

## **COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UN CONSTRUCTO DE ÁCIDO NUCLEICO Y SU USO MÉDICO**

### **5 Campo Técnico de la Invención**

La presente descripción se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas y, concretamente, a una composición farmacéutica que comprende un constructo de ácido nucleico y su uso médico.

### **10 Antecedentes de la Invención**

La terapia génica y la vacunación genética pueden proporcionar regímenes de tratamiento y prevención altamente específicos y personalizados para una variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades genéticas, enfermedades autoinmunes, cáncer o enfermedades relacionadas con tumores, enfermedades inflamatorias y similares.

15 Tanto el ADN como el ARN pueden usarse para la terapia génica o la vacunación genética. El ADN es estable y fácil de manipular; sin embargo, existe el riesgo de que se produzcan eventos mutagénicos (como la pérdida de función de un gen dañado) y similares causados por la inserción de fragmentos de ADN en el genoma del paciente. El ARN puede evitar la integración genómica indeseable, pero es susceptible de degradarse debido a las RNasas  
20 omnipresentes. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar la estabilidad del ARN para permitir que sus productos proteicos codificados se acumulen *in vivo* con el fin de lograr el tratamiento o la prevención de enfermedades, y mantener la integridad de la estructura y la función del ARN durante el almacenamiento y la administración. Se ha descubierto que las moléculas de ARNm eucariótico de origen natural contienen elementos estabilizadores, por ejemplo, las regiones no  
25 traducidas (UTR, por sus siglas en inglés) en los extremos 5' y 3', y otras características estructurales como una estructura de casquete 5' o una cola de poliadenilación 3'. Las UTR 5' y 3' son elementos del ARNm prematuro. Durante el procesamiento del ARNm, se añaden al ARNm transcrito (prematuro) características estructurales propias del ARNm maduro (como una caperuza 5' y una cola de poliadenilación 3'). En cuanto a la correlación entre las UTR y la  
30 estabilidad del ARNm, los estudios han demostrado que la UTR 3' del ARNm de la  $\alpha$ -globina es un factor importante para la estabilidad de dicho ARNm (Nancy D Rodgers et al., RNA. diciembre de 2002; 8(12):1526-37; Z Wang et al., Mol Cell Biol. julio de 1999; 19(7):4552-60.).

La enfermedad arterial periférica (PAD, por sus siglas en inglés) se refiere a una serie de  
síndromes sistémicos no coronarios causados por anomalías estructurales y funcionales de las  
35 arterias que irrigan las extremidades, los órganos internos y el cerebro, y se caracteriza por

estenosis, oclusión y lesiones aneurismáticas en la circulación sanguínea no coronaria, que afecta a la aorta y sus arterias ramificadas. En la PAD, la enfermedad isquémica de las extremidades inferiores es la más frecuente clínicamente; entre las causas principales se incluyen la aterosclerosis obliterante (ASO, por sus siglas en inglés), la arterioobliterante diabética (DAO, por sus siglas en inglés) y la angiitis trombótica obliterante (TAO, por sus siglas en inglés). La isquemia crítica de las extremidades (CLI, por sus siglas en inglés) pertenece a la fase avanzada del desarrollo de la ASO. La úlcera del pie diabético (DFU, por sus siglas en inglés) pertenece a un tipo de DAO. Ambas pertenecen a las enfermedades vasculares periféricas, y sus características patogénicas son el dolor en las extremidades inferiores, la ulceración y la necrosis causadas por la estenosis u oclusión vascular de las extremidades inferiores y la perfusión sanguínea distal insuficiente. En la actualidad, las medidas eficaces para el tratamiento de la CLI y la DFU son la revascularización mediante cirugía o intervención endovascular. Sin embargo, más del 40 % de los pacientes no cumplen los requisitos para la revascularización debido a la edad, complicaciones y otros factores similares, y solo pueden recibir tratamiento farmacológico conservador. El tratamiento farmacológico solo puede retrasar el proceso de la enfermedad y no puede curarla.

El factor de crecimiento hepatocitario (HGF, por sus siglas en inglés) es un factor de crecimiento multifuncional de origen mesenquimal. Cuando se une al receptor c-met de la superficie de la membrana celular, provoca la fosforilación de residuos de tirosina intracelulares, recluta proteínas adaptadoras, promueve la actividad de la cinasa y, posteriormente, activa las vías de señalización posteriores. El HGF es un importante factor regulador en procesos como el desarrollo embrionario, la regeneración de tejidos y órganos, la cicatrización de heridas y la angiogénesis. Puede promover la proliferación y migración de las células endoteliales y de las células del músculo liso. También promueve la reconstrucción de la red microvascular en la zona isquémica e inhibe la apoptosis. Los resultados de la investigación muestran que la administración mediante inyección intramuscular de plásmido desnudo hHGF-cDNA puede promover eficazmente la perfusión sanguínea en las extremidades posteriores isquémicas de modelos de rata y conejo (Y Taniyama et al. Angiogénesis terapéutica inducida por el gen del factor de crecimiento hepatocitario humano en modelos de isquemia de las extremidades posteriores de rata y conejo: estudio preclínico para el tratamiento de la enfermedad arterial periférica. *Gene Ther.* Febrero de 2001; 8(3):181-9). Los datos clínicos muestran que la inyección intramuscular de un plásmido desnudo en la pantorrilla puede promover la cicatrización de heridas en pacientes (S Cui et al. Seguridad clínica y eficacia preliminar del plásmido pUDK-HGF que expresa el factor de crecimiento de hepatocitos humano (HGF, por sus siglas en inglés) en pacientes con isquemia crítica de las extremidades. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* Octubre de 2015;

50(4):494-501). Sin embargo, la administración de fármacos mediante plásmidos desnudos presenta deficiencias, como una baja eficiencia de transfección *in vivo*, una elevada carga de dosificación, un alto riesgo de integración del ADN y unos elevados costes de tratamiento. Además, los datos clínicos muestran que no mejora el índice tobillo-brazo, la presión de oxígeno transcutánea ni la tasa de amputación. Por lo tanto, aún existe un amplio margen de mejora en este tipo de fármacos.

La presente descripción proporciona un ARNm de este tipo, que contiene UTR 5' y UTR 3' de una estructura novedosa. Esto reduce la degradación temprana del ARNm o estabiliza su degradación, pero sin perder, o más bien mejorando, la eficiencia de la traducción proteica. El ARNm tiene una mayor estabilidad y puede aplicarse en terapia génica y vacunación génica. Además, la presente descripción proporciona un ARNm capaz de expresar el factor de crecimiento de hepatocitos humanos (hHGF) y un sistema de administración mediante nanopartículas lipídicas (LNP) de éste. Esto permite lograr una transformación *in vivo* eficiente y rápida de la proteína hHGF exógena. Presenta las ventajas de no entrañar riesgo de integración y de facilitar la ampliación a escala industrial. Se trata de un régimen de tratamiento ideal en comparación con un plásmido desnudo, y puede usarse como fármaco de terapia génica para diversas enfermedades, como la CLI y la DFU.

### **Sumario de la Invención**

La presente descripción se refiere a una nanopartícula lipídica que comprende un constructo de ácido nucleico y una fase lipídica.

En algunas modalidades, la fase lipídica comprende al menