonias revertidas en comparación con el vehículo de control en ninguna cepa con o sin activación metabólica. La N1-metilpseudouridina no fue mutagénica hasta 250 µg/pocillo en las cepas TA97a, TA98, TA100, TA1535 y WP2 uvrA pKM101 con o sin activación metabólica bajo las condiciones de este cribado de microAmes. La N1-metilpseudouridina se encontró menos mutagénica que la pseudouridina.

La comparación en esta prueba de microAMES de 5 metilcitolina, pseudouridina y N1-metilpseudouridina revela que generalmente son no mutagénicos. Sin embargo, cabe destacar la diferencia entre la pseudouridina y la N1-metilpseudouridina, donde la pseudouridina mostró una respuesta citotóxica en una cepa bacteriana donde la N1-metilpseudouridina no lo hizo. Estas pruebas de microAMES se utilizan de forma rutinaria como parte de la evaluación preclínica de la seguridad de los compuestos y destacan una diferencia importante entre la N1-metilpseudouridina y la pseudouridina.

Ejemplo 68. Toxicidad de los trifosfatos nucleósidos (NTP)

La citotoxicidad de los trifosfatos de nucleósidos naturales y modificados (NTP) solos o en combinación con otras bases, se analizó en células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) en ausencia de reactivo de transfección. Las células HEK293 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 30.000 células por pocillo con 0,75 ul de RNAiMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) por pocillo a un volumen total de pocillo de 100 ul. 10 ul de los NTP descritos en la Tabla 12 se combinaron con 10 ul de dilución de lípidos y se incubaron durante 30 minutos para formar un complejo antes de añadir 80 ul de la suspensión celular HEK293 al complejo NTP.

Se transfectaron NTP naturales y modificados a una concentración de 2,1 nM, 21 nM, 210 nM, 2,1 µM, 21 µM, 210 µM o 2,1 mM. Las NTP en combinación se transfectaron a una concentración total de NTP de 8,4 nM, 84 nM, 840 nM, 8,4 µM, 84 µM, 840 µM y 8,4 mM. Como un ARNm de G-CSF modificado con control (SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1; 5-metilcitosina y pseudouridina completamente modificadas) se transfectó en células HEK293 a una concentración de 8,4 nM. La citotoxicidad de los NTP y el ARNm de G-CSF modificado se ensayó 4, 24, 48 y 72 horas después de la adición a las células HEK293 usando un ensayo CYTO TOX-GLO™ de Promega (Madison, WI) siguiendo el protocolo del fabricante, excepto que se utilizó pipeteado para lisar las células en lugar de agitar las placas.

Las Tablas 13 y 14 muestran el porcentaje de células viables para cada una de las NTP, combinaciones de NTP y controles analizados. No se observó toxicidad con los NTP individuales en comparación con las células no tratadas. Estos datos demuestran que la introducción de NTP individuales, que incluyen 5-metilcitolina, pseudouridina y N1-metilpseudouridina, en células de mamífero no es tóxica a dosis 1.000.000 veces una dosis eficaz cuando se introduce como un ARNm modificado.

Tabla 13. Citotoxicidad de NTP individuales

Citotoxicidad de NTP individual								
	Tiempo	Dosis						
		2,1 mM	210 µM	21 µM	2,1 µM	210 nM	21 nM	2,1 nM
Adenina	4 h	90,03	85,97	91,20	90,23	90,36	93,21	93,48
	24 h	88,42	87,31	86,86	86,81	86,94	87,19	86,44
	48 h	93,71	90,55	89,94	89,80	89,17	91,13	92,12
	72 h	97,49	94,81	93,83	94,58	92,22	93,88	95,74

Citotoxicidad de NTP individual								
	Tiempo	Dosis						
		2,1 mM	210 uM	21 uM	2,1 uM	210 nM	21 nM	2,1 nM
Citosina	4 h	90,51	89,88	91,41	90,49	88,95	93,11	93,34
	24 h	86,92	86,33	85,72	86,70	86,12	86,16	85,78
	48 h	94,23	87,81	87,28	87,73	85,36	88,95	88,99
	72 h	97,15	92,34	92,22	88,93	88,22	91,80	94,22
Guanina	4 h	90,96	90,14	91,36	90,60	90,00	92,84	93,33
	24 h	86,37	85,86	85,93	86,13	86,35	85,50	85,41
	48 h	93,83	87,05	88,18	87,89	85,31	87,92	89,57
	72 h	97,04	91,41	92,39	92,30	92,19	92,55	93,72
Uracilo	4 h	90,97	89,60	91,95	90,90	91,05	92,90	93,15
	24 h	87,68	86,48	85,89	86,75	86,52	87,23	87,63
	48 h	94,39	88,98	89,11	89,44	88,33	88,89	91,28
	72 h	96,82	93,45	93,63	94,60	94,50	94,53	95,51
Pseudouridina	4 h	92,09	92,37	91,35	92,02	92,84	91,96	92,26
	24 h	88,38	86,68	86,05	86,75	85,91	87,59	87,31
	48 h	88,62	87,79	87,73	87,66	87,82	89,03	91,99
	72 h	96,87	89,82	94,23	93,54	92,37	94,26	94,25
5-metil citosina	4 h	92,01	91,54	91,16	91,31	92,31	91,40	92,23
	24 h	87,97	85,76	84,72	85,14	84,71	86,37	86,35
	48 h	87,29	85,94	85,74	86,18	86,44	87,10	88,18
	72 h	96,08	88,10	92,26	90,92	89,97	92,10	91,93
N1-metil pseudouridina	4 h	92,45	91,43	91,48	90,41	92,15	91,44	91,89
	24 h	88,92	86,48	85,17	85,72	85,89	86,85	87,79
	48 h	89,84	86,02	87,52	85,85	87,38	86,72	87,81
	72 h	96,80	93,03	93,83	92,25	92,40	92,84	92,98
Sin tratamiento	4 h	92,77	--	--	--	--	--	--
	24 h	87,52	--	--	--	--	--	--
	48 h	92,95	--	--	--	--	--	--
	72 h	96,97	--	--	--	--	--	--

Tabla 14. Citotoxicidad de NTPs en Combinación

Citotoxicidad combinada NTP								
	Tiempo	Dosis						
		8,4 mM	840 uM	84 uM	8,4 uM	840 nM	84 nM	8,4 nM
Pseudouridina/ 5-metilcitosina / Adenina/ Guanina	4 h	92,27	92,04	91,47	90,86	90,87	91,10	91,50
	24 h	88,51	86,90	86,43	88,15	88,46	86,28	87,51
	48 h	88,30	87,36	88,58	88,13	87,39	88,72	90,55
	72 h	96,53	94,42	94,31	94,53	94,38	94,36	93,65
N1-metil pseudouridina/ 5-metilcitosina /	4 h	92,31	91,71	91,36	91,15	91,30	90,86	91,38

Citotoxicidad combinada NTP								
	Tiempo	Dosis						
		8,4 mM	840 uM	84 uM	8,4 uM	840 nM	84 nM	8,4 nM
adenina/ guanina	24 h	88,19	87,07	86,46	87,70	88,13	85,30	87,21
	48 h	87,17	86,53	87,51	85,85	84,69	87,73	86,79
	72 h	96,40	94,88	94,40	93,65	94,82	92,72	93,10
ARNm modificado con G-CSF	4 h	na	na	na	na	na	na	92,63
	24 h	na	na	na	na	na	na	87,53
	48 h	na	na	na	na	na	na	91,70
	72 h	na	na	na	na	na	na	96,36

Ejemplo 69. Estudio de respuesta inmune innata en fibroblastos BJ

- 5 Los fibroblastos de prepucio primarios humanos (fibroblastos BJ) se obtuvieron de American Type Culture Collection (recogida de cultivo tipo americano) (ATCC) (n.º de catálogo CRL-2522) y se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (ATCC, n.º de catálogo 30-2003) complementado con suero bovino fetal al 10 % a 37 °C, bajo CO₂ al 5 %. Los fibroblastos BJ se sembraron en una placa de 24 pocillos a una densidad de 300.000 células por pocillo en 0,5 ml de medio de cultivo. 250 ng de ARNm de G-CSF modificado (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; Tapa 5', Tapa 1) completamente
- 10 modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina (Gen1) o completamente modificada con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (Gen2) que tiene Tapa 0, Tapa 1 o no se transfectó ninguna tapa usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, catálogo # 11668-019), siguiendo el protocolo del fabricante. Muestras de control de poli I:C (PIC), Lipofectamine 2000 (Lipo), ARNm de luciferasa natural (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 3; cola poliA
- 15 de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en secuencia; tapa 5', Tapa 1) y ARNm de G-CSF natural también se transfectaron. Las células se recolectaron después de 18 horas, el ARN total se aisló y se trató con DNASE® usando el micro kit RNeasy (catálogo #74004) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron 100 ng de ARN total para la síntesis de ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (n.º de catálogo 4368814) siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, se analizó el ADNc para la expresión de genes de respuesta
- 20 inmunitaria innata mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando SybrGreen en un instrumento Biorad CFX 384 siguiendo el protocolo del fabricante. La Tabla 15 muestra el nivel de expresión de los transcritos de respuesta inmunitaria innata en relación con el gen de mantenimiento HPRT (hipoxantina fosforribosiltransferasa) y se expresa como inducción de veces en relación con HPRT. En la tabla, el panel de métricas estándar incluye: RIG-I es un gen 1 inducible por ácido retinoico, IL6 es interleucina-6, OAS-1 es oligoadenilato sintetasa 1, IFNβ es interferón beta, AIM2
- 25 está ausente en melanoma-2, IFIT-1 es proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopeptido 1, PKR es proteína cinasa R, TNFα es factor de necrosis tumoral alfa e IFNα es interferón alfa.

Tabla 15. Niveles de transcripción de respuesta inmunitaria innata

Formulación	RIG-I	IL6	OAS-1	IFNβ	AIM2	IFIT-1	PKR	TNFα	IFNα
Luciferasa natural	71,5	20,6	20,778	11,404	0,251	151,218	16,001	0,526	0,067
G-CSF natural	73,3	47,1	19,359	13,615	0,264	142,011	11,667	1,185	0,153
PIC	30,0	2,8	8,628	1,523	0,100	71,914	10,326	0,264	0,063
G-CSF Gen1-UC	0,81	0,22	0,080	0,009	0,008	2,220	1,592	0,090	0,027
G-CSF Gen1-Tapa0	0,54	0,26	0,042	0,005	0,008	1,314	1,568	0,088	0,038
G-CSF Gen1-Tapa1	0,58	0,30	0,035	0,007	0,006	1,510	1,371	0,090	0,040
G-CSF Gen2-UC	0,21	0,20	0,002	0,007	0,007	0,603	0,969	0,129	0,005
G-CSF Gen2-Tapa0	0,23	0,21	0,002	0,0014	0,007	0,648	1,547	0,121	0,035
G-CSF Gen2-Tapa1	0,27	0,26	0,011	0,004	0,005	0,678	1,557	0,099	0,037
Lipo	0,27	0,53	0,001	0	0,007	0,954	1,536	0,158	0,064

Ejemplo 70. Detección *in vivo* de respuesta inmune innata

En un esfuerzo por distinguir la importancia de diferentes modificaciones químicas de ARNm *in vivo* y la respuesta de citocinas *in vivo*, los ratones BALB/C hembra (n=5) se inyectan por vía intramuscular con ARNm de G-CSF (ARNm de GCSF no modificado) (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia;) con una tapa 5' de Tapa 1, ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (ARNm de GCSF 5mc/pU), ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina con (ARNm de GCSF 5mc/N1pU) o sin una tapa 5' (ARNm de GCSF 5mc/N1 pU sin tapa) o un control de R848 o sacarosa al 5 % como se describe en la Tabla 16.

10 **Tabla 16. Gráfico de dosificación**

Formulación	Vía	Dosis (ug/ratón)	Dosis (ul)
ARNm de GCSF no modificado	I.M.	200	50
ARNm de GCSF 5mc/pU	I.M.	200	50
ARNm de GCSF 5mc/N1pU	I.M.	200	50
ARNm de GCSF 5mc/N1pU sin tapa	I.M.	200	50
R848	I.M.	75	50
5 % de sacarosa	I.M.	-	50
Sin tratamiento	I.M.	-	-

La sangre se extrae a las 8 horas después de la dosificación. Usando ELISA, los niveles de proteína de G-CSF, TNF-alfa e IFN-alfa se determinan mediante ELISA. 8 horas después de la dosificación, se recolecta el músculo del sitio de inyección y se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (QPCR) para determinar los niveles de ARNm de RIG-I, PKR, AIM-2, IFIT-1, OAS-2, MDA-5, IFN-beta, TNF-alfa, IL-6, G-CSF, CD45 en el músculo.

Ejemplo 71. Detección *in vivo* del estudio de respuesta inmune innata

A los ratones BALB/C hembra (n=5) se les inyectó por vía intramuscular ARNm de G-CSF (ARNm GCSF no modificado) (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia;) con una tapa 5' de Tapa 1, ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina (ARNm de GCSF 5mc/pU), ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina con (ARNm de GCSF 5mc/N1pU) o sin una tapa 5' (ARNm de GCSF 5mc/N1 pU sin tapa) o un control de R848 o sacarosa al 5 % como se describe en la Tabla 17. La sangre se extrae a las 8 horas después de la dosificación y utilizando ELISA, los niveles de proteína de G-CSF e interferón-alfa (IFN-alfa) se determinan mediante ELISA y se muestran en la Tabla 17.

Como se muestra en la Tabla 17, el ARNm de G-CSF modificado 5mc/N1pU y no modificado 5mc/pU dio como resultado la expresión de G-CSF humano en suero de ratón. El ARNm de G-CSF modificado con 5mc/N1pU no recubierto mostró expresión de G-CSF no humano en suero, lo que destaca la importancia de tener una estructura de tapa 5' para la traducción de proteínas.

Como se esperaba, no se expresó ninguna proteína G-CSF humana en los grupos R848, de 5 % solo de sacarosa y no tratados. Es importante destacar que se observaron diferencias significativas en la producción de citocinas según lo medido por IFN-alfa de ratón en el suero. Como se esperaba, el ARNm de G-CSF no modificado demostró una respuesta de citocina robusta *in vivo* (mayor que el control positivo de R848). El ARNm de G-CSF modificado con 5mc/pU mostró una respuesta de citocinas baja pero detectable *in vivo*, mientras que el ARNm modificado con 5mc/N1pU no mostró IFN-alfa detectable en el suero (y lo mismo como vehículo o animales no tratados).

Además, la respuesta del ARNm modificado de 5mc/N1pU fue la misma independientemente de si se recubrió o no. Estos resultados *in vivo* refuerzan la conclusión de que 1) el ARNm no modificado produce una respuesta inmunitaria innata sólida, 2) que esto se reduce, pero no se suprime, a través de la incorporación del 100 % de modificación de 5mc/pU, y 3) que la incorporación de modificaciones de 5mc/N1pU da como resultado una respuesta de citocinas no detectable.

Por último, dado que estas inyecciones están en sacarosa al 5 % (que no tiene ningún efecto por sí misma), estos resultados deben reflejar con precisión el potencial inmunoestimulante de estas modificaciones.

A partir de los datos, es evidente que las moléculas modificadas con N1pU producen más proteína mientras que simultáneamente tienen poco o ningún efecto en la expresión de IFN-alfa. También es evidente que se requiere el recubrimiento para la producción de proteínas para esta modificación química. La proteína: La relación de citocinas de 748 en comparación con la relación de PC para el ARNm no modificado (PC=9) significa que esta modificación química es muy superior en relación con los efectos o implicaciones biológicas asociadas con IFN-alfa.

Tabla 17. G-CSF humano e IFN-alfa de ratón en suero

Formulación	Vía	Dosis (ug/ratón)	Dosis (ul)	Proteína G-CSF (pg/ml)	Expresión de IFN-alfa (pg/ml)	Relación PC
ARNm de GCSF no modificado	I.M.	200	50	605,6	67,01	9
ARNm de GCSF 5mc/pU	I.M.	200	50	356,5	8,87	40
ARNm de GCSF 5mc/N1pU	I.M.	200	50	748,1	0	748
ARNm de GCSF 5mc/N1pU sin tapa	I.M.	200	50	6,5	0	6,5
R848	I.M.	75	50	3,4	40,97	.08
5 % de sacarosa	I.M.	-	50	0	1,49	0
Sin tratamiento	I.M.	-	-	0	0	0

Ejemplo 72: Administración *in vivo* con Lipoplexes

5

A. ARN modificado de G-CSF humano

Una formulación que contiene 100 µg de una de dos versiones de ARNm de G-CSF humano modificado (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; Tapa 5', Tapa 1) (G-CSF completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina (G-CSF) o G-CSF completamente modificada con 5-metilcitosina y N1-metil-pseudouridina (G-CSF-N1) lipoplexada con 30 % en volumen de RNAIMAX™ y administrada en 150 uL por vía intramuscular (I.M.) y en 225uL por vía intravenosa (I.V.) a ratones C57/BL6.

A tres grupos de control se les administraron 100 µg de ARNm de luciferasa modificada (secuencia de ADNc IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 2; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia, tapa 5', Tapa 1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) por vía intramuscular (Luc-unsp I.M.) o 150 µg de ARNm de luciferasa modificado por vía intravenosa (Luc-unsp I.V.) o 150 uL del tampón de formulación por vía intramuscular (Buffer I.M.). 6 horas después de la administración de una formulación, se recolectó suero para medir la cantidad de proteína G-CSF humana en el suero de ratón mediante ELISA de G-CSF humano y los resultados se muestran en la Tabla 18.

Estos resultados demuestran que tanto el ARNm de 5-metilcitosina/pseudouridina como el ARNm de G-CSF humano modificado con 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina pueden dar como resultado una expresión de proteína G-CSF humana específica en suero cuando se administra mediante vía I.V. o I.M. de administración en una formulación de lipoplex.

Tabla 18. G-CSF humano en suero (Vía de inyección I.M. e I.V.)

Formulación	Vía	G-CSF (pg/ml)
G-CSF	I.M.	85,6
G-CSF-N1	I.M.	40,1
G-CSF	I.V.	31,0
G-CSF-N1	I.V.	6,1
Luc-unsp	I.M.	0,0
Luc-unsp	I.V.	0,0
Tampón	I.M.	0,0

30

B. Comparación de ARN modificado de G-CSF humano

Se administró una formulación que contenía 100 µg de ARNm de G-CSF humano modificado lipoplexado con 30 % en volumen de RNAIMAX™ con una modificación de 5-metilcitosina (5mc) y una modificación de pseudouridina (ψ) (G-CSF-Gen1-Lipoplex), ARNm de G-CSF humano modificado con una modificación de 5mc y ψ en solución salina (G-CSF-Gen1-Salina), ARNm de G-CSF humano modificado con una modificación de N1-5-metilcitosina (N1-5mc) y una

35

modificación ψ lipoplexada con 30 % en volumen de RNAIMAX™ (G-CSF-Gen2-Lipoplex), ARNm de G-CSF humano modificado con una modificación de N1-5mc y ψ en solución salina (G-CSF-Gen2-Salina), luciferasa modificada con una modificación de 5mc y ψ lipoplexada con un 30 % en volumen de RNAIMAX™ (Luc-Lipoplex), o ARNm de luciferasa modificada completamente con modificaciones 5 mc y ψ de salina (Luc-Salina) por vía intramuscular (I.M.) o subcutánea (S.C.) y un grupo de control para cada procedimiento de administración se le proporcionó una dosis de 80 uL del tampón de formulación (F. Buffer) a ratones C57/BL6. 13 horas después de la inyección, se recolectaron suero y tejido del sitio de inyección de cada ratón y se analizaron mediante ELISA G-CSF para comparar los niveles de proteína G-CSF humana. Los resultados de la proteína G-CSF humana en suero de ratón de la administración intramuscular y los resultados de la administración subcutánea se muestran en la Tabla 19.

Estos resultados demuestran que el ARNm de G-CSF humano modificado con 5-metilcitosina/pseudouridina y 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina puede dar como resultado la expresión de proteína G-CSF humana específica en suero cuando se administra a través de una vía de administración de I.M. o S.C. ya sea en una formulación salina o en una formulación de lipoplex. Como se muestra en la Tabla 19, el ARNm de G-CSF humano modificado con 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina generalmente demuestra una mayor producción de proteína G-CSF humana con respecto al ARNm de G-CSF humano modificado con 5-metilcitosina/pseudouridina.

Tabla 19. Proteína G-CSF humana en suero de ratón

Formulación	G-CSF (pg/ml)	
	I.M. Vía de inyección	S.C. Vía de inyección
G-CSF-Gen1-Lipoplex	13,988	42,855
GCSF -Gen1-salina	9,375	4,614
GCSF-Gen2-lipoplex	75,572	32,107
GCSF-Gen2-salina	20,190	45,024
Luc lipoplex	0	3,754
Solución salina Luc	0,0748	0
Tampón de formulación (F. Buffer)	4,977	2,156

Ejemplo 73. Administración de sitios múltiples: Intramuscular y subcutáneo

ARNm modificado con G-CSF humano (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) modificada como Gen1 o Gen2 (5-metilcitosina (5mc) y una modificación de pseudouridina (ψ), G-CSF-Gen1; o N1-5-metilcitosina (N1-5mc) y una modificación de ψ , G-CSF-Gen2) y formulada en solución salina se administraron a ratones mediante inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC). Se realizó la inyección de cuatro dosis o 2x 50ug (dos sitios) diariamente durante tres días (intervalo de 24 horas). La cuarta dosis se administró 6 horas antes de la extracción de sangre y el análisis de CBC. Los controles incluyeron Luciferasa (secuencia de ADNc para IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 2; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3, cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia, tapa 5', Tapa 1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) o el tampón de formulación (F.Buffer). Los ratones se desangraron a las 72 horas después de la primera inyección de ARNm (6 horas después de la última dosis de ARNm) para determinar el efecto del G-CSF humano codificado por ARNm en el recuento de neutrófilos. El régimen de dosificación se muestra en la Tabla 20, al igual que los recuentos de neutrófilos resultantes (miles/uL). En la Tabla 20, los asteriscos (*) indican significación estadística a $p < 0,05$.

Para la administración intramuscular, los datos revelan un aumento de cuatro veces en el recuento de neutrófilos por encima del control en el día 3 para el ARNm de Gen1 G-CSF y un aumento de dos veces para el ARNm de Gen2 G-CSF. Para la administración subcutánea, los datos revelan un aumento de dos veces en el recuento de neutrófilos por encima del control en el día 3 para el ARNm Gen2 G-CSF.

Estos datos demuestran que tanto el ARNm modificado con 5-metilcitosina/pseudouridina como el ARNm modificado con 5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina pueden ser biológicamente activos, como lo demuestran los aumentos específicos en los recuentos de neutrófilos en sangre.

Tabla 20. Régimen de dosificación

Gr.	Tratamiento	Vía	N =	Dosis (µg/ratón)	Vol. de dosis (µl/ratón)	Vehículo de dosificación	de	Neutrófilos mil/uL
1	G-CSF (Gen1)	I.M.	5	2×50ug (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		840*
2	G-CSF (Gen1)	S.C.	5	2×50ug (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		430
3	G-CSF (Gen2)	I.M.	5	2×50ug (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		746*
4	G-CSF (Gen2)	S.C.	5	2×50ug (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		683
5	Luc (Gen1)	I.M.	5	2×50ug (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		201
6	Luc (Gen1)	S.C.	5	2×50ug (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		307
7	Luc (Gen2)	I.M.	5	2×50ug (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		336
8	Luc (Gen2)	S.C.	5	2×50ug (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		357
9	Tampón de formulación (F. Buffer)	I.M.	4	0 (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		245
10	Tampón de formulación (F. Buffer)	S.C.	4	0 (cuatro dosis)	50	Tampón de formulación (F. buffer)		509
11	Sin tratamiento	-	4			-		312

Ejemplo 74. Administración intravenosa

ARNm modificado con G-CSF humano (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola de poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en la secuencia; tapa 5', Tapa 1) modificada con 5-metilcitosina (5mc) y una modificación de pseudouridina (ψ) (Gen1); o que no tiene modificaciones y se formuló en lipoplex al 10 % (RNAIMAX™) se administraron a ratones a una dosis de ARN de 50 ug y en un volumen de 100 ul mediante inyección intravenosa (IV) en los días 0, 2 y 4. Los neutrófilos se midieron en los días 1, 5 y 8. Los controles incluyeron ARN de mamífero no específico o el tampón de formulación solo (F.Buffer). Los ratones se desangraron en los días 1, 5 y 8 para determinar el efecto del G-CSF humano codificado por ARNm para aumentar el recuento de neutrófilos. El régimen de dosificación se muestra en la Tabla 21 como son los recuentos de neutrófilos resultantes (miles/uL; K/uL).

Para la administración intravenosa, los datos revelan un aumento de cuatro a cinco veces en el recuento de neutrófilos por encima del control en el día 5 con ARNm modificado con G-CSF pero no con ARNm de G-CSF no modificado o controles no específicos. El hemograma volvió al valor inicial cuatro días después de la inyección final. No se observaron otros cambios en las poblaciones de leucocitos.

En la Tabla 21, un asterisco (*) indica significación estadística a $p < 0,001$ en comparación con el tampón.

Estos datos demuestran que el ARNm modificado con 5-metilcitosina/pseudouridina formulado con lipoplex puede ser biológicamente activo, cuando se administra a través de una vía de administración intravenosa, como lo demuestran los aumentos específicos en los recuentos de neutrófilos en sangre. Ningún otro subconjunto de células se alteró significativamente. El ARNm de G-CSF no modificado administrado de forma similar no mostró ningún efecto farmacológico en el recuento de neutrófilos.

Tabla 21. Régimen de dosificación

Gr.	Tratamiento	N	Vol. de dosis (µl/ratón)	Vehículo de dosificación	de	Neutrófilos K/uL
1	G-CSF (Gen1) Día 1	5	100	10 % lipoplex		2,91
2	G-CSF (Gen1) Día 5	5	100	10 % lipoplex		5,32*
3	G-CSF (Gen1) Día 8	5	100	10 % lipoplex		2,06
4	G-CSF (sin modificación) Día 1	5	100	10 % lipoplex		1,88

Gr.	Tratamiento	N	Vol. de dosis (µl/ratón)	Vehículo de dosificación	de	Neutrófilos K/uL
5	G-CSF (sin modificación) Día 5	5	100	10 % lipoplex		1,95
6	G-CSF (sin modificación) Día 8	5	100	10 % lipoplex		2,09
7	Control de ARN Día 1	5	100	10 % lipoplex		2,90
8	Control de ARN Día 5	5	100	10 % lipoplex		1,68
9	Control de ARN Día 8	4	100	10 % lipoplex		1,72
10	Tampón de formulación (F. Buffer) Día 1	4	100	10 % lipoplex		2,51
11	Tampón de formulación (F. Buffer) Día 5	4	100	10 % lipoplex		1,31
12	Tampón de formulación (F. Buffer) Día 8	4	100	10 % lipoplex		1,92

Ejemplo 75: Vías de Administración

- 5 Se realizaron estudios para investigar la dosificación dividida utilizando diferentes vías de administración. Los estudios que utilizan múltiples sitios de inyección subcutánea o intramuscular en un punto de tiempo se diseñaron y realizaron para investigar formas de aumentar la exposición al fármaco de ARNm modificado y mejorar la producción de proteínas. Además de la detección del producto proteico expresado, también se determinó una evaluación de la función fisiológica de las proteínas mediante el análisis de muestras del animal analizado.
- 10 Sorprendentemente, se ha determinado que la dosificación dividida de ARNm modificado produce una mayor producción de proteínas y respuestas fenotípicas que las producidas por dosificación unitaria única o esquemas de dosis múltiples.
- 15 El diseño de un experimento de dosis dividida implicó el uso de ARNm modificado con eritropoyetina humana (EPO) (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 5; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en la secuencia; tapa 5', Tapa 1) o ARNm modificado con luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en secuencia; tapa 5', Tapa 1) administrada en tampón sola o formulada con 30 % de lipoplex (RNAIMAX™). El vehículo de dosificación (tampón) consistió en 150 mM de NaCl, 2 mM de CaCl₂, 2 mM de Na⁺-fosfato (1,4 mM de fosfato de sodio monobásico; 0,6 mM de fosfato de sodio dibásico) y 0,5 mM de EDTA, pH 6.5. El pH se ajustó usando hidróxido de sodio y la solución final se esterilizó con filtro. El ARNm se modificó con 5metilC (5meC) en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina.
- 20 Se dosificaron 4 ratones por grupo por vía intramuscular (I.M.), intravenosa (I.V.) o subcutánea (S.C.) mediante el gráfico de dosificación descrito en la Tabla 22. El suero se recogió 13 horas después de la inyección de todos los ratones, el tejido se recogió del sitio de inyección del grupo intramuscular y subcutáneo y el bazo, el hígado y los riñones se recogieron del grupo intravenoso. Los resultados del grupo intramuscular y del grupo subcutáneo se presentan en la Tabla 23.

30 **Tabla 22. Gráfico de dosificación**

Grupo	Tratamiento	Vía	Dosis de ARNm modificado	Dosis Total	Vehículo de dosificación	de
1	ARNm modificado de EPO humano de lipoplex	I.M.	4 × 100 ug + 30 % Lipoplex	4×70 ul	Lipoplex	
2	ARNm modificado de EPO humano de lipoplex	I.M.	4 × 100 ug	4×70 ul	Tampón	
3	ARNm modificado de EPO humano de lipoplex	S.C.	4 × 100 ug + 30 % Lipoplex	4×70 ul	Lipoplex	
4	ARNm modificado de EPO humano de lipoplex	S.C.	4 × 100 ug	4×70 ul	Tampón	
5	ARNm modificado de EPO humano de lipoplex	I.V.	200 ug + 30 % Lipoplex	140 ul	Lipoplex	
6	ARNm modificado con luciferasa-	I.M.	100 ug + 30 % Lipoplex	4×70 ul	Lipoplex	

Grupo	Tratamiento	Vía	Dosis de ARNm modificado	Dosis Total	Vehículo de dosificación
	lipoplexada				
7	ARNm modificado con luciferasa-lipoplexada	I.M.	100 ug	4x70 ul	Tampón
8	ARNm modificado con luciferasa-lipoplexada	S.C.	100 ug + 30 % Lipoplex	4x70 ul	Lipoplex
9	ARNm modificado con luciferasa-lipoplexada	S.C.	100 ug	4x70 ul	Tampón
10	ARNm modificado con EPO humano lipoplexado	I.V.	200 ug + 30 % Lipoplex	140 ul	Lipoplex
11	Tampón de Formulación	I.M.	multidosis 4x	4x70 ul	Tampón

Tabla 23. Proteína EPO humana en suero de ratón (vía de inyección I.M.)

Formulación	EPO (pg/ml)	
	I.M. Vía de inyección	S.C. Vía de inyección
Epo-Lipoplex	67,1	2,2
Luc-Lipoplex	0	0
Epo-Salina	100,9	11,4
Luc-Salina	0	0
Tampón de Formulación	0	0

Ejemplo 76: Administración *in vivo* utilizando relaciones de lípidos variables

5 Se administró ARNm modificado a ratones C57/BL6 para evaluar las relaciones lipídicas variables y la expresión de proteína resultante. Formulaciones de ARNm de EPO humano modificado de 100 µg (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 5; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en la secuencia; tapa 5', Tapa 1; completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) lipoplexada con 10 %, 30 % o 50 % de RNAiMAX™, ARNm de luciferasa modificado de 1 00 µg (secuencia de ADNc IVT que se muestra en la SEQ ID NO: 2; secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3, la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia, tapa 5', Tapa 1, completamente modificada con 5-metilcitosina en cada reemplazo de citosina y pseudouridina en cada sitio de uridina) lipoplexada con 10 %, 30 % o 50 % de RNAiMAX™ o un tampón de formulación se administraron por vía intramuscular a ratones en una dosis única de 70 µl. Se recogió el suero 13 horas después de la inyección para someterse a un ELISA de EPO humano para determinar el nivel de proteína EPO humana en cada ratón. Los resultados del ELISA de EPO humano, mostrados en la Tabla 24, muestran que la EPO humana modificada expresada en el músculo se segrega en el suero para cada uno de los diferentes porcentajes de RNAiMAX™.

Tabla 24. Proteína EPO humana en suero de ratón (vía inyectable IM)

Formulación	EPO (pg/ml)
Epo + 10 % RNAiMAX	11,4
Luc + 10 % RNAiMAX	0
Epo + 30% RNAiMAX	27,1
Luc + 30% RNAiMAX	0
Epo + 50% RNAiMAX	19,7
Luc + 50% RNAiMAX	0
Tampón de formulación (F. Buffer)	0

Ejemplo 77: Administración *in vivo* de ARN modificado en ratas

25 La producción de proteína de ARNm modificado se evaluó mediante la administración de ARNm de G-CSF modificado o ARNm de Factor IX modificado a ratas Sprague Dawley hembra (n=6). A las ratas se les inyectó 400 ug en 100 ul de ARNm de G-CSF (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160

nucleótidos no mostrados en la secuencia; tapa 5', Tapa 1) completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina (G-CSF Gen1), ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (G-CSF Gen2) o ARNm de Factor IX (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 6; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina (Factor IX Gen1) reconstituida a partir de la forma liofilizada en sacarosa al 5 %. La sangre se recogió 8 horas después de la inyección y el nivel de proteína G-CSF en suero se midió mediante ELISA. La Tabla 25 muestra los niveles de proteína G-CSF en suero después de 8 horas.

Estos resultados demuestran que tanto el ARNm modificado con G-CSF Gen 1 como el G-CSF Gen 2 pueden producir proteína G-CSF humana en una rata después de una única inyección intramuscular, y que la producción de proteína G-CSF humana mejora cuando se utiliza química Gen 2 sobre química Gen 1.

Tabla 25. Proteína G-CSF en suero de rata (vía de inyección I.M.)

Formulación	Proteína G-CSF (pg/ml)
G-CSF Gen1	19,37
G-CSF Gen2	64,72
Factor IX Gen 1	2,25

Ejemplo 78. Modificación química: Estudios *in vitro*

A. Detección *in vitro* en PBMC

500 ng de G-CSF (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; la cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) ARNm completamente modificado con la modificación química descrita en las Tablas 26 y 27 se transfectó con 0,4 uL de Lipofectamine 2000 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres donantes de sangre normales. Muestras de control de LPS, R848, P(I)P(C) y mCherry (secuencia de ARNm mostrada en SEQ ID NO: 4; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia, tapa 5', Tapa 1; completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina) también se analizaron. El sobrenadante se recolectó y se almacenó congelado hasta que se analizó mediante ELISA para determinar la expresión de la proteína G-CSF y la inducción de las citocinas interferón-alfa (IFN- α) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La expresión de proteína de G-CSF se muestra en la Tabla 26, la expresión de IFN- α y TNF- α se muestra en la Tabla 27.

Los datos en la Tabla 26 demuestran que muchas, pero no todas, las modificaciones químicas se pueden usar para producir productivamente G-CSF humano en PBMC. Cabe destacar que la sustitución de N1-metilpseudouridina al 100 % demuestra el nivel más alto de producción de G-CSF humano (casi 10 veces mayor que la propia pseudouridina). Cuando se usa N1-metilpseudouridina en combinación con 5-metilcitosina, también se produce un alto nivel de proteína G-CSF humana (esto también es mayor que cuando se usa pseudouridina en combinación con 5-metilcitosina).

Dada la relación inversa entre la producción de proteínas y la producción de citocinas en PBMC, también se observa una tendencia similar en la Tabla 27, donde la sustitución del 100 % con N1-metilpseudouridina no produce inducción de citocinas (similar a los controles de solo transfección) y la pseudouridina muestra inducción de citocinas detectable que está por encima de los antecedentes.

Otras modificaciones tales como la N6-metiladenosina y la α -tiocitidina parecen aumentar la estimulación de citocinas.

Tabla 26. Modificaciones químicas y expresión de proteína G-CSF

Modificaciones químicas	Expresión de proteína G-CSF (pg/ml)		
	Donante 1	Donante 2	Donante 3
Pseudouridina	2477	1.909	1.498
5-metiluridina	318	359	345
N1-metilpseudouridina	21.495	16.550	12.441
2-tiouridina	932	1.000	600
4-tiouridina	5	391	218
5-metoxiuridina	2.964	1.832	1.800
5-metilcitosina y pseudouridina (1 ^{er} conjunto)	2.632	1.955	1.373

Modificaciones químicas	Expresión de proteína G-CSF (pg/ml)		
	Donante 1	Donante 2	Donante 3
5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (1 ^{er} conjunto)	10.232	7.245	6.214
2'Fluoroguanosina	59	186	177
2'Fluorouridina	118	209	191
5-metilcitosina y pseudouridina (2 ^o conjunto)	1.682	1.382	1.036
5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (2 ^o conjunto)	9.564	8.509	7.141
5-bromouridina	314	482	291
5-(2-carbometoxivinil)uridina	77	286	177
5-[3(1-E-propenilamino)uridina	541	491	550
α-tiocitidina	105	264	245
5-metilcitosina y pseudouridina (3 ^{er} conjunto)	1.595	1.432	955
N1-metiladenosina	182	177	191
N6-metiladenosina	100	168	200
5-metilcitidina	291	277	359
N4-acetilcitidina	50	136	36
5-formilcitidina	18	205	23
5-metilcitosina y pseudouridina (4 ^o conjunto)	264	350	182
5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (4 ^o conjunto)	9.505	6.927	5.405
LPS	1.209	786	636
mCherry	5	168	164
R848	709	732	636
P(I)P(C)	5	186	182

Tabla 27. Modificaciones químicas y expresión de citocinas

	Modificaciones químicas		Expresión de IFN-α (pg/ml)	Expresión de TNF-α (pg/ml)		
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 1	Donante 2	
Pseudouridina	120	77	171	36	81	126
5-metiluridina	245	135	334	94	100	157
N1-metilpseudouridina	26	75	138	101	106	134
2-tiouridina	100	108	154	133	133	141
4-tiouridina	463	258	659	169	126	254
5-metoxiuridina	0	64	133	39	74	111
5-metilcitosina y pseudouridina (1 ^{er} conjunto)	88	94	148	64	89	121
5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (1 ^{er} conjunto)	0	60	136	54	79	126
2'Fluoroguanosina	107	97	194	91	94	141
2'Fluorouridina	158	103	178	164	121	156
5-metilcitosina y pseudouridina (2 ^o conjunto)	133	92	167	99	111	150

5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (2º conjunto)	0	66	140	54	97	149
5-bromouridina	95	86	181	87	106	157
5-(2-carbometoxivinil)uridina	0	61	130	40	81	116
5-[3(1-E-propenilamino)uridina	0	58	132	71	90	119
α-tiocitidina	1.138	565	695	300	273	277
5-metilcitosina y pseudouridina (3º conjunto)	88	75	150	84	89	130
N1-metiladenosina	322	255	377	256	157	294
N6-metiladenosina	1.935	1.065	1.492	1.080	630	857
5-metilcitidina	643	359	529	176	136	193
N4-acetilcitidina	789	593	431	263	67	207
5-formilcitidina	180	93	88	136	30	40
5-metilcitosina y pseudouridina (4º conjunto)	131	28	18	53	24	29
5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (4º conjunto)	0	0	0	36	14	13
LPS	0	67	146	7.004	3.974	4.020
mCherry	100	75	143	67	100	133
R848	674	619	562	11.179	8.546	9.907
P(I)P(C)	470	117	362	249	177	197

B. Detección *in vitro* en células HeLa

5 El día antes de la transfección, 20.000 células HeLa (ATCC no. CCL-2; Manassas, VA) se recolectaron mediante tratamiento con solución de tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) y se sembraron en un volumen total de 100 ul de medio EMEM (complementado con 10 % de FCS y 1x Glutamax) por pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Manassas, VA). Las células se cultivaron a 37 oC en atmósfera de CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, 83 ng de ARN modificado con luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) con la modificación química descrita en la Tabla 28, se diluyeron en 10 ul de volumen final de OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). Se utilizó Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) como reactivo de transfección y se diluyeron 0,2 ul en 10 ul de volumen final de OPTI-MEM. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, ambas soluciones se combinaron y se incubaron 15 minutos adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la solución combinada de 20 ul al medio de cultivo celular de 100 ul que contenía las células HeLa y se incubó a temperatura ambiente.

10 Después de 18 a 22 horas de incubación, las células que expresaban luciferasa se lisaron con 100 ul de tampón de lisis pasiva (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Las alícuotas de los lisados se transfirieron a placas de 96 pocillos de poliestireno opaco blanco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). Los volúmenes de lisado se ajustaron o diluyeron hasta que no se detectaron más de 2 millones de unidades de luz relativa (RLU) por pocillo para las muestras que producían la señal más fuerte y las RLU para cada química analizada se muestran en la Tabla 28. El lector de placas fue un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de aproximadamente 200 unidades de luz relativa por pocillo.

25 Estos resultados demuestran que muchas, pero no todas, las modificaciones químicas se pueden usar para producir productivamente G-CSF humano en células HeLa. Cabe destacar que la sustitución de N1-metilpseudouridina al 100 % demuestra el nivel más alto de producción de G-CSF humano.

30

Tabla 28. Unidades de Luz Relativas de Luciferasa

Modificación química	RLU
N6-metiladenosina (m6a)	534
5-metilcitidina (m5c)	138.428
N4-acetilcitidina (ac4c)	235.412
5-formilcitidina (f5c)	436
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A 1	48.659
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A1	190.924
Pseudouridina	655.632
1-metilpseudouridina (mlu)	1.517.998
2-tiouridina (s2u)	3387
5-metoxiuridina (mo5u)	253.719
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba B1	317.744
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba B 1	265.871
5-Bromo-uridina	43.276
5 (2 carbovinil) uridina	531
5 (3-1E propenil amino) uridina	446
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A2	295.824
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A2	233.921
5-metiluridina	50.932
α -tio-citidina	26.358
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba B2	481.477
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba B2	271.989
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A3	438.831
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A3	277.499
Luciferasa no modificada	234.802

C. Detección *in vitro* en lisados de reticulocitos de conejo

5 ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) se modificó con la modificación química enumerada en la Tabla 29 y se diluyeron en agua libre de nucleasas estéril hasta una cantidad final de 250 ng en 10 μ l. La luciferasa diluida se añadió a 40 μ l de lisado de reticulocitos de conejo recién preparado y la reacción de traducción *in vitro* se realizó en un tubo de reacción de polipropileno estándar de 1,5 mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 30 °C

10 en un bloque de calentamiento seco. El ensayo de traducción se realizó con el kit de lisado de reticulocitos de conejo (tratado con nucleasa) (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. El amortiguador de reacción se complementó con una mezcla uno a uno de soluciones madre de aminoácidos proporcionadas desprovistas de leucina o metionina, lo que dio como resultado una mezcla de reacción que contenía cantidades suficientes de ambos aminoácidos para permitir una traducción *in vitro* eficaz.

15 Después de 60 minutos de incubación, la reacción se detuvo colocando los tubos de reacción en hielo. Se transfirieron alícuotas de la reacción de traducción *in vitro* que contenía ARN modificado con luciferasa a placas de 96 pocillos de poliestireno opaco blanco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 μ l de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). Los volúmenes de las reacciones de traducción *in vitro* se ajustaron o diluyeron hasta que no se detectaron más de 2 millones de unidades de luz relativa (RLU) por pocillo para las muestras que producían la señal más fuerte y las RLU para cada química analizada se muestran en la Tabla 29. El lector de placas fue un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de aproximadamente 200 unidades de luz relativa por pocillo.

25 Estos resultados de traducción sin células se correlacionan muy bien con los resultados de producción de proteínas en HeLa, con las mismas modificaciones que generalmente funcionan o no funcionan en ambos sistemas. Una

excepción notable es el ARNm de luciferasa modificada con 5-formilcitosina que funcionó en el sistema de traducción libre de células, pero no en el sistema de transfección basado en células HeLa. También se observó una diferencia similar entre los dos ensayos con ARNm de G-CSF modificado con 5-formilcitosina.

5 **Tabla 29. Unidades de Luz Relativas de Luciferasa**

Modificación química	RLU
N6-metiladenosina (m6a)	398
5-metilcitosina (m5c)	152.989
N4-acetilcitosina (ac4c)	60.879
5-formilcitosina (f5c)	55.208
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A1	349.398
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A1	205.465
Pseudouridina	587.795
1-metilpseudouridina (mlu)	589.758
2-tiouridina (s2u)	708
5-metoxiuridina (mo5u)	288.647
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba B1	454.662
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba B1	223.732
5-Bromo-uridina	221.879
5 (2 carbovinil) uridina	225
5 (3-1E propenil amino) uridina	211
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A2	558.779
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A2	333.082
5-metiluridina	214.680
α -tio-citidina	123.878
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba B2	487.805
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba B2	154.096
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A3	413.535
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A3	292.954
Luciferasa no modificada	225.986

Ejemplo 79. Modificación química: Estudios *in vivo*

A. Detección *in vivo* de ARNm modificado con G-CSF

- 10 Los ratones Balb-C (n=4) se inyectan por vía intramuscular en cada pata con ARNm de G-CSF modificado (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1), completamente modificada con las modificaciones químicas descritas en la Tabla 30, se formula en 1xPBS. Un control de la secuencia de ARNm (ARNm) modificada por luciferasa que se muestra en la SEQ ID NO: 3;
- 15 cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1; completamente modificada con pseudouridina y 5-metilcitosina) y también se analizan un control de PBS. Después de 8 horas, se recolecta suero para determinar los niveles de citocina de niveles de proteína G-CSF mediante ELISA.

Tabla 30. G-CSF

ARNm	Modificaciones químicas
G-CSF	Pseudouridina
G-CSF	5-metiluridina
G-CSF	2-tiouridina

ARNm	Modificaciones químicas
G-CSF	4-tiouridina
G-CSF	5-metoxiuridina
G-CSF	2'-fluorouridina
G-CSF	5-bromouridina
G-CSF	5-[3(1-E-propenilamino)uridina]
G-CSF	alfa-tio-citidina
G-CSF	5-metilcitidina
G-CSF	N4-acetilcitidina
G-CSF	Pseudouridina y 5-metilcitosina
G-CSF	N1-metilpseudouridina y 5-metilcitosina
Luciferasa	Pseudouridina y 5-metilcitosina
PBS	Ninguno

B. Detección *in vivo* de ARNm modificado con luciferasa

5 Los ratones Balb-C (n=4) se inyectaron por vía subcutánea con 200 ul que contenían 42 a 103 ug de ARNm de luciferasa modificada (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1), completamente modificada con las modificaciones químicas descritas en la Tabla 31, se formuló en 1xPBS. También se probó un control de PBS. Las dosificaciones del ARNm de luciferasa modificado también se describen en la Tabla 31. 8 horas después de la dosificación, se tomaron imágenes de los ratones para determinar la expresión de luciferasa. Veinte minutos antes de la imagenología, se
10 inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. Los animales se anestesiaron entonces y las imágenes se adquirieron con un sistema de imagenología IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón.

15 Como se demuestra en la Tabla 31, todas las sustancias químicas modificadas con ARNm de luciferasa demostraron actividad *in vivo*, con la excepción de 2'-fluorouridina. Además, el ARNm modificado con 1-metilpseudouridina demostró una expresión muy alta de luciferasa (5 veces mayor expresión que el ARNm que contiene pseudouridina).

Tabla 31. Detección de luciferasa

ARNm	Modificaciones químicas	Dosis (ug) de ARNm	Volumen de dosis (ml)	Expresión de luciferasa (fotón/segundo)
Luciferasa	5-metilcitidina	83	0,72	1.94E+07
Luciferasa	N4-acetilcitidina	76	0,72	1.11E07
Luciferasa	Pseudouridina	95	1,20	1.36E+07
Luciferasa	1-metilpseudouridina	103	0,72	7.40E+07
Luciferasa	5-metoxiuridina	95	1,22	3,32+07
Luciferasa	5-metiluridina	94	0,86	7.42E+06
Luciferasa	5-bromouridina	89	1,49	3.75E+07
Luciferasa	2'-fluoroguanosina	42	0,72	5.88E+05
Luciferasa	2'-fluorocitidina	47	0,72	4.21E+05
Luciferasa	2'-fluorouridina	59	0,72	3.47E+05
PBS	Ninguno	-	0,72	3.16E+05

20 Ejemplo 80. Detección *in vivo* de ARNm modificado con luciferasa combinada

25 Los ratones Balb-C (n=4) se inyectaron por vía subcutánea con 200 ul de 100 ug de ARNm modificado de luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1), completamente modificada con las modificaciones químicas descritas en la Tabla 32, se formuló en 1x PBS. También se probó un control de PBS. Las dosificaciones del ARNm de luciferasa modificado

también se describen en la Tabla 29. 8 horas después de la dosificación, se tomaron imágenes de los ratones para determinar la expresión de luciferasa. Veinte minutos antes de la imagenología, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de D-luciferina a 150 mg/kg. Los animales se anestesiaron entonces y las imágenes se adquirieron con un sistema de imágenes IVIS Lumina II (Perkin Elmer). La bioluminiscencia se midió como flujo total (fotones/segundo) de todo el ratón.

Como se demuestra en la Tabla 32, todas las sustancias químicas modificadas con ARNm de luciferasa (en combinación) demostraron actividad *in vivo*. Además, la presencia de N1-metilpseudouridina en el ARNm modificado (con N4-acetilcitidina o 5 metilcitidina) demostró una mayor expresión que cuando se probaron las mismas combinaciones con pseudouridina. En conjunto, estos datos demuestran que el ARNm de N1-metilpseudouridina que contiene luciferasa produce una mejor expresión de proteínas *in vivo*, ya sea que se use solo (Tabla 31) o cuando se usa en combinación con otros nucleótidos modificados (Tabla 32).

Tabla 32. Combinaciones de detección de luciferasa

ARNm	Modificaciones químicas	Expresión de luciferasa (fotón/segundo)
Luciferasa	N4-acetilcitidina/pseudouridina	4.18E+06
Luciferasa	N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	2.88E+07
Luciferasa	5-metilcitidina/5-metoxiuridina	3.48E+07
Luciferasa	5-metilcitidina/5-metiluridina	1.44E+07
Luciferasa	5-metilcitidina/donde el 50 % de la uridina se reemplaza con 2-tiouridina	2.39E+06
Luciferasa	5-metilcitidina/pseudouridina	2.36E+07
Luciferasa	5-metilcitidina/N 1 -metil-pseudouridina	4.15E+07
PBS	Ninguno	3.59E+05

Ejemplo 81. Estabilidad de ARN modificado

A. Almacenamiento de ARN modificado

Se realizaron experimentos de estabilidad para obtener una mejor comprensión de las condiciones de almacenamiento para retener la integridad del ARN modificado. ARNm de G-CSF no modificado (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1), ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina y ARNm de G-CSF completamente modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina lipoplexada con 0,75 % en volumen de RNAiMAX™ se almacenó a 50 °C, 40 °C, 37 °C, 25 °C, 4 °C o -20 °C. Después de que el ARNm se había almacenado durante 0 horas, 2 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 5 días y 14 días, el ARNm se analizó mediante electroforesis en gel usando un sistema Bio-Rad EXPERION™. El ARNm de G-CSF modificado, no modificado y lipoplexado también se almacenó en RNASABLE® (Biomatrica, Inc. San Diego, CA) a 40 °C o agua a -80 °C o 40 °C durante 35 días antes de analizarse mediante electroforesis en gel.

Todas las muestras de ARNm sin estabilizador se mantuvieron estables después de 2 semanas después del almacenamiento a 4 °C o -20 °C. El ARNm de G-CSF modificado, con o sin lipoplex, fue más estable que el G-CSF no modificado cuando se almacenó a 25 °C (estable a 5 días frente a 48 horas), 37 °C (estable a 24 horas frente a 6 horas) y 50 °C (estable a 6 horas frente a 2 horas). ARNm de G-CSF no modificado, ARNm de G-CSF modificado con o sin 12 ciclos de congelación/descongelación tolerados de lipoplex.

Las muestras de ARNm almacenadas en el estabilizador a 40 °C mostraron una estabilidad similar a las muestras de ARNm almacenadas en agua a -80 °C después de 35 días, mientras que el ARNm almacenado en agua a 40 °C mostró una degradación intensa después de 18 días.

Ejemplo 82. Viabilidad celular en fibroblastos BJ

Los fibroblastos de prepucio primarios humanos (fibroblastos BJ) se obtuvieron de American Type Culture Collection (recogida de cultivo tipo americano) (ATCC) (cat#CRL-2522) y se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (ATCC, cat# 30-2003) complementado con suero bovino fetal al 10 % a 37 °C, bajo 5 % de CO₂. Los fibroblastos BJ se sembraron en una placa de 24 pocillos a una densidad de 130.000 células por pocillo en 0,5 ml de medio de cultivo. 250 ng de ARNm de G-CSF modificado (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina (Gen1) o completamente modificada con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (Gen2)

se transfectó usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat# 11668-019), siguiendo el protocolo del fabricante. También se transfectaron muestras de control de Lipofectamine 2000 (LF2000) y ARNm de G-CSF no modificado. Las muestras de ARNm modificado o de control se transfectaron diariamente durante 4 días. La viabilidad de las células después de la transfección se evaluó 6 horas y 24 horas después de la primera transfección (T1, 6 horas o T1, 24 horas), y 24 horas después de la segunda (T2, 24 horas) y cuarta transfección (T4, 24 horas).

Para determinar la viabilidad celular, el medio de cultivo se retiró completamente y las células se lavaron una vez con 600 ul de PBS estéril sin Ca²⁺/Mg²⁺ (Gibco/Life Technologies, Manassas, VA) para aclarar las células unidas de manera holgada. Se retiró PBS y se descartó. Los fibroblastos limpiados en cada pocillo se trataron con 220 ul de una solución madre de CELL TITER GLO® (Promega, n.º de catálogo G7570) (la solución madre de CELL TITER GLO® se diluyó adicionalmente 1:1 con una cantidad igual de PBS estéril). Se utilizó una punta de pipeta estéril para raspar las células de la placa y acelerar el proceso de lisis.

Durante dos intervalos de tiempo, T1, 24 horas y T2, 24 horas, se aplicó un protocolo alternativo. Las células se lavaron con PBS, tal como se describió anteriormente, y posteriormente se tripsinizaron con solución de tripsina/EDTA (Gibco/Life Technologies, Manassas, VA). Las células se separaron y se recolectaron en 500 ul de medio que contenía inhibidor de tripsina. Las células se recolectaron por centrifugación a 1200 ref durante 5 minutos. La pastilla celular se resuspendió en 500 ul de PBS. Esta suspensión celular se mantuvo en hielo, y 100 ul de esto se combinó con 100 ul de solución de Cell Titer Glo sin diluir.

Todos los lisados CELL TITER GLO® se incubaron a continuación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se transfirieron 20 ul de los lisados a una placa de 96 pocillos de poliestireno opaco blanco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución CELL TITER GLO® diluida. El lector de placas utilizado fue de BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT) y los valores absolutos se normalizaron para indicar que los fibroblastos BJ no tratados tenían una vitalidad celular del 100 %. El porcentaje de viabilidad para los fibroblastos BJ se muestra en la Tabla 33.

Es importante destacar que todos estos experimentos se llevan a cabo en ausencia de cualquier interferón u otros inhibidores de citocinas y, por lo tanto, representan una medida precisa de la citotoxicidad de los diferentes ARNm.

Estos resultados demuestran que la transfección repetida de fibroblastos BJ con ARNm no modificado da como resultado la pérdida de viabilidad celular que es aparente tan pronto como 24 horas después de la primera transfección (T1, 24 horas) y continúa siendo aparente y más pronunciada en puntos de tiempo posteriores.

También hay una pérdida de viabilidad con la transfección repetida de ARNm modificado con 5-metilcitosina y pseudouridina que es aparente 24 horas después de la cuarta transfección diaria (T4, 24 horas). No se observa pérdida de viabilidad celular en el transcurso de este experimento usando 5-metilcitosina y ARNm modificado con N1-metilpseudouridina. Estos resultados demuestran que la 5-metilcitosina y el ARNm que contiene N1-metilpseudouridina han mejorado la viabilidad celular cuando se analizan bajo transfección repetida. La capacidad de administrar repetidamente ARNm modificado es importante en la mayoría de las aplicaciones terapéuticas y, como tal, la capacidad de hacerlo sin citotoxicidad también es importante. Aunque no se desea limitarse a la teoría, se cree que los genes de respuesta después de una sola transfección pueden conducir a una disminución en la producción de proteínas, la inducción de citocinas y, finalmente, la pérdida de la viabilidad celular. Estos resultados son consistentes con el ARNm que contiene N1-metilpseudouridina que muestra un perfil mejorado en este sentido con respecto tanto al ARNm no modificado como al ARNm modificado con pseudouridina.

Tabla 33. Porcentaje de viabilidad

	T1, 6 horas	T1, 24 horas	T2, 24 horas	T4, 24 horas
Gen 1 G-CSF	81	108	91	65
Gen 2 G-CSF	99	102	128	87
G-CSF no modificado	101	72	74	42
LF2000	99	80	114	106
Sin tratamiento	100	100	100	100

Ejemplo 83. Respuesta inmune innata en fibroblastos BJ

Los fibroblastos de prepucio primarios humanos (fibroblastos BJ) se obtienen de American Type Culture Collection (recogida de cultivo tipo americano) (ATCC) (catálogo #CRL-2522) y se cultivan en medio esencial mínimo de Eagle (ATCC, cat# 30-2003) complementado con suero bovino fetal al 10 % a 37 °C, bajo 5 % de CO₂. Los fibroblastos BJ se sembraron en una placa de 24 pocillos a una densidad de 130.000 células por pocillo en 0,5 ml de medio de cultivo. 250 ng de ARNm de G-CSF modificado (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) completamente modificada con 5-metilcitosina y pseudouridina (Gen1) o completamente modificada con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina (Gen2)

se transfectó usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat# 11668-019), siguiendo el protocolo del fabricante. También se transfectan muestras de control de Lipofectamine 2000 y ARNm de G-CSF no modificado (G-CSF natural). Las células se transfectan durante cinco días consecutivos. Los complejos de transfección se retiran cuatro horas después de cada ronda de transfección.

5 El sobrenadante de cultivo se analiza para determinar GCSF secretada (R&D Systems, catálogo #DCS50), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) e interferón-alfa (IFN-alfa) por ELISA todos los días después de la transfección siguiendo los protocolos del fabricante. Las células se analizan para determinar su viabilidad utilizando el CELL TITER GLO® (Promega, catálogo #G7570) 6 horas y 18 horas después de la primera ronda de transfección y cada día alterno
10 después de eso. Al mismo tiempo, a partir de las células recolectadas, se aísla el ARN total y se trata con DNASE® utilizando el micro kit RNAEASY (catálogo #74004) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizan 100 ng de ARN total para la síntesis de ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, cat #4368814) siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, se analiza el ADNc para determinar la expresión de genes de respuesta inmunitaria innata mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando SybrGreen en un
15 instrumento Biorad CFX 384 siguiendo el protocolo del fabricante.

Ejemplo 84. Transcripción *in vitro* con polimerasa T7 de tipo salvaje

20 ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en la secuencia; tapa 5', Tapa 1) y ARNm de G-CSF (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) se modificaron completamente con diferentes combinaciones químicas y químicas enumeradas en las Tablas 34-37 usando polimerasa T7 de tipo salvaje como se describió anteriormente.

25 El rendimiento de las reacciones de traducción se determinó mediante medición espectrofométrica (OD260) y el rendimiento de Luciferasa se muestra en la Tabla 34 y G-CSF se muestra en la Tabla 36.

30 La luciferasa y el ARNm modificado con G-CSF también se sometieron a una reacción de recubrimiento enzimático y cada reacción de recubrimiento de ARNm modificado se evaluó para determinar el rendimiento mediante medición espectrofométrica (OD260) y se evaluó el tamaño correcto mediante el uso de bioanalizador. El rendimiento de la reacción de recubrimiento para luciferasa se muestra en la Tabla 35 y G-CSF se muestra en la Tabla 37.

Tabla 34. Química de la transcripción *in vitro* de la luciferasa

Modificación química	Rendimiento (mg)
N6-metiladenosina	0,99
5-metilcitidina	1,29
N4-acetilcitidina	1,0
5-formilcitidina	0,55
Pseudouridina	2,0
N 1-metilpseudouridina	1,43
2-tiouridina	1,56
5-metoxiuridina	2,35
5-metiluridina	1,01
α-tio-citidina	0,83
5-Br-uridina (5Bru)	1,96
5 (2 carbometoxivinil) uridina	0,89
5 (3-1E propenil amino) uridina	2,01
N4-acetilcitidina/pseudouridina	1,34
N4-acetiletidina/N1-metilpseudouridina	1,26
5-metilcitidina/5-metoxiuridina	1,38
5-metilcitidina/5-bromouridina	0,12
5-metilcitidina/5-metiluridina	2,97
5-metilcitidina/ la mitad de las uridinas se modifican con 2-tiouridina	1,59

Modificación química	Rendimiento (mg)
5-metilcitidina/2-tiouridina	0,90
5 -metilcitidina/pseudouridina	1,83
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	1,33

Tabla 35. Química de recubrimiento y rendimiento para ARNm modificado con luciferasa

Modificación química	Rendimiento (mg)
5-metilcitidina	1,02
N4-acetilcitidina	0,93
5-formilcitidina	0,55
Pseudouridina	2,07
N1-metilpseudouridina	1,27
2-tiouridina	1,44
5-metoxiuridina	2
5-metiluridina	0,8
α -tio-citidina	0,74
5-Br-uridina (5Bru)	1,29
5 (2 carbometoxivinil) uridina	0,54
5 (3-1E propenil amino) uridina	1,39
N4-acetilcitidina/pseudouridina	0,99
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	1,08
5-metilcitidina/5-metoxiuridina	1,13
5-metilcitidina/5-metiluridina	1,08
5-metilcitidina/ la mitad de las uridinas se modifican con 2-tiouridina	1,2
5-metilcitidina/2-tiouridina	1,27
5-metilcitidina/pseudouridina	1,19
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	1,04

Tabla 36. Química de transcripción *in vitro* y rendimiento para ARNm modificado con G-CSF

Modificación química	Rendimiento (mg)
N6-metiladenosina	1,57
5-metilcitidina	2,05
N4-acetilcitidina	3,13
5-formilcitidina	1,41
Pseudouridina	4,1
N1-metilpseudouridina	3,24
2-tiouridina	3,46
5-metoxiuridina	2,57
5-metiluridina	4,27
4-tiouridina	1,45
2'-F-uridina	0,96
α -tio-citidina	2,29
2'-F-guanosina	0,6

Modificación química	Rendimiento (mg)
N-1-metiladenosina	0,63
5-Br-uridina (5Bru)	1,08
5 (2 carbometoxivinil) uridina	1,8
5 (3-1E propenil amino) uridina	2,09
N4-acetilcitidina/pseudouridina	1,72
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	1,37
5-metilcitidina/5-metoxiuridina	1,85
5-metilcitidina/5-metiluridina	1,56
5-metilcitidina/ la mitad de las uridinas se modifican con 2-tiouridina	1,84
5-metilcitidina/2 -tiouridina	2,53
5-metilcitidina/pseudouridina	0,63
N4-acetilcitidina/2 -tiouridina	1,3
N4-acetilcitidina/5-bromouridina	1,37
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	1,25
N4-acetilcitidina/pseudouridina	2,24

Tabla 37. Química de recubrimiento y rendimiento para ARNm modificado con G-CSF

Modificación química	Rendimiento (mg)
N6-metiladenosina	1,04
5-metilcitidina	1,08
N4-acetilcitidina	2,73
5-formilcitidina	0,95
Pseudouridina	3,88
N1-metilpseudouridina	2,58
2-tiouridina	2,57
5-metoxiuridina	2,05
5-metiluridina	3,56
4-tiouridina	0,91
2'-F-uridina	0,54
α -tio-citidina	1,79
2'-F-guanosina	0,14
5-Br-uridina (5Bru)	0,79
5 (2 carbometoxivinil) uridina	1,28
5 (3-1E propenil amino) uridina	1,78
N4-acetilcitidina/pseudouridina	0,29
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	0,33
5-metileitidma/5-metoxiuridma	0,91
5-metilcitidina/5-metiluridina	0,61
5-metilcitidina/ la mitad de las uridinas se modifican con 2-tiouridina	1,24
5-metilcitidina/pseudouridina	1,08
N4-acetilcitidina/2-tiouridina	1,34

Modificación química	Rendimiento (mg)
N4-acetilcitidina/5-bromouridina	1,22
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	1,56

Ejemplo 85. Transcripción *in vitro* con polimerasa T7 mutante

5 ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en la secuencia; tapa 5', Tapa 1) y ARNm de G-CSF (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) se modificaron completamente con diferentes combinaciones químicas y químicas enumeradas en las Tablas 38-41 usando una polimerasa T7 mutante (kit de transcripción T7 Durascript® (Cat. N.º DS010925) (Epicentre®, Madison, WI).

10 El rendimiento de las reacciones de traducción se determinó mediante medición espectrofotométrica (OD260) y el rendimiento de Luciferasa se muestra en la Tabla 38 y G-CSF se muestra en la Tabla 40.

15 La luciferasa y el ARNm modificado con G-CSF también se sometieron a una reacción de recubrimiento enzimático y cada reacción de recubrimiento de ARNm modificado se evaluó para determinar el rendimiento mediante medición espectrofotométrica (OD260) y se evaluó el tamaño correcto mediante el uso de bioanalizador. El rendimiento de la reacción de recubrimiento para luciferasa se muestra en la Tabla 39 y G-CSF se muestra en la Tabla 41.

Tabla 38. Química de transcripción *in vitro* y rendimiento para ARNm modificado con luciferasa

Modificación química	Rendimiento (ug)
2'Fluorocitosina	71,4
2'Fluorouridina	57,5
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A	26,4
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A	73,3
N1 -acetilcitidina/2-fluorouridina	202,2
5-metilcitidina/2-fluorouridina	131,9
2-fluorocitosina/pseudouridina	119,3
2-fluorocitosina/N1-metilpseudouridina	107,0
2 - fluorocitosina/2 - tiouridina	34,7
2-fluorocitosina/5-bromouridina	81,0
2-fluorocitosina/2-fluorouridina	80,4
2-fluoroguanina/5-metileitosina	61,2
2-fluoroguanina/5-metilcitosina/pseudouridina	65,0
2-fluoroguanina/5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	41,2
2-fluoroguanina/pseudouridina	79,1
2-fluoroguanina/N1-metilpseudouridina	74,6
5-metilcitidina/pseudouridina, prueba B	91,8
5-metileitidma/N1-metilpseudoundima, prueba B	72,4
2'fluoroadenosina	190,98

20

Tabla 39. Química de recubrimiento y rendimiento para ARNm modificado con luciferasa

Modificación química	Rendimiento (ug)
2'Fluorocitosina	19,2
2'Fluorouridina	16,7
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A	7,0
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A	21,5

Modificación química	Rendimiento (ug)
N1 -acetilcitidina/2-fluorouridina	47,5
5-metilcitidina/2-fluorouridina	53,2
2-fluorocitosina/pseudouridina	58,4
2-fluorocitosina/N1-metilpseudouridina	26,2
2-fluorocitosina/2-tiouridina	12,9
2-fluorocitosina/5-bromouridina	26,5
2-fluorocitosina/2-fluorouridina	35,7
2-fluoroguanina/5-metilcitosina	24,7
2-fluoroguanina/5-metilcitosina/pseudouridina	32,3
2-fluoroguanina/5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	31,3
2-fluoroguanina/pseudouridina	20,9
2-fluoroguanina/N1-metilpseudouridina	29,8
5-metilcitidina/pseudouridina, prueba B	58,2
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina, prueba B	44,4

Tabla 40. Química de transcripción *in vitro* y rendimiento para ARNm modificado con G-CSF

Modificación química	Rendimiento (ug)
2 'Fluorocitosina	56,5
2'Fluorouridina	79,4
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A	21,2
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A	77,1
N1-acetilcitidina/2-fluorouridina	168,6
5-metilcitidina/2-fluorouridina	134,7
2-fluorocitosina/pseudouridina	97,8
2-fluorocitosina/N1-metilpseudouridina	103,1
2-fluorocitosina/2-tiouridina	58,8
2-fluorocitosina/5-bromouridina	88,8
2-fluorocitosina/2-fluorouridina	93,9
2-fluoroguanina/5-metilcitosina	97,3
2-fluoroguanina/5-metilcitosina/pseudouridina	96,0
2-fluoroguanina/5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	82,0
2-fluoroguanina/pseudouridina	68,0
2-fluoroguanina/N1-metilpseudouridina	59,3
5-metilcitidina/pseudouridina, prueba B	58,7
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina, prueba B	78,0

Tabla 41. Química de recubrimiento y rendimiento para ARNm modificado con G-CSF

Modificación química	Rendimiento (ug)
2 'Fluorocitosina	16,9
2'Fluorouridina	17,0
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A	10,6
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, prueba A	22,7

Modificación química	Rendimiento (ug)
N1 -acetilcitidina/2-fluorouridina	19,9
5-metilcitidina/2-fluorouridina	21,3
2-fluorocitosina/pseudouridina	65,2
2-fluorocitosina/N1-metilpseudouridina	58,9
2-fluorocitosina/2-tiouridina	41,2
2-fluorocitosina/5-bromouridina	35,8
2-fluorocitosina/2-fluorouridina	36,7
2-fluoroguanina/5-metilcitosina	36,6
2-fluoroguanina/5-metilcitosina/pseudouridina	37,3
2-fluoroguanina/5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	30,7
2-fluoroguanina/pseudouridina	29,0
2-fluoroguanina/N1-metilpseudouridina	22,7
5-metilcitidina/pseudouridina, prueba B	60,4
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina, prueba B	33,0

Ejemplo 86. Compuestos de 2'O-metilo y 2'fluoro

- 5 ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) se produjeron como versiones completamente modificadas con las sustancias químicas en la Tabla 42 y se transcribieron usando polimerasa T7 mutante (kit de transcripción Durascribe® T7 (Cat. N.º DS010925) (Epicentre®, Madison, WI). El ARNm que contiene 2' fluoro se elaboró usando Durascribe T7, sin embargo, el ARNm que contiene 2' Ometilo no se pudo transcribir usando Durascribe T7.
- 10 La incorporación de ARNm modificado con 2'Ometil podría lograrse posiblemente mediante el uso de otras polimerasas T7 mutantes (Nat Biotechnol. (2004) 22:1155-1160; Res. de ácidos nucleicos (2002) 30:e138). Alternativamente, las modificaciones de 2'OMe podrían introducirse post-transcripcionalmente usando medios enzimáticos.
- 15 La introducción de modificaciones en el grupo 2' del azúcar tiene muchas ventajas potenciales. Se sabe que las sustituciones 2'OMe, como las sustituciones de fluoro 2' protegen contra nucleasas y también se ha demostrado que eliminan el reconocimiento inmunitario innato cuando se incorporan en otros ácidos nucleicos tales como ARNs y Crooke anti-sentido, ed. Antisense Drug Technology, 2ª edición; Boca Raton: CRC press).
- 20 El ARNm 2' modificado con fluoro se transfectó a continuación en células HeLa para evaluar la producción de proteínas en un contexto celular y el mismo ARNm también se evaluó en un sistema de reticulocitos de conejo libre de células. Se utilizó un control de luciferasa no modificada (luciferasa natural) para ambos experimentos de transcripción, también se analizó un control de transfección simulada y no tratada (Lipofectamine 2000 solo) para la transfección de HeLa y se analizó un control de no ARN para los reticulizados de conejo.
- 25 Para los experimentos de transfección de HeLa, el día antes de la transfección, 20.000 células de HeLa (ATCC no. CCL-2; Manassas, VA) se cosecharon mediante tratamiento con solución de tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) y se sembraron en un volumen total de 100 ul de medio EMEM (complementado con 10 % de FCS y 1x Glutamax) por pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Manassas, VA). Las células se cultivaron a 37 oC en atmósfera de CO₂ al 5 % durante la noche. Al día siguiente, 83 ng del ARN modificado con luciferasa que contiene 2' fluoro (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) con la modificación química descrita en la Tabla 42, se diluyeron en 10 ul de volumen final de OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). Se utilizó Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) como reactivo de transfección y se diluyeron 0,2 ul en 10 ul de volumen final de OPTI-MEM. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, ambas soluciones se combinaron y se incubaron 15 minutos adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la solución combinada de 20 ul al medio de cultivo celular de 100 ul que contenía las células HeLa y se incubó a temperatura ambiente. Después de 18 a 22 horas de incubación, las células que expresaban luciferasa se lisaron con 100 ul de tampón de lisis pasiva (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Las alícuotas de los lisados se transfirieron a placas de 96 pocillos de poliestireno opaco blanco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). Los volúmenes de lisado se ajustaron o diluyeron hasta que no se detectaron más de 2 millones de unidades de luz relativa (RLU) por pocillo para las muestras que producían la
- 30
- 35
- 40

señal más fuerte y las RLU para cada química analizada se muestran en la Tabla 42. El lector de placas fue un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de aproximadamente 200 unidades de luz relativa por pocillo.

- 5 Para el ensayo de lisado de reticulocitos de conejo, el ARNm de luciferasa que contiene 2' fluoro se diluyó en agua libre de nucleasa estéril hasta una cantidad final de 250 ng en 10 ul y se agregó a 40 ul de lisado de reticulocitos de conejo recién preparado y la reacción de traducción *in vitro* se realizó en un tubo de reacción de polipropileno estándar de 1,5 mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 30 °C en un bloque de calentamiento seco. El ensayo de traducción se realizó con el kit de lisado de reticulocitos de conejo (tratado con nucleasa) (Promega, Madison, WI)
- 10 según las instrucciones del fabricante. El amortiguador de reacción se complementó con una mezcla uno a uno de soluciones madre de aminoácidos proporcionadas desprovistas de leucina o metionina, lo que dio como resultado una mezcla de reacción que contenía cantidades suficientes de ambos aminoácidos para permitir una traducción *in vitro* eficaz. Después de 60 minutos de incubación, la reacción se detuvo colocando los tubos de reacción en hielo.
- 15 Se transfirieron alícuotas de la reacción de traducción *in vitro* que contenía ARN modificado con luciferasa a placas de 96 pocillos de poliestireno opaco blanco (Corning, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). Los volúmenes de las reacciones de traducción *in vitro* se ajustaron o diluyeron hasta que no se detectaron más de 2 millones de unidades de luz relativa (RLU) por pocillo para las muestras que producían la señal más fuerte y las RLU para cada química analizada se muestran en la Tabla 43.
- 20 El lector de placas era un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de alrededor de 160 unidades de luz relativa por pocillo.

Como se puede observar en la Tabla 42 y 43, múltiples compuestos que contienen 2'fluoro son activos *in vitro* y producen proteína luciferasa.

25

Tabla 42. Células HeLa

Modificación química	Concentración (ug/ml)	Volumen (ul)	Rendimiento (ug)	RLU
2'Fluoroadenosina	381,96	500	190,98	388,5
2'Fluorocitosina	654,56	500	327,28	2420
2'Fluoroguanina	541.795	500	270,90	11.705,5
2'Fluorouridina	944,005	500	472,00	6767,5
Luciferasa natural	N/A	N/A	N/A	133.853,5
Mock	N/A	N/A	N/A	340
Sin tratamiento	N/A	N/A	N/A	238

Tabla 43. Reticulizados de conejo

Modificación química	RLU
2 'Fluoroadenosina	162
2'Fluorocitosina	208
2'Fluoroguanina	371.509
2'Fluorouridina	258
Luciferasa natural	2.159.968
Sin ARN	156

30 **Ejemplo 87. Luciferasa en células HeLa utilizando una combinación de modificaciones**

Para evaluar el uso de ARNm modificado con 2' fluoro en combinación con otra modificación, se transcribieron una serie de ARNm usando ya sea polimerasa T7 de tipo salvaje (compuestos que no contienen fluoro) o usando polimerasas T7 mutantes (compuestos que contienen fluoro) como se describe en el Ejemplo 86. Todos los ARNm

35 modificados se analizaron mediante transfección *in vitro* en células HeLa.

El día antes de la transfección, 20.000 células HeLa (ATCC no. CCL-2; Manassas, VA) se recolectaron mediante tratamiento con solución de tripsina-EDTA (LifeTechnologies, Grand Island, NY) y se sembraron en un volumen total de 100 ul de medio EMEM (complementado con 10 % de FCS y 1x Glutamax) por pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Manassas, VA). Las células se cultivaron a 37 oC en atmósfera de CO₂ al 5 % durante

40 la noche. Al día siguiente, 83 ng de ARN modificado con luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) con la

modificación química descrita en la Tabla 44, se diluyeron en 10 ul de volumen final de OPTI-MEM (LifeTechnologies, Grand Island, NY). Se utilizó Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, Grand Island, NY) como reactivo de transfección y se diluyeron 0,2 ul en 10 ul de volumen final de OPTI-MEM. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, ambas soluciones se combinaron y se incubaron 15 minutos adicionales a temperatura ambiente. A continuación, se añadió la solución combinada de 20 ul al medio de cultivo celular de 100 ul que contenía las células HeLa y se incubó a temperatura ambiente.

Después de 18 a 22 horas de incubación, las células que expresaban luciferasa se lisaron con 100 ul de tampón de lisis pasiva (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Las alícuotas de los lisados se transfirieron a placas de 96 pocillos de poliestireno opaco blanco (Coming, Manassas, VA) y se combinaron con 100 ul de solución de ensayo de luciferasa completa (Promega, Madison, WI). Los volúmenes de lisado se ajustaron o diluyeron hasta que no se detectaron más de 2 millones de unidades de luz relativa (RLU) por pocillo para las muestras que producían la señal más fuerte y las RLU para cada química analizada se muestran en la Tabla 44. El lector de placas fue un BioTek Synergy HI (BioTek, Winooski, VT). La señal de fondo de las placas sin reactivo fue de aproximadamente 200 unidades de luz relativa por pocillo.

Como se evidencia en la Tabla 44, la mayoría de las combinaciones de modificaciones dieron como resultado ARNm que produjo la proteína luciferasa funcional, que incluye todos los compuestos que no contienen flúor y muchas de las combinaciones que contienen modificaciones de 2' flúor.

Tabla 44. Luciferasa

Modificación química	RLU
N4-acetilcitidina/pseudouridina	113.796
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	316.326
5-metilcitidina/5-metoxiuridina	24.948
5-metilcitidina/5-metiluridina	43.675
5-metilcitidina/mitad de las uridinas modificadas con 50 % de 2-tiouridina	41.601
5-metilcitidina/2-tiouridina	1.102
5-metilcitidina/pseudouridina	51.035
5-metilcitidina/N1 metil pseudouridina	152.151
N4-acetilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	288
5-metilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	269
2'Fluorocitosina trifosfato /pseudouridina	260
2'fluorocitosina trifosfato /N1-metilpseudouridina	412
2'fluorocitosina trifosfato/2-tiouridina	427
2'fluorocitosina trifosfato/5-bromouridina	253
2'fluorocitosina trifosfato /2'fluorouridina trifosfato	184
2'fluoroguanina trifosfato/5-metilcitidina	321
2'fluoroguanina trifosfato/5-metilcitidina/Pseudouridina	207
2'fluoroguanina /5-metilcilidina/N1 metilpsuedouridina	235
2'Fluoroguanina/pseudouridina	218
2'Fluoropuanina/N1-metilpseudouridina	247
5-metilcitidina/pseudouridina, prueba A	13.833
5-metilcitidina/N-metilpseudouridina, prueba A	598
2'fluorocitosina trifosfato	201
2'F luorouridina trifosfato	305
5-metilcitidina/pseudouridina, prueba B	115.401
5-metilcitidina/N-metilpseudouridina, prueba B	21.034
Luciferasa natural	30.801

Modificación química	RLU
Sin tratamiento	344
Mock	262

Ejemplo 88. Transcripción *in vitro* de G-CSF

5 Para evaluar la actividad de todas nuestras diferentes modificaciones químicas en el contexto de un segundo marco de lectura abierto, replicamos experimentos previamente realizados usando ARNm de luciferasa, con ARNm de G-CSF humano. ARNm de G-CSF (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) se modificaron completamente con las sustancias químicas en las Tablas 45 y 46 usando polimerasa T7 de tipo salvaje (para todos los compuestos que no contienen flúor) o polimerasa T7 mutante (para todos los compuestos que contienen flúor). La polimerasa T7 mutante se obtuvo comercialmente (kit de transcripción Durascribe® T7 (Cat. N.º DS010925) (Epicentre®, Madison, WI).

15 El ARN modificado en las Tablas 45 y 46 se transfectó *in vitro* en células HeLa o se añadió a reticulados de conejo (250 ng de ARNm modificado) como se indica. Un control de G-CSF no tratado, transfectado simulado (reactivo de transfección solo), completamente modificado con 5-metilcitosina y control de N1-metilpseudouridina o luciferasa (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) completamente modificada con 5-metilcitosina y N1-metilpseudouridina también se analizaron. La expresión de la proteína G-CSF se determinó mediante ELISA y los valores se muestran en las Tablas 45 y 46. En la Tabla 45, "NT" significa no probado.

20 Como se muestra en la Tabla 45, muchas, pero no todas, las modificaciones químicas dieron como resultado la producción de proteína G-CSF humana. Estos resultados de los sistemas de traducción basados en células y libres de células se correlacionan muy bien con las mismas modificaciones que generalmente funcionan o no funcionan en ambos sistemas. Una excepción notable es el ARNm de G-CSF modificado con 5-formilcitosina que funcionó en el sistema de traducción libre de células, pero no en el sistema de transfección basado en células HeLa. También se observó una diferencia similar entre los dos ensayos con ARNm de luciferasa modificada con 5-formilcitosina.

30 Como se demuestra en la Tabla 46, muchas, pero no todas, las sustancias químicas modificadas con ARNm de G-CSF (cuando se usan en combinación) demostraron actividad *in vivo*. Además, la presencia de N1-metilpseudouridina en el ARNm modificado (con N4-acetilcitosina o 5 metilcitosina) demostró una mayor expresión que cuando se probaron las mismas combinaciones con pseudouridina. En conjunto, estos datos demuestran que el ARNm de N1-metilpseudouridina que contiene G-CSF produce una expresión de proteína mejorada *in vitro*.

Tabla 45. Expresión G-CSF

Modificación química	Células HeLa de proteína G-CSF (pg/ml)	Células reticuladas de conejo de proteína G-CSF (pg/ml)
Pseudouridina	1.150.909	147.875
5-metiluridina	347.045	147.250
2-tiouridina	417.273	18.375
N1-metilpseudouridina	NT	230.000
4-tiouridina	107.273	52.375
5-metoxiuridina	1.715.909	201.750
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba A	609.545	119.750
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina , prueba A	1.534.318	110.500
2'-Fluoro-guanosina	11.818	0
2'-Fluoro-uridina	60.455	0
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba B	358.182	57.875
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina , Prueba B	1.568.636	76.750
5-Bromo-uridina	186.591	72.000
5-(2carbometoxivinil) uridina	1.364	0

Modificación química	Células HeLa de proteína G-CSF (pg/ml)	Células reticuladas de conejo de proteína G-CSF (pg/ml)
5-[3(1-E-propenilamino) uridina	27.955	32.625
α-tio-citidina	120.455	42.625
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba C	882.500	49.250
N1-metil-adenosina	4.773	0
N6-metil-adenosina	1.591	0
5-metil-citidina	646.591	79.375
N4-acetilcitidina	39.545	8.000
5-formil-citidina	0	24.000
5-metilcitosina/pseudouridina, prueba D	87.045	47.750
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina Prueba D	1.168.864	97.125
Mock	909	682
Sin tratamiento	0	0
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina Control	1.106.591	NT
Control de luciferasa	NT	0

Tabla 46. Química de combinación en células HeLa

Modificación química	Células HeLa de proteína G-CSF (pg/ml)
N4-acetilcitidina/pseudouridina	537.273
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	1.091.818
5-metilcitidina/5-metoxiuridina	516.136
5-metilcitidina/5-bromouridina	48.864
5-metiteitidima/5-metiluridina	207.500
5-metilcitidina/2 -tiouridina	33.409
N4-acetilcitidina/5-bromouridina	211.591
N4-acetilcitidina/2-tiouridina	46.136
5-metilcitosina/pseudouridina	301.364
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina	1.017.727
N4-acetilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	62.273
5-metilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	49.318
2'Fluorocitosina trifosfato/pseudouridina	7.955
2'fluorocitosina trifosfato/N1-metilpseudouridina	1.364
2'Ftuorocitosina trifosfato/2-tiouridina	0
2'fluorocitosina trifosfato/5-bromouridina	1.818
2'fluorocitosina trifosfato/2'fluorouridina trifosfato	909
2'fluoroguanina trifosfato/5-metilcitidina	0
2'fluoroguanina trifosfato/5-metilcitidina/pseudouridina	0
2'fluoroguanina trifosfato /5-metilcitidina/N1 metilpseudouridina	1.818
2'fluoroguanina trifosfato/pseudouridina	1.136
2' fluoroguanina trifosfato/2'fluorocitosina trifosfato/N1-	0

Modificación química	Células HeLa de proteína G-CSF (pg/ml)
metilpseudouridina	
5-metilcitidina/pseudouridina	617.727
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	747.045
5-metilcitidina/pseudouridina	475.455
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	689.091
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, Control 1	848.409
5-metilcitosina/N1-metilpseudouridina, Control 2	581.818
Mock	682
Sin tratamiento	0
Trifosfato 2'ftuorocitosina de luciferasa	0
Trifosfato 2'fluorouridina de luciferasa	0

Ejemplo 89. Detección de Químicos

5 Las tablas enumeradas a continuación (Tablas 47-49) resumen gran parte de los datos de detección *in vitro* e *in vitro* con los diferentes compuestos presentados en los ejemplos anteriores. Existe una buena correlación entre los ensayos de traducción basados en células y libres de células. Las mismas sustituciones químicas generalmente muestran buena concordancia ya sea que se analicen en el contexto de ARNm de G-CSF o luciferasa. Por último, el ARNm que contiene N1 -metilpseudouridina muestra un nivel muy alto de expresión de proteínas con poca o ninguna estimulación de citocinas detectable *in vitro* e *in vivo*, y es superior al ARNm que contiene pseudouridina tanto *in vitro* como *in vivo*.

10 ARNm de luciferasa (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 3; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos que no se muestran en la secuencia; tapa 5', Tapa 1) y ARNm de G-CSF (secuencia de ARNm que se muestra en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) se modificaron con productos químicos de origen natural y no natural descritos en las Tablas 47 y 48 o productos químicos de combinación descritos en la Tabla 48 y probados usando procedimientos descritos en esta invención.

15 En las Tablas 47 y 48, "*" se refiere a una reacción de transcripción *in vitro* usando una polimerasa T7 mutante (kit de transcripción T7 Durascribe® (Cat. N. ° DS010925) (Epicentre®, Madison, WI); "*" se refiere al segundo resultado de la reacción de transcripción *in vitro* usando una polimerasa T7 mutante (kit de transcripción T7 Durascribe® (Cat. No. DS010925) (Epicentre®, Madison, WI); "*" se refiere a la producción observada en traducciones libres de células (lisados de reticulocitos de conejo); la producción de proteínas de HeLa se juzga por "+", "+/-" y "-"; cuando se hace referencia a G-CSF PBMC "++++" significa más de 6.000 pg/ml G-CSF, "+++" significa más de 3.000 pg/ml G-CSF, "++" significa más de 1.500 pg/ml G-CSF, "+" significa más de 300 pg/ml G-CSF, "+/-" significa más de 150-300 pg/ml G-CSF y el fondo fue de aproximadamente 110 pg/ml; cuando se hace referencia a citocina PBMC "++++" significa más de 1.000 pg/ml interferón-alfa (IFN-alfa), "++++" significa más de 600 pg/ml IFN-alfa, "+++" significa más de 300 pg/ml IFN-alfa, "++" significa más de 100 pg/ml IFN-alfa, "-" significa menos de 100 pg/ml y el fondo era de aproximadamente 70 pg/ml; y "NT" significa no probado. En la Tabla 48, la producción de proteína se evaluó usando una polimerasa T7 mutante (kit de transcripción Durascribe® T7 (Cat. N. ° DS010925) (Epicentre®, Madison, WI).

30

Tabla 47. De origen natural

Nombre común (símbolo)	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteína (Luc; HeLa)	Proteína (G-CSF; HeLa)	Proteína (G-CSF; PBMC)	Citocinas (G-CSF; PBMC)	Proteína In Vivo (Luc)	Proteína In Vivo (G-CSF)
1 -metiladenosina (m ¹ A)	No apto	Apto	NT	-	+/-	++	NT	NT
N ⁶ -metiladenosina (m ⁶ A)	Apto	Apto	-	-	+/-	++++	NT	NT
2'-O-metiladenosina (Am)	No apto*	No realizado	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Nombre común (símbolo)	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteína (Luc; HeLa)	Proteína (G-CSF; HeLa)	Proteína (G-CSF; PBMC)	Citocinas (G-CSF; PBMC)	Proteína In Vivo (Luc)	Proteína In Vivo (G-CSF)
5-metilcitidina (m ⁵ C)	Apto	Apto	+	+	+	++	+	NT
2'-O-metilcitidina (Cm)	No apto*	No realizado	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-tiocitidina (s ² C)	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
N ⁴ -acetilcitidina (ac ⁴ C)	Apto	Apto	+	+	+/-	+++	+	NT
5-formilcitidina (f ⁵ C)	Apto	Apto	-***	-***	-	+	NT	NT
2'-O-metilguanosina (Gm)	No apto*	No realizado	NT	NT	NT	NT	NT	NT
inosina (I)	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
pseudouridina (Y)	Apto	Apto	+	+	++	+	+	NT
5-metiluridina (m ⁵ U)	Apto	Apto	+	+	+/-	+	NT	NT
2'-O-metiluridina (Um)	No apto*	No realizado	NT	NT	NT	NT	NT	NT
1-metilpseudouridina (m ¹ Y)	Apto	Apto	+	No realizado	++++	-	+	NT
2-tiouridina (s ² U)	Apto	Apto	-	+	+	+	NT	NT
4-tiouridina (s ⁴ U)	No apto	Apto		+	+/-	++	NT	NT
5-metoxiuridina (mo ⁵ U)	Apto	Apto	+	+	++	-	+	NT
3-metiluridina (m ³ U)	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Tabla 48. De origen no natural

Nombre común	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteína (Luc; HeLa)	Proteína (G-CSF; HeLa)	Proteína (G-CSF; PBMC)	Citoquinas (G-CSF; PBMC)	Proteína In Vivo (Luc)	Proteína In Vivo (G-CSF)
2'-F-ara-guanosina	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-ara-adenosina	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-ara-citidina	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-ara-uridina	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-guanosina	No apto/ Apto* *	Apto/No apto***	+**	+/-	-	+	+	NT
2'-F-adenosina	No apto/ Apto* *	No apto/No apto***	-**	NT	NT	NT	NT	NT
2'-F-citidina	No apto/ Apto* *	No apto/Apto* **	+**	NT	NT	NT	+	NT
2'-F-uridina	No apto/ Apto* *	Apto/Apto* **	+**	+	+/-	+	-	NT

Nombre común	IVT (Luc)	IVT (G-CSF)	Proteína (Luc; HeLa)	Proteína (G-CSF; HeLa)	Proteína (G-CSF; PBMC)	Citoquinas (G-CSF; PBMC)	Proteína In Vivo (Luc)	Proteína In Vivo (G-CSF)
2'-OH-ara-guanosina	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-O H -ara-adenosina	No realizado	No realizado	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-ara-citidina	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2'-OH-ara-uridina	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-Br-Uridina	Apto	Apto	+	+	+	+	+	
5-(2-carbometoxivinil) uridina	Apto	Apto	-	-	+/-	-		
5-[3-(1-E-Propenilamino) uridina (denominada Chem 5)	Apto	Apto	-	+	+	-		
N6-(19-amino-pentaoxonadecil) A	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2-Dimetilamino guanosina	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-Aza-citidina	No apto	No apto	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-Tio-citidina	Apto	Apto	+	+	+/-	+++	NT	NT
Pseudo-isocitidina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-yodo-uridina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-Tio-uridina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-Aza-uridina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Desoxi-timidina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-Tio guanosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
8-Oxo-guanosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
O6-Metil-guanosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-Deaza-guanosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
6-Cloro-purina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
a-Tio-adenosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7-Deaza-adenosina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
5-yodo-citidina	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

En la Tabla 49, la producción de proteína de HeLa se juzga por "+," "+/-" y "-"; cuando se hace referencia a G-CSF PBMC "++++" significa más de 6.000 pg/ml G-CSF, "+++" significa más de 3.000 pg/ml G-CSF, "++" significa más de 1.500 pg/ml G-CSF, "+" significa más de 300 pg/ml G-CSF, "+/-" significa más de 150-300 pg/ml G-CSF y el fondo era de aproximadamente 110 pg/ml; cuando se hace referencia a citocina PBMC "++++" significa más de 1.000 pg/ml interferón-alfa (IFN-alfa), "+++" significa más de 600 pg/ml IFN-alfa, "++" significa más de 300 pg/ml IFN-alfa, "+" significa más de 100 pg/ml IFN-alfa, "-" significa menos de 100 pg/ml y el fondo era de aproximadamente 70 pg/ml;" WT "hace referencia a la polimerasa de tipo salvaje T7, "MT" se refiere a la polimerasa mutante T7 (Durascribe® T7 kit de transcripción (Cat. No. DS010925) (Epicentre®, Madison, WI) y "NT" significa no probado.

5

10

Tabla 49. Química de combinación

Análogo de citidina	Análogo de uridina	Purina	IVT Luc	IVT (G-CSF)	Proteína (Luc; HeLa)	Proteína (G-CSF; HeLa)	Proteína (G-CSF; PBMC)	Citocinas (G-CSF; PBMC)	Proteína In Vivo (Luc)
N4-acetilcitidina	pseudouridina	A,G	WT apto	WT apto	+	+	NT	NT	+
N4-acetilcitidina	N1-metilpseudouridina	A,G	WT apto	WT apto	+	+	NT	NT	+
5-metilcitidina	5-metoxiuridina	A,G	WT apto	WT apto	+	+	NT	NT	+
5-metilcitidina	5-bromouridina	A,G	WT apto	WT apto	No realizado	+	NT	NT	
5-metilcitidina	5-metiluridina	A,G	WT apto	WT apto	+	+	NT	NT	+
5-metilcitidina	50 % 2-tiouridina; 50 % uridina	A,G	WT apto	WT apto	+	NT	NT	NT	+
5-metilcitidina	100 % de 2-tiouridina	A,G	WT apto	WT apto	-	+	NT	NT	
5-metilcitidina	pseudouridina	A,G	WT apto	WT apto	+	+	++	+	+
5-metilcitidina	N1-metilpseudouridina	A,G	WT apto	WT apto	+	+	++++	-	+
N4-acetilcitidina	2-tiouridina	A,G	No realizado	WT apto	No realizado	+	NT	NT	NT
N4-acetilcitidina	5-bromouridina	A, G	No realizado	WT apto	No realizado	+	NT	NT	NT
N4-acetilcitidina	2 Fluorouridina trifosfato	A,G	Apto	Apto	-	+	NT	NT	NT
5-metilcitidina	2 Fluorouridina trifosfato	A,G	Apto	Apto	-	+	NT	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	pseudouridina	A,G	Apto	Apto	-	+	NT	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	N1-metilpseudouridina	A,G	Apto	Apto	-	+/-	NT	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	2-tiouridina	A,G	Apto	Apto	-	-	NT	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	5-bromouridina	A,G	Apto	Apto	-	+/-	NT	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	2 Fluorouridina trifosfato	A,G	Apto	Apto	-	+/-	NT	NT	NT
5-metilcitidina	uridina	A,2 Fluoro GTP	Apto	Apto	-	-	NT	NT	NT
5-metilcitidina	pseudouridina	A,2 Fluoro GTP	Apto	Apto	-	-	NT	NT	NT
5-metilcitidina	N1-metilpseudouridina	A,2 Fluoro GTP	Apto	Apto	-	+/-	NT	NT	NT

Análogo de citidina	Análogo de uridina	Purina	IVT Luc	IVT (G-CSF)	Proteína (Luc; HeLa)	Proteína (G-CSF; HeLa)	Proteína (G-CSF; PBMC)	Citocinas (G-CSF; PBMC)	Proteína In Vivo (Luc)
2 Fluorocitosina trifosfato	pseudouridina	A,2 Fluoro GTP	Apto	Apto	-	+/-	NT	NT	NT
2 Fluorocitosina trifosfato	N1-metilpseudouridina	A,2 Fluoro GTP	Apto	Apto	-	-	NT	NT	NT

Ejemplo 90. Química del 2'Fluoro en PBMC

5 La capacidad del ARNm modificado por G-CSF (secuencia de ARNm mostrada en la SEQ ID NO: 1; cola poliA de aproximadamente 160 nucleótidos no mostrados en secuencia; tapa 5', Tapa 1) para desencadenar una respuesta inmunitaria innata se determinó midiendo la producción de interferón-alfa (IFN-alfa) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa). El uso de cultivos de PBMC *in vitro* es una forma aceptada de medir el potencial inmunoestimulante de los oligonucleótidos (Robbins y col., los oligonucleótidos 2009 19:89-102) y los procedimientos de transfección se describen en esta invención. En la Tabla 50 se muestra el promedio de 2 o 3 donantes de PBMC separados de la producción de interferón-alfa (IFN-alfa) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) a lo largo del tiempo según lo medido por ELISA específico. También se analizaron los controles de R848, P(I)P(C), LPS y Lipofectamine 2000 (L2000).

15 Con respecto al reconocimiento inmunitario innato, mientras que ambas químicas de ARNm modificado impidieron en gran medida la producción de IFN-alfa y TNF-alfa con respecto a los controles positivos (R848, P(I)P(C)), los compuestos 2'fluoro reducen la producción de IFN-alfa y TNF-alfa incluso más baja que otras combinaciones y las combinaciones de N4-acetilcitidina aumentaron el perfil de citocinas.

Tabla 50. IFN-alfa y TNF-alfa

	IFN-alfa: 3 Promedio de donantes (pg/ml)	TNF-alfa: 2 Promedio de donantes (pg/ml)
L2000	1	361
P(I)P(C)	482	544
R848	45	8.235
LPS	0	6.889
N4-acetilcitidina/pseudouridina	694	528
N4-acetilcitidina/N1-metilpseudouridina	307	283
5-metilcitidina/5-metoxiuridina	0	411
5-metilcitidina/5-bromouridina	0	270
5-metilcitidina/5-metiluridina	456	428
5-metilcitidina/2-tiouridina	274	277
N4-acetilcitidina/2-tiouridina	0	285
N4-acetilcitidina/5-bromouridina	44	403
5-metilcitidina/pseudouridina	73	332
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	31	280
N4-acetilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	35	32
5-metilcitidina/2'fluorouridina trifosfato	24	0
2'fluorocitidina trifosfato/N1-metilpseudouridina	0	11
2'fluorocitidinatrifosfato/2-tiouridina	0	0
2'fluorocitidina/ trifosfato5-bromouridina	12	2
2'fluorocitidina trifosfato/2'fluorouridina trifosfato	11	0
2'fluorocitidina trifosfato/5-metilcitidina	14	23

	IFN-alfa: 3 Promedio de donantes (pg/ml)	TNF-alfa: 2 Promedio de donantes (pg/ml)
2'fluorocitidina trifosfato/5-metilcitidina/pseudouridina	6	21
2'fluorocitidina trifosfato/5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	3	15
2'fluorocitidina trifosfato/pseudouridina	0	4
2'fluorocitidina trifosfato/N1-metilpseudouridina	6	20
5-metilcitidina/pseudouridina	82	18
5-metilcitidina/N1-metilpseudouridina	35	3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> TERAPÉUTICA MODERNA
- 5 <120> NUCLEÓSIDOS, NUCLEÓTIDOS Y ÁCIDOS NUCLEICOS MODIFICADOS, Y SUS USOS
- 10 <130> 219703
- <150> 61/542.533 <151> 2011-10-03
- <160> 6
- 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 758
- 20 <212> ARN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 1

```

gggaaaauaag agagaaaaga agaguaagaa gaaaauaag agccaccaug gccggucccg 60
cgacccaaag ccccaugaaa cuuauggccc ugcaguugcu gcuuugcac ucgcccucu 120
ggacagucca agaagcgacu ccucucggac cugccucauc guugcccgag ucauuccuuu 180
ugaagugucu ggagcaggug cgaaagauuc agggcgaug agccgcacuc caagagaagc 240
ucugcgcgac auacaaacu ugcacucccg aggagcucgu acugcucggg cacagcuugg 300
ggauucccug ggcuccucuc ugcuccuguc cgucgcagge uuugcaguug gcagggugcc 360
uuucccagcu ccacuceggu uuguucuugu aucagggacu gcugcaagcc cuugagggaa 420
ucucgccaga auugggcccg acgcuggaca cguugcagcu cgacguggcg gauuucgaa 480
caaccaucug gcagcagaug gaggaacugg ggauggcacc cgcgucgag cccacgcagg 540
gggcaaugcc ggccuuugcg uccgcguuuc agcgcagggc ggguggaguc cucguagcga 600
gccaccuuca aucauuuuug gaagucucgu accgggugcu gagacaucuu gcgcagccgu 660
gaagcgcugc cuucugcggg gcuugccuuc uggccaugcc cuucuucucu cccuugcacc 720
25 uguaccucuu ggucuuugaa uaaagccuga guaggaag 758

```

- <210> 2
- <211> 1838
- <212> ADN
- 30 <213> Homo Sapiens
- <400> 2

ES 2 911 677 T3

taatacgact	cactataggg	aaataagaga	gaaaagaaga	gtaagaagaa	atataagagc	60
caccatggaa	gatgcgaaga	acatcaagaa	gggacctgcc	ccgttttacc	ctttggagga	120
cggtacagca	ggagaacagc	tccacaaggc	gatgaaacgc	tacgcctg	tccccggaac	180
gattgcggtt	accgatgcac	atattgaggt	agacatcaca	tacgcagaat	acttcgaaat	240
gtcggtgagg	ctggcggaa	cgatgaagag	ataggtctt	aacactaatc	accgcatcgt	300
ggtgtgttcg	gagaactcat	tgcagttttt	catgccggtc	cttggagcac	ttttcatcgg	360
ggtcgcagtc	gcgccagcga	acgacatcta	caatgagcgg	gaactcttga	atagcatggg	420
aatctcccag	ccgacggtcg	tgtttgtctc	caaaaagggg	ctgcagaaaa	tcttcaacgt	480
gcagaagaag	ctccccatta	ttcaaaagat	catcattatg	gatagcaaga	cagattacca	540
agggttccag	tcgatgtata	cctttgtgac	atcgcatttg	ccgccagggg	ttaacgagta	600
tgacttcgtc	cccaggtcat	ttgacagaga	taaaaccatc	gcgctgatta	tgaattcctc	660
gggtagcacc	ggtttgccaa	agggggtggc	gttgccccac	cgactgctt	gtgtgcggtt	720
ctcgcacgct	agggatccta	tctttggtaa	tcagatcatt	cccgcacacg	caatcctgtc	780
cgtggtacct	tttcatcacg	gttttggcat	gttcacgact	ctcggctatt	tgatttgagg	840
tttcagggtc	gtacttatgt	atcggttcga	ggaagaactg	tttttgagat	ccttgcaaga	900
ttacaagatc	cagtcggccc	tccttgtgac	aacgcttttc	tcattctttg	cgaaatcgac	960
acttattgat	aagtatgacc	tttccaatct	gcatgagatt	gcctcagggg	gagcgccgct	1020
tagcaaggaa	gtcggggagg	cagtggccaa	gcgcttccac	cttcccggaa	ttcggcaggg	1080
atacgggctc	acggagacaa	catccgcgat	ccttatcacg	cccgagggg	acgataagcc	1140
gggagccgctc	ggaaaagtgg	tccccttctt	tgaagccaag	gtcgtagacc	tcgacacggg	1200
aaaaaccctc	ggagtgaacc	agaggggcca	gctctgcgtg	agagggccga	tgatcatgtc	1260
aggttacgtg	aataaccctg	aagcgcgcaa	tgcgctgatc	gacaaggatg	ggtggttgca	1320
ttcggggagg	attgcctatt	gggatgagga	tgagcacttc	tttatcgtag	atcgacttaa	1380
gagcttgatc	aaatacaaa	gagctcaggt	agcgcctgcc	gagctcgagt	caatcctgct	1440
ccagcaccctc	aacatthttg	acgcccggagt	ggcccgggtg	cccgatgacg	acgcccgggtg	1500
gctgccagcg	gccgtggtag	tcctcgaaca	tgggaaaaaca	atgaccgaaa	aggagatcgt	1560
ggactacgta	gcatcacaag	tgacgactgc	gaagaaactg	agggggaggg	tagtctttgt	1620
ggacgaggtc	ccgaaaggct	tgactgggaa	gcttgacgct	cgaaaaatcc	gggaaatcct	1680
gattaaggca	aagaaaaggc	ggaaaatcgc	tgctgataaa	gctgccttct	gcggggcttg	1740
ccttctggcc	atgcccttct	tctctccctt	gcacctgtac	ctcttgggtc	ttgaataaag	1800
cctgagtagg	aaggcggccg	ctcagacatg	catctaga			1838

- 5 <210> 3
- <211> 1796
- <212> ARN
- <213> Homo sapiens

10 <400> 3

gggaaaauaag	agagaaaaga	agaguuaagaa	gaaaauuaag	agccaccaug	gaagaugcga	60
agaacaucaa	gaagggaccu	gccccguuuu	acccuuugga	ggacgguaca	gcaggagaa	120
agcuccacaa	ggcgaugaaa	cgcuacgccc	uggucccccg	aacgauugcg	uuuaccgaug	180
cacauauuga	gguagacauc	acauacgcag	aauacuucga	aaugucggug	aggcuggcgg	240
aaagcgaugaa	gagauauggu	cuuaacacua	aucaccgcga	cguggugugu	ucggagaaacu	300
cauugcaguu	uuucaugccg	guccuuggag	cauuuucau	cggggucgca	gucgcgccag	360
caaacgacau	cuacaauag	cggaacucuc	ugaauagcau	gggaaucucc	cagccgacgg	420
ucguguuugu	cuccaaaaag	gggcucgaga	aaauccucaa	cgugcagaag	aagcucccca	480
uuauucaaaa	gaucaucauu	auggauagca	agacagauua	ccaagggguuc	cagucgaugu	540
auaccuuugu	gacaucgcau	uugccgcag	gguuaaacga	guaugacuuc	guccccagau	600
cauuugacag	agauaaaacc	aucgcgcuga	uuauugaauuc	cucggguagc	accgguuugc	660
caaaggggggu	ggcguugccc	caccgcacug	cuugugugcg	guucucgcac	gcuagggau	720
cuaucuuugg	uaaucagauc	auucccgaca	cagcaauccu	guccguggua	ccuuuucac	780
acgguuuugg	cauguuacag	acucucggcu	auuugaauug	cgguuucagg	gucguacuua	840
uguaucgguu	cgaggaagaa	cuguuuuuga	gaucuuugca	agauuacaag	auccagucgg	900
cccuccuugu	gccaacgcuu	uucucauucu	uugcgaaauc	gacacuuauu	gaaaguuug	960
accuuuccaa	ucugcaugag	auugccucag	ggggagcgcc	gcuuagcaag	gaagucgggg	1020
aggcaguggc	caagcgcuu	caccuucccg	gaauucggca	gggaaucggg	cucacggaga	1080
caacaucggc	gaucuuuau	acgcccagag	gugacgaa	gcccggagcc	gucggaaaag	1140
ugguucccuu	cuuugaagcc	aaggucguag	accucgacac	gggaaaaacc	cucggaguga	1200
accagagggg	cgagcucugc	gugagagggc	cgaugaucau	gucagguuac	gugaauaacc	1260
cugaagcgac	gaaugcgucg	aucgacaagg	augggugguu	gcauucggga	gacauugccu	1320
auugggauga	ggaugagcac	uucuuuauuc	uagaucgacu	uaagagcuug	aucaaaauca	1380
aaggcuaucg	gguagcgccu	gccgagcucg	agucuuuccu	gcuccagcac	cccaacauuu	1440
ucgacgcccg	agugcccggg	uugcccgaug	acgacgcccg	ugagcugcca	gcggccgugg	1500
uagucccga	acaugggaaa	acaugaccg	aaaaggagau	cguggacuac	guagcauac	1560
aagugacgac	ugcgaagaaa	cugaggggag	ggguagucuu	uguggacgag	guccccgaag	1620
gcuugacugg	gaagcuugac	gcucgcaaaa	uccgggaaau	ccugauuaag	gcaaagaaag	1680
gcgggaaaau	gcugucugca	uaagcugccu	ucugcggggc	uugccuucug	gccaugcccu	1740
ucuuucucucc	cuugcaccug	uaccuucugg	ucuuugaaua	aagccugagu	aggaag	1796

ES 2 911 677 T3

<210> 4
 <211> 854
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 4

```

    gggaaaauaag agagaaaaga agaguaaaga gaaaauuaag agccaccaug guauccaag 60
    gggaggagga caacauggcg aucaucaagg aguucaugcg auucaaggug cacauggaag 120
    guucggucuaa cggacacgaa uuugaaaucg aaggagaggg ugaaggagg ccuauugaag 180
    ggacacagac cgcgaaacuc aaggucacga aagggggacc acuuccuuc gccugggaca 240
    uucuuucgcc ccaguuuaug uacgggucga aagcauauu gaagcaucc gccgauauuc 300
    cugacuaucu gaaacucagc uuucccgagg gauucaagug ggagcggguc augaacuuug 360
    aggacggggg uguagucacc guaacccaag acucaagccu ccaagacggc gaguucucu 420
    acaaggucaa acugcggggg acuaacuuuc cgucggaug gccggugaug cagaagaaaa 480

    cgauuggaug ggaagcgua ucggagagga uguaccaga agauggugca uugaaggggg 540
    agaucaagca gagacugaag uugaaaagug ggggacauua ugaugccgag gugaaaacga 600
    caucaaaagc gaaaaagccg gugcagcuuc ccggagcgua uaaugugaau aucaaguug 660
    auauuacuuc acacaaugag gacuacaca uugucgaaca guacgaacgc gcugagggua 720
    gacacucgac gggaggcaug gacgaguugu acaaaugaua agcugccuuc ugcggggcuu 780
    gccuucuggc caugcccuuc uucucucuccu ugacccugua ccucuugguc uuugaaaaa 840
    gccugaguag gaag 854
    
```

10
 <210> 5
 <211> 725
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

    gggaaaauaag agagaaaaga agaguaaaga gaaaauuaag agccaccaug ggagugcag 60
    agugucccg cggguugugg uugcugcugu cgcucuugag ccucccacug ggacugccug 120
    ugcugggggc accaccaga uugaucugcg acucacgggu acuugagagg uaccuucug 180
    aagccaaaga agccgaaaac aucacaaccg gaugcgccga gcacugcucc cucaaugaga 240
    acuuuacugu accggauaca aaggucauu ucuaugcaug gaagagaau gaaguaggac 300
    agcaggccgu cgaagugugg caggggcucg cgcuuuuguc ggaggcggug uugcgggguc 360
    aggccuccu cgucaacuca ucacagccgu gggagcccu ccaacuucou gucgauaaag 420
    cggugucggg gcuccgagc uugacgacgu ugcuucgggc ucugggcca caaaaggagg 480
    cuuuuucgcc gccugacgag gccuccgagg caccucccg aacgaucacc gcggacacgu 540
    uuaggaagcu uuuuagagug uacagcauu uccuccgagg aaagcugaaa uuguauacug 600
    gugaaagcug uaggacaggg gaucgcugau aagcugccu cugcggggcu ugccuucug 660
    ccaugccuu cuucucucc uugcaccugu acccuuggu cuuugaaua agccugagua 720
    ggaag 725
    
```

20
 <210> 6
 <211> 1536
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

25
 <400> 6

ES 2 911 677 T3

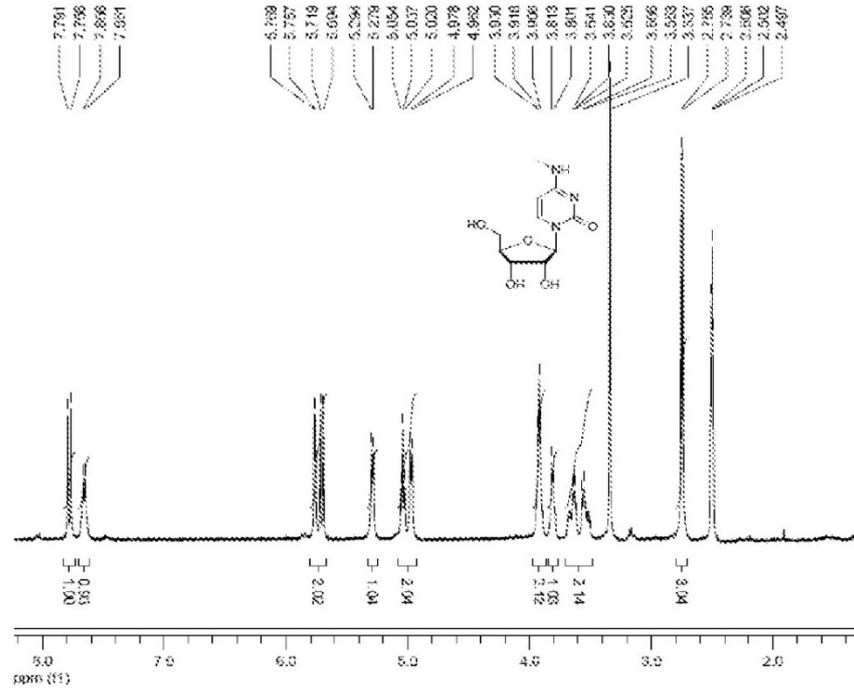
gggaaauaag	agagaaaaga	agaguaagaa	gaaauuaaag	agccaccaau	gcagcgcguc	60
aacaugauua	uggccgaauc	gccgggacuc	aucacaauuc	gccucuuggg	uuaucucuug	120
ucggcagaa	guaccguguu	cuuggaucac	gaaaacgcga	acaaaauucu	uaaucgcccg	180
aagcgguaa	acuccgggaa	acuugaggag	uuugugcagg	gcaaucuuga	acgagagugc	240
auggaggaga	aaugcuccuu	ugaggaggcg	agggaauguu	uugaaaacac	agagcgaaca	300
acggaguuuu	ggaagcaaua	cguagauggg	gaccagugug	agucgaaucc	gugccucaau	360
gggggaucuu	guaaagauga	caucaauagc	uaugaaugcu	ggugcccguu	uggguuugaa	420
gggaagaacu	gugagcugga	ugugacgugc	aacaucaaaa	acggacgcug	ugagcaguuu	480
uguaagaacu	cggcugacaa	uaagguagua	ugcucgugca	cagagggaau	ccggcuggcg	540
gagaaccaaa	aaucgugcga	gcccgcaguc	ccguuccuuu	gugggagggg	gagcguguca	600
cagacuagca	aguugacgag	agcggagacu	guauuccccc	acguggacua	cgucaacagc	660
accgaagccg	aaacaauccu	cgauaacauc	acgcagagca	cucaguccuu	caaugacuuu	720
acgagggucg	uaggugguga	ggacgcgaaa	cccggucagu	uccccuggca	ggugguauug	780
aacggaaaag	ucgaugccuu	uuguggaggu	uccauuguca	acgagaagug	gauugucaca	840
gcggcacacu	gcguagaaac	aggagugaaa	aucacgguag	uggcgggaga	gcauaacauu	900
gaagagacag	agcacacgga	acaaaagcga	aaugucauca	gaaucauucc	acaccauaac	960
uaaaacgcgg	caaucaauaa	guacaaucac	gacaucgcac	uuuuggagcu	ugacgaaccu	1020
uuggugcuua	auucguacgu	caccccuauu	uguauugccg	acaaagagua	uacaaacauc	1080
uucuugaaa	ucggcuccgg	guacguaucg	ggcuggggca	gaguguucca	uaaggguaa	1140
uccgcacugg	uguugcaaua	ccucagggug	ccccucgugg	aucgagccac	uugucugcgg	1200
uccaccaauu	ucacaaucua	caacaauaug	uucugugcgg	gauuccauga	aggugggaga	1260
gauagcugcc	agggagacuc	aggggguccc	cacgugacgg	aagucgaggg	gacgucuuuu	1320
cugacgggaa	uuaucucaug	gggagaggaa	ugugcgaua	aggggaaaua	uggcaucuc	1380
acuaaaagugu	cacgguaugu	caauuggauc	aaggaaaaga	cgaaacucac	gugaucagcc	1440
agcgcugccu	ucugcggggc	uugccuucug	gccaugcccu	ucuuucucc	cuugcaccug	1500
uaccucuugg	ucuuugaaua	aagccugagu	aggaag			1536

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de interés,
5 donde dicho polinucleótido aislado es un ARNm que comprende 1-metilpseudouridina,
donde el polinucleótido no comprende pseudouridina o 5-metil-citidina;
donde el polinucleótido exhibe una respuesta inmunitaria innata celular reducida cuando se introduce en una población
de células, en comparación con la respuesta inmunitaria innata celular inducida por un ácido nucleico no modificado
correspondiente.
- 10 2. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, que comprende además una cola de poli-A.
3. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1 o 2 que se purifica.
- 15 4. El polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende al menos una
estructura de tapa 5' seleccionada del grupo que consiste en Tapa 0, Tapa 1, ARCA, inosina, N1-metil-guanosina, 2'
-fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina.
- 20 5. El polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el ácido nucleico modificado
presenta una degradación reducida en una célula en la que se introduce el ácido nucleico, con respecto a un ácido
nucleico no modificado correspondiente.
- 25 6. El polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, donde la región poli-A tiene una
longitud de 150 a 165 nucleótidos.
7. El polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la uridina en el polinucleótido
se reemplaza a aproximadamente el 100 % con la 1-metilpseudouridina.
- 30 8. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido aislado de cualquiera de las
reivindicaciones 1-7, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. El polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica de la
reivindicación 8, para uso en terapia.
- 35 10. El polinucleótido aislado para su uso o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 9,
donde en dicho uso el ARNm se administra a un sujeto, donde el ARNm se traduce in vivo para producir un péptido
terapéutico en el sujeto.
- 40 11. El polinucleótido aislado para su uso o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 9
o 10, donde la terapia es un procedimiento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección en un
mamífero.
- 45 12. El polinucleótido aislado para su uso o composición farmacéutica para su uso de las reivindicaciones 9,
10 u 11, donde en el procedimiento los niveles del polipéptido de interés en el suero del mamífero son de al menos 50
pg/mL al menos dos horas después de la administración, o preferentemente permanecen por encima de 50 o más
preferentemente por encima de 60 pg/mL durante al menos 72 horas después de la administración.

Figura 1

A.



B.

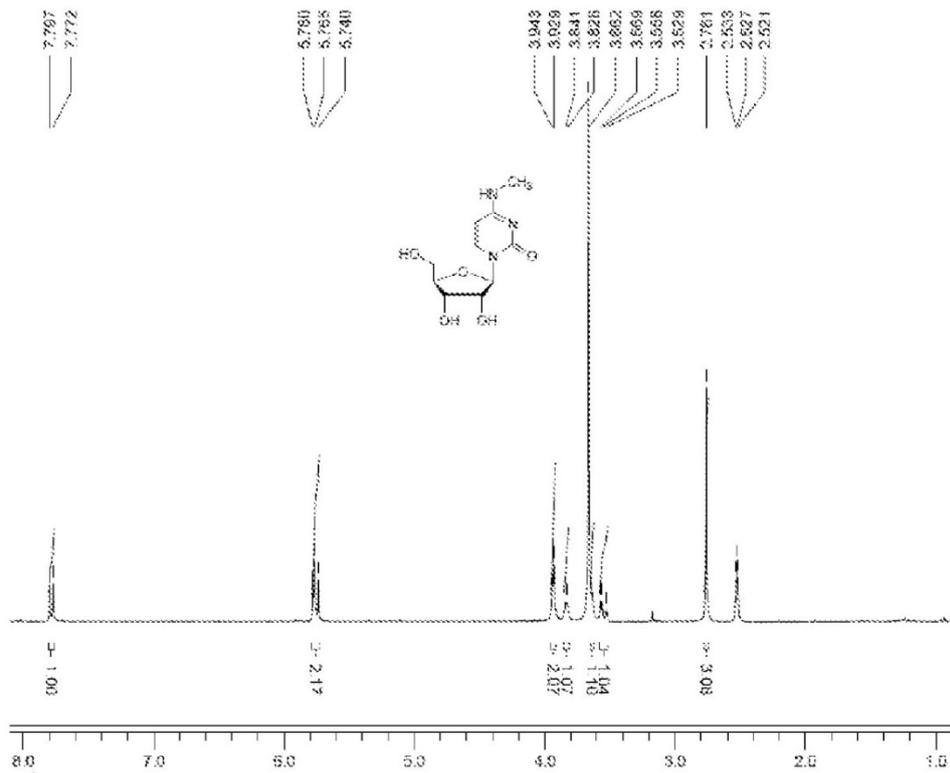
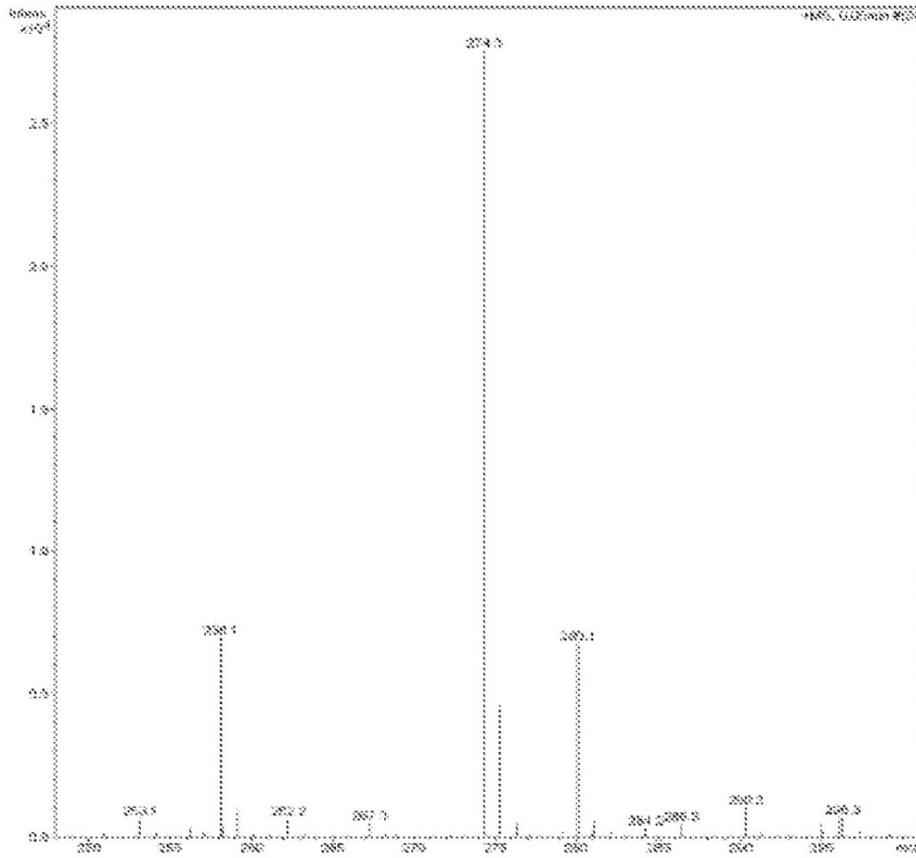
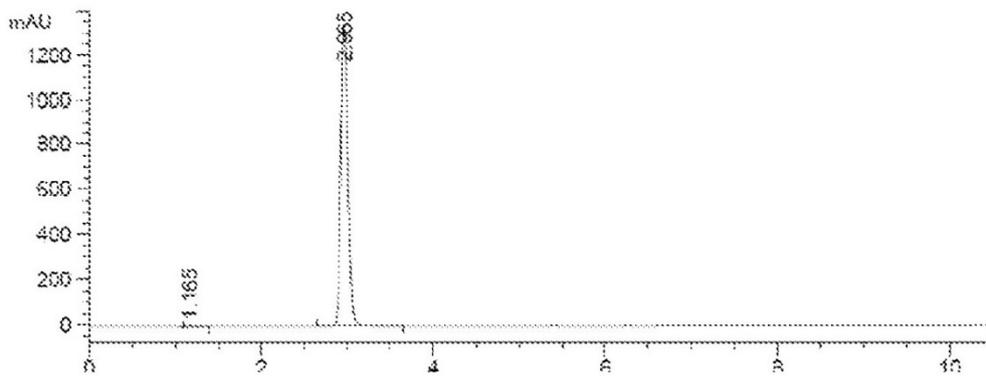


Figura 1 (continuación)

C.

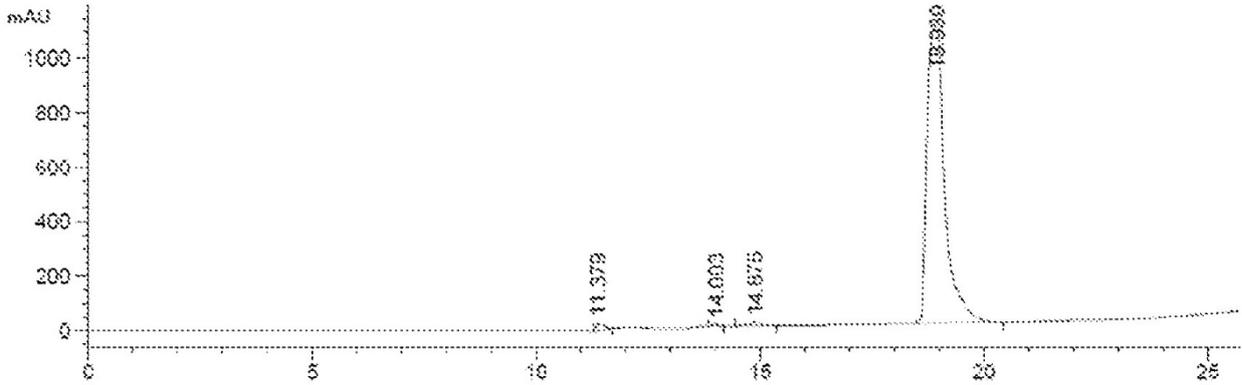


D.



Pico #	RetTime [min]	Tipo	Anchura [min]	Área mAU *s	Altura [mAU]	Área %
1	1,165	BB	0,0854	49,00038	7,90421	0,6403
2	2,965	BB	0,0880	7603,66650	1340,77930	99,3597

Figura 2



Pico #	RetTime [min]	Tipo	Anchura [min]	Área mAU *s	Altura [mAU]	Área %
1	11,379	BB	0,1425	300,16064	27,69099	0,9734
2	14,003	BB	0,1065	71,24556	10,35608	0,2311
3	14,875	BB	0,2088	222,77209	15,20542	0,7225
4	18,939	BB	0,3630	3,02414e4	1115,21118	98,0731
Total :				3,08355e4	1168,46368	

Figura 3

A.

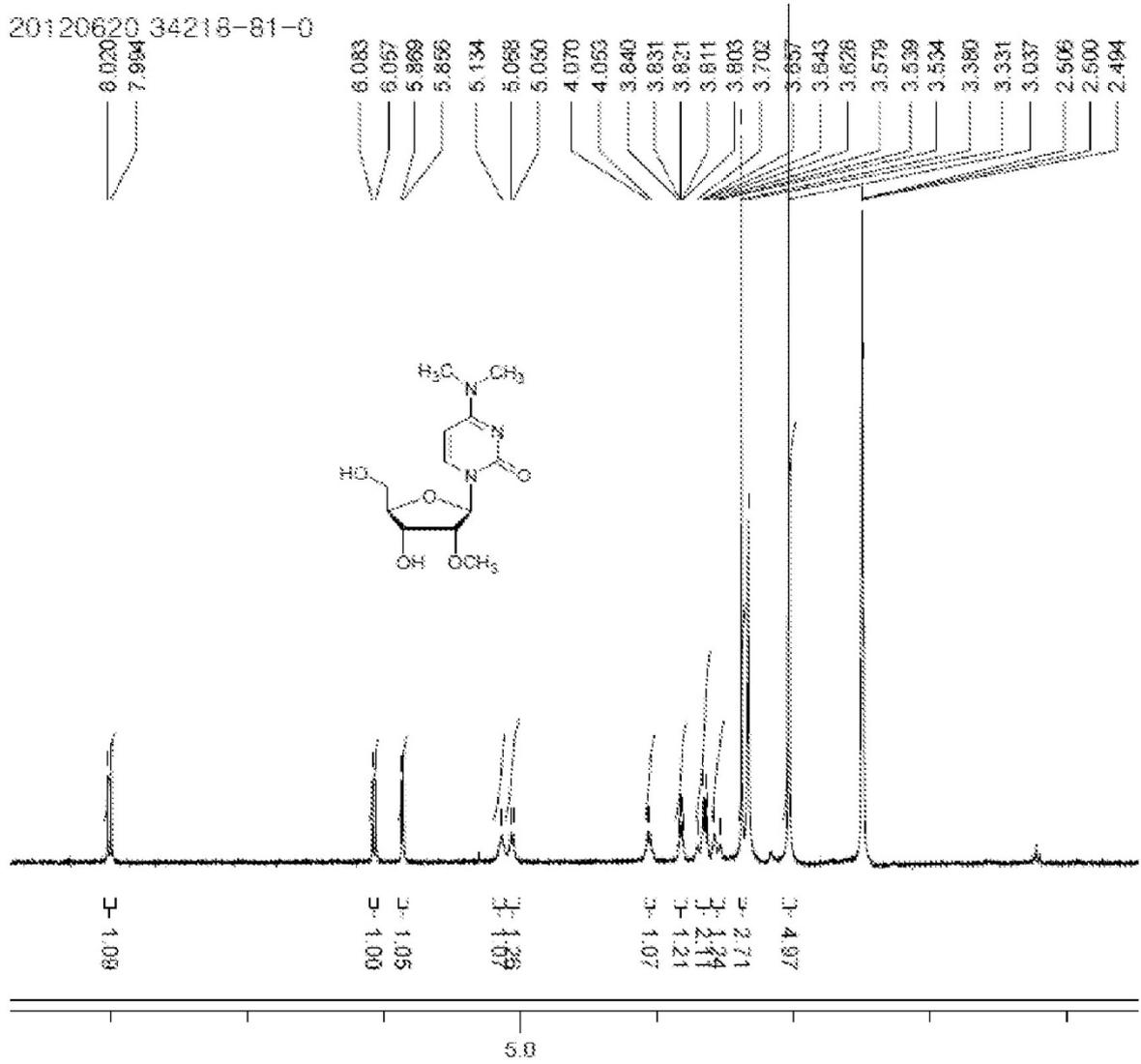
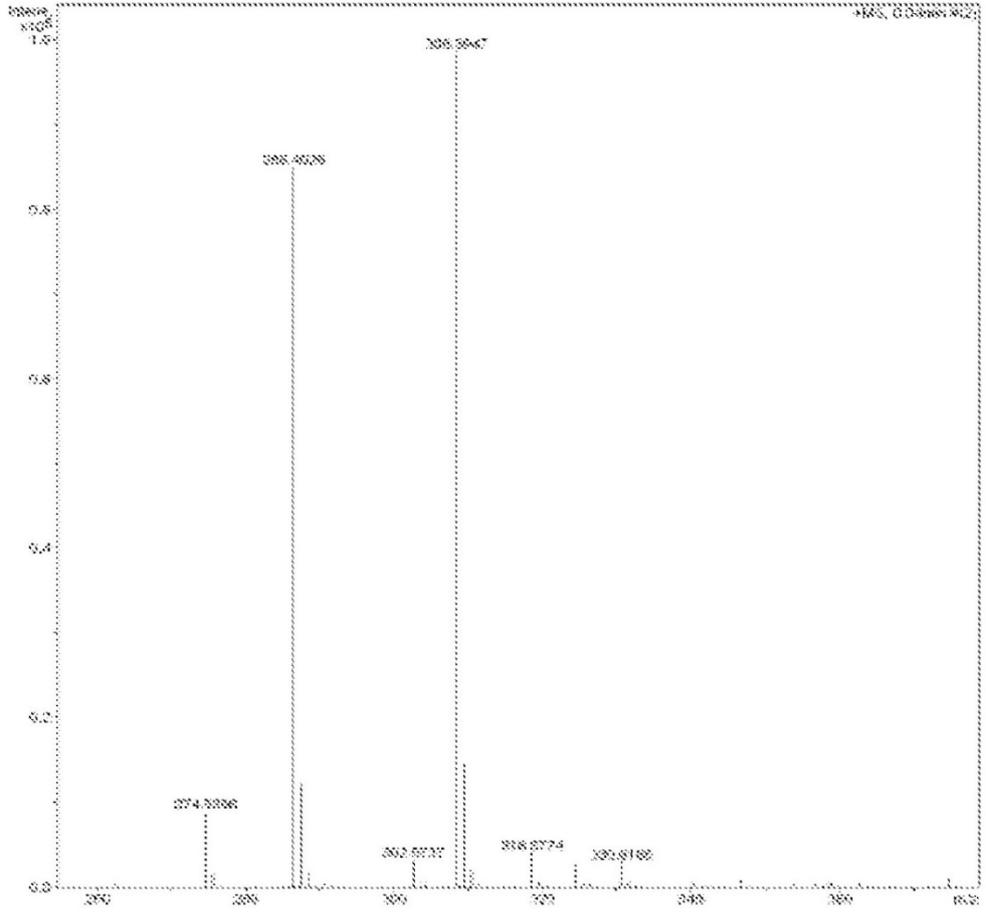
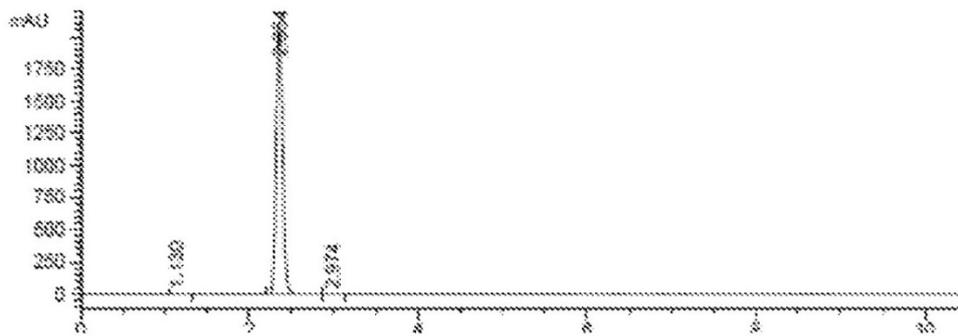


Figura 3 (continuación)

B.



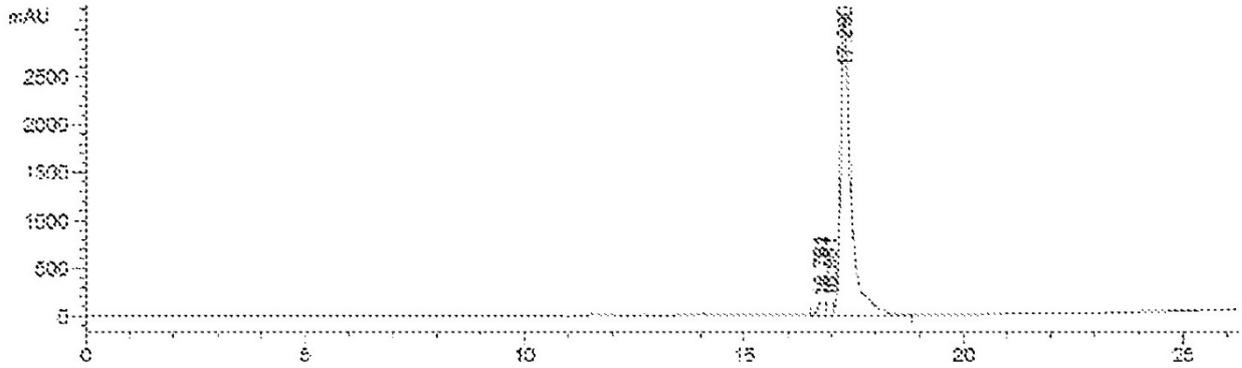
C.



Señal 1: VWD1 A, Longitud de onda=220 nm

Pico #	RetTime [min]	Tipo	Anchura [min]	Área mAU	Altura [mAU]	Área %
1	1,130	BB	0,0661	37,51406	8,03561	0,3578
2	2,354	BB	0,0768	1,04566E+4	2102,96633	99,4990
3	2,974	BB	0,0923	15,14040	2,56082	0,1441

Figura 4

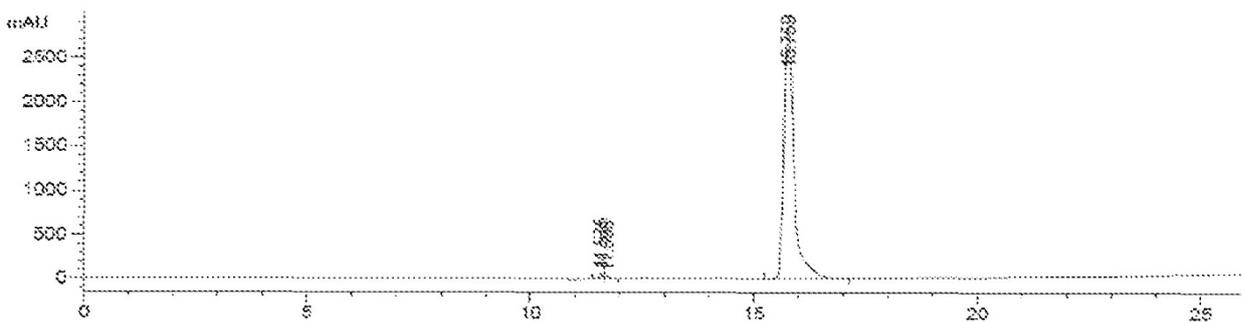


Señal 1: VWD1 Å, Longitud de onda=230 nm

Pico #	RetTime [min]	Tipo	Anchura [min]	Área mAU *s	Altura [mAU]	Área %
1	16,761	BV	0,1576	1363,03906	131,20972	2,5836
2	16,951	VV	0,1547	1289,82593	122,70110	2,4448
3	17,290	VB	0,2391	5,01047e4	3083,80176	94,9716

Total : 5,27575e4 3337,71257

Figura 5



Pico #	RetTime [min]	Tipo	Anchura [min]	Área mAU *s	Altura [mAU]	Área %
1	11,576	BV	0,0803	323,32678	57,39472	0,7124
2	11,698	VB	0,1234	239,96255	29,24231	0,5287
3	15,759	BE	0,2395	4,48198e4	2839,69604	98,7588

Total : 4,53831e4 2926,33308

Figura 6

A.

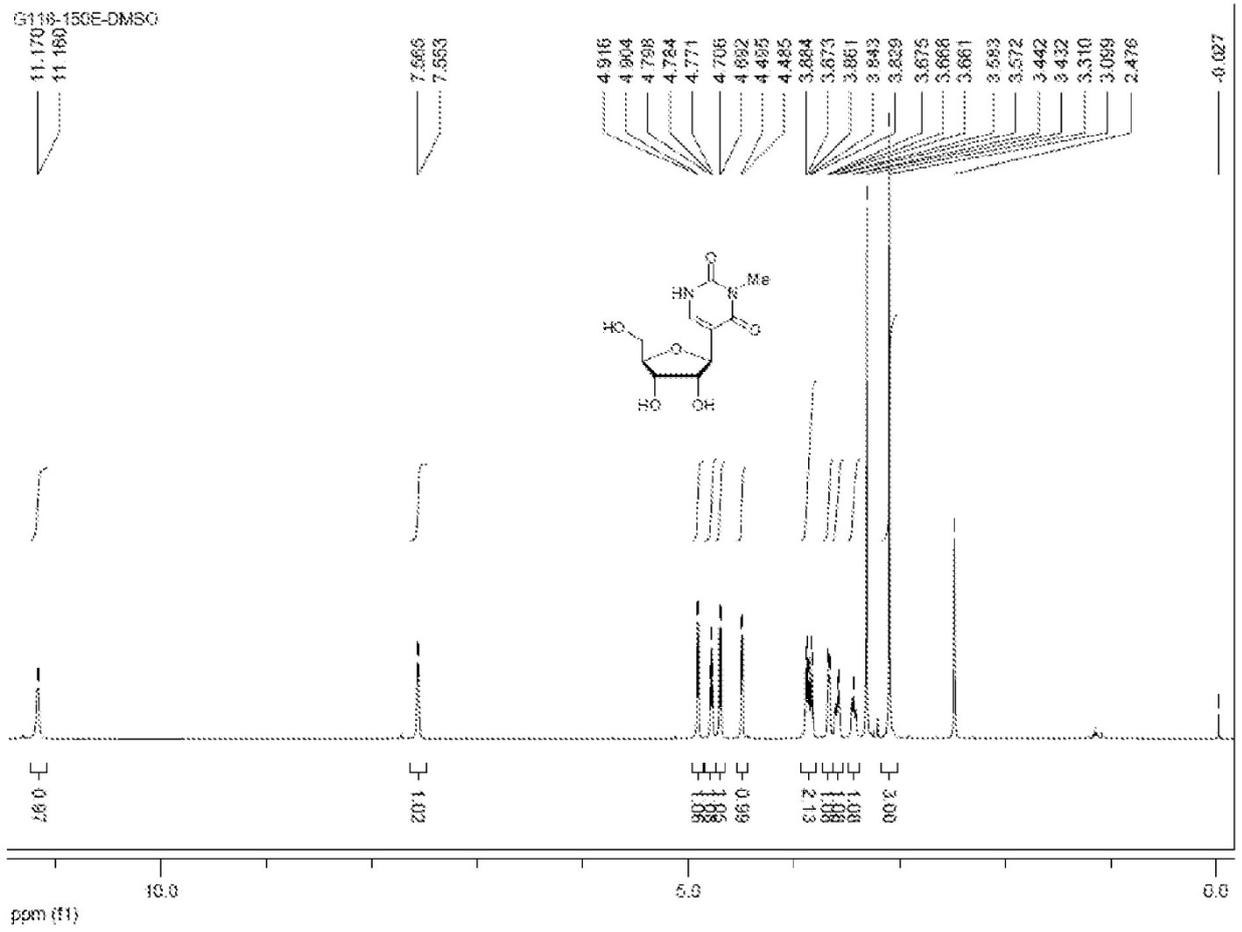
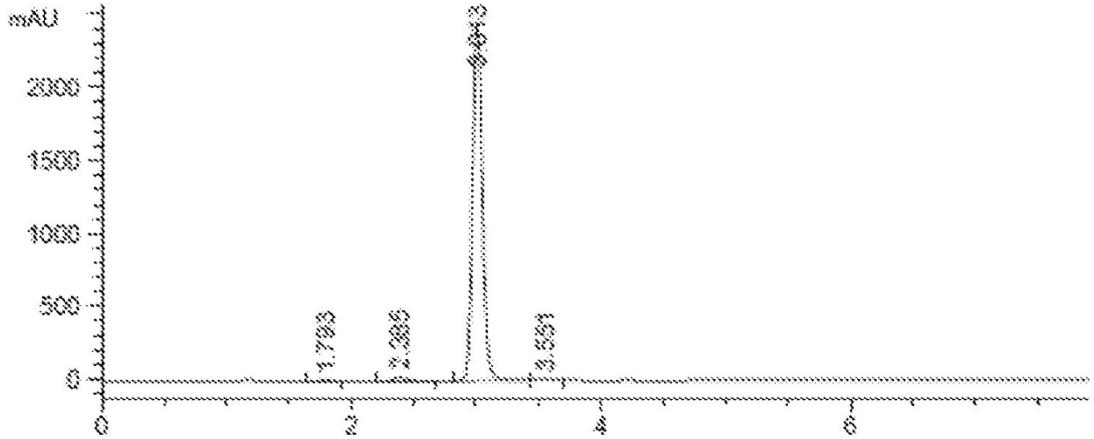


Figura 6 (continuación)

B.



Señal 1: VWD1 A, Longitud de onda=220 nm

Pico #	RetTime [min]	Tipo	Anchura [min]	Área mAU	Área %	Altura [mAU]	Área %
1	1,793	BB	0,0688	14,03317		3,01915	0,1029
2	2,385	BB	0,0754	123,02405		25,44092	0,8940
3	3,013	BB	0,0885	1,35581e4		2446,08813	98,5128
4	3,551	BB	0,0945	67,61845		11,21690	0,4913
Total :				1,37628e4		2485,86420	

Figura 7

A.

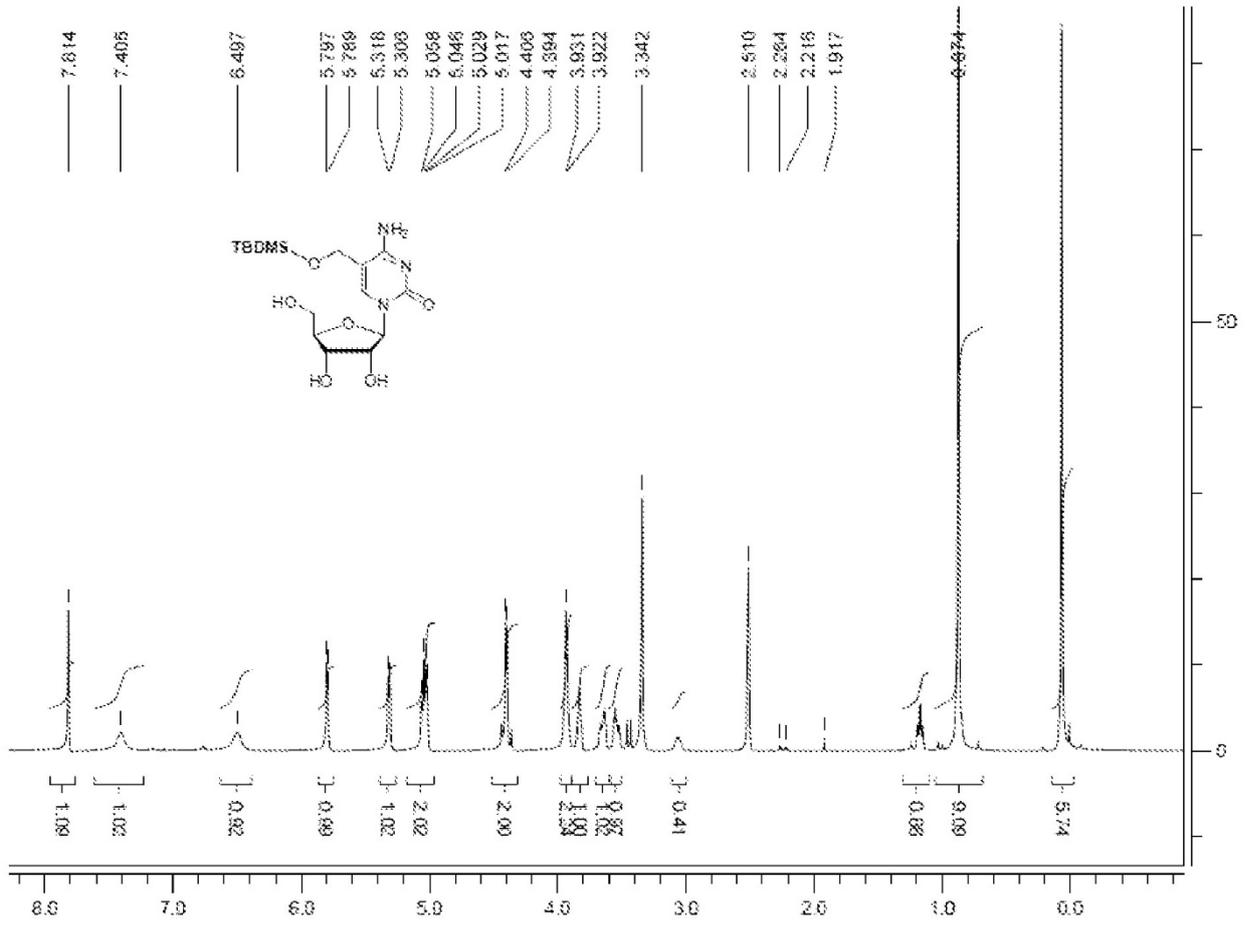
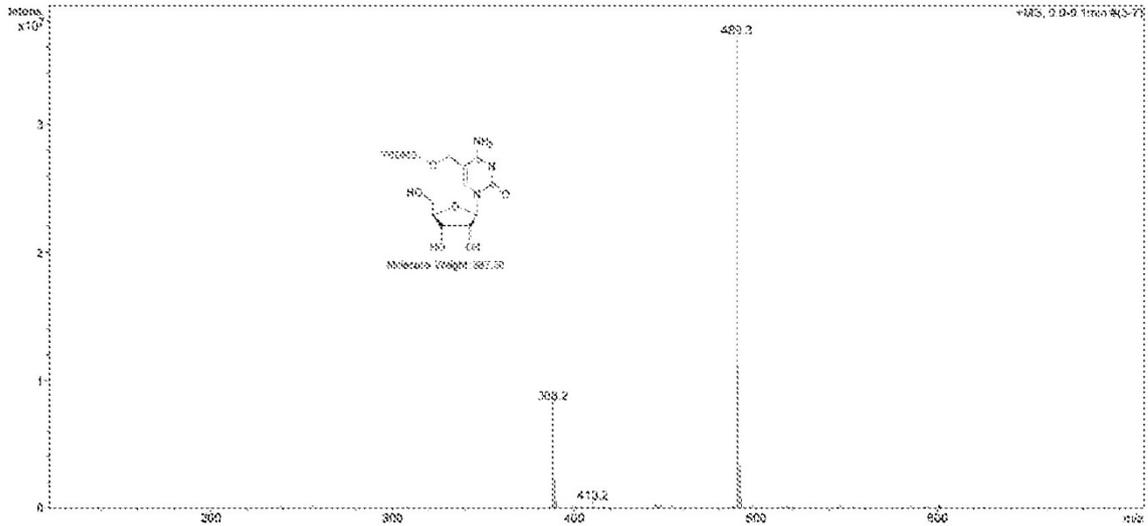
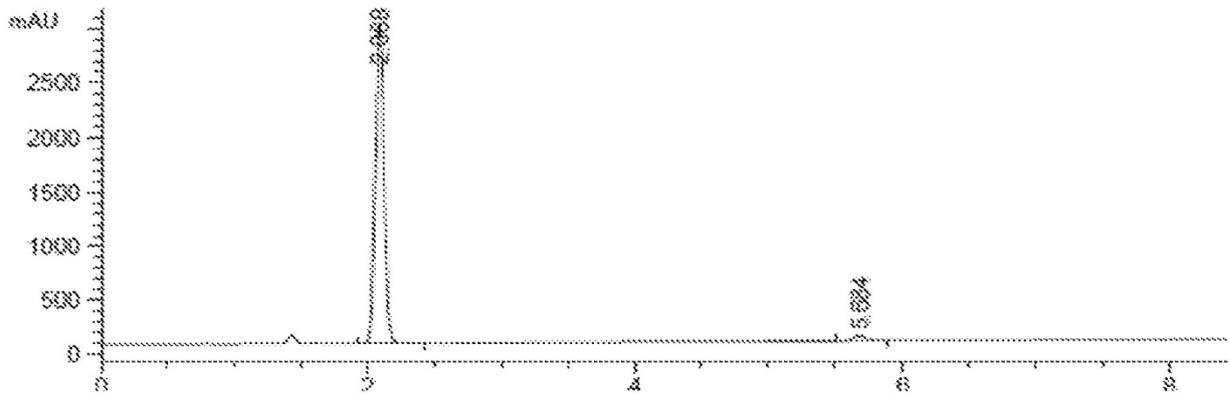


Figura 7 (continuación)

B.



C.



Señal 1: VWD1 A, Longitud de onda =220 nm

Pico #	RetTime [min]	Tipo	Anchura [min]	Área mAU	Área %	Altura [mAU]	Área %
1	2,088	BB	0,0704	1,366891e4		2942,27563	97,5729
2	5,684	BB	0,1060	331,75055		49,51453	2,4271
Total :				1,36689e4		2990,79016	

Figura 8

A.

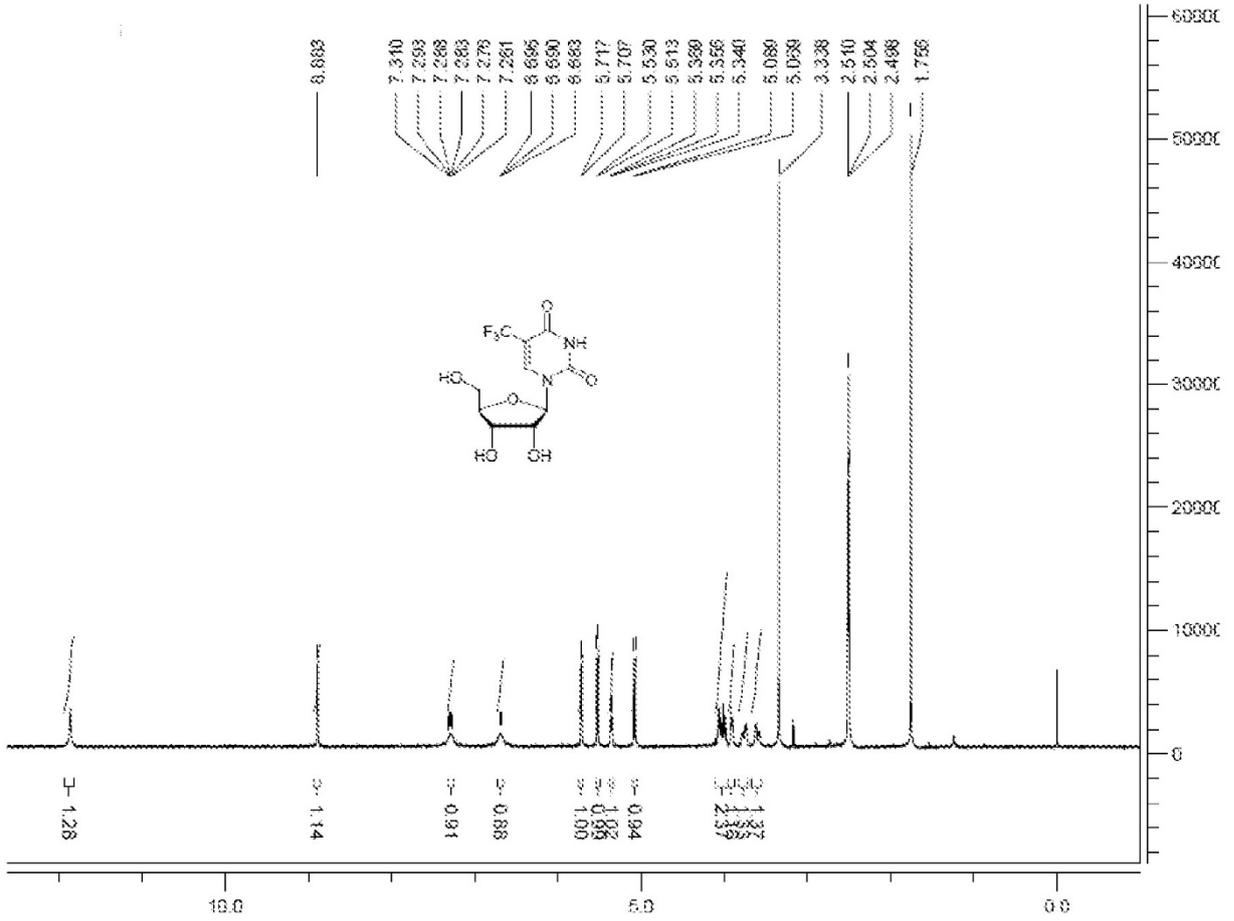
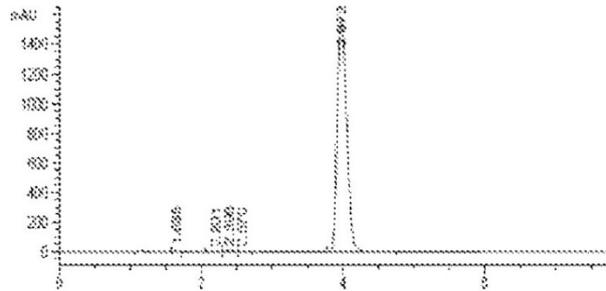


Figura 8 (continuación)

B.



Pico #	RetTime [min]	Tipo	Anchura [min]	Área mAU	Área %	Altura [mAU]	Área %
1	1,635	EE	0,0537	40,34452	12,01330	0,2667	
2	2,201	EV	0,0917	20,69230	3,38361	0,1368	
3	2,396	VV	0,1050	92,96643	14,01738	0,6145	
4	2,570	VB	0,0828	16,71805	3,85518	0,1105	
5	3,972	EE	0,1558	1,49571e4	1577,24438	98,8715	

Total : 1,51279e4 1609,71385

C.

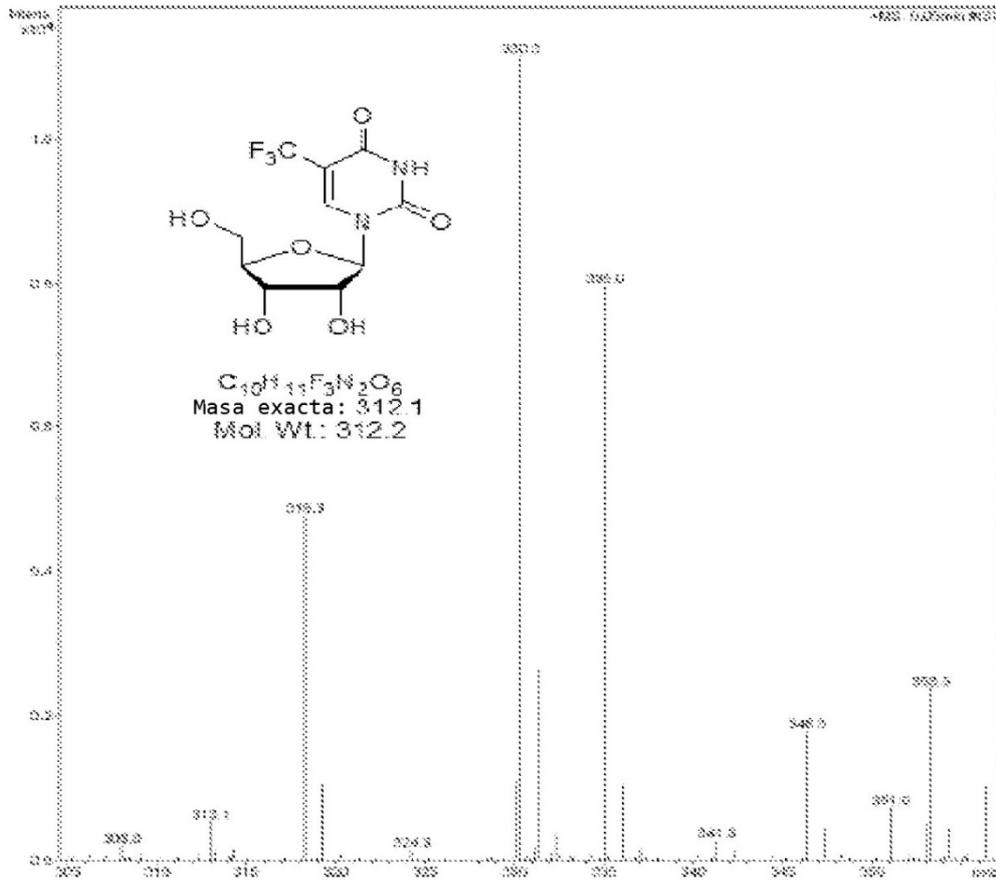


Figura 9

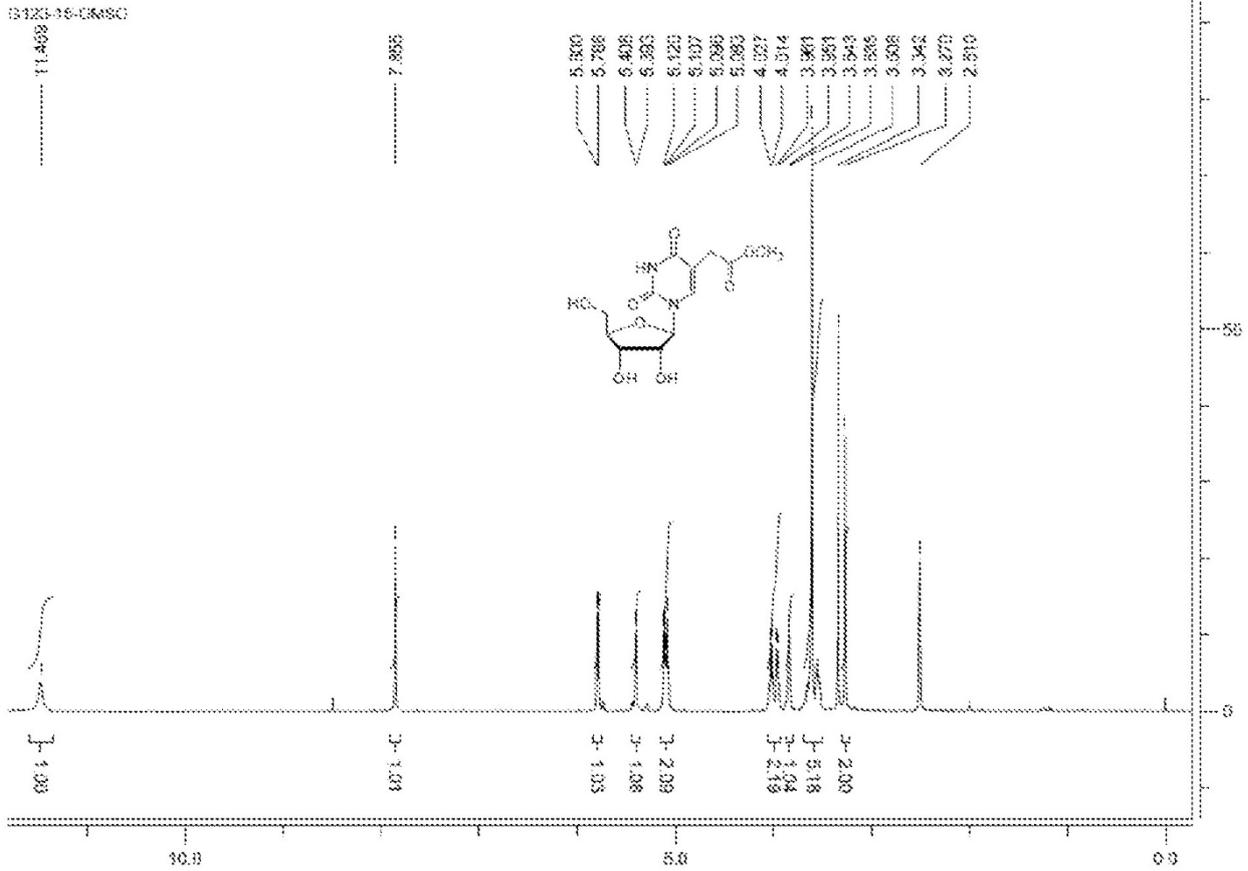


Figura 10

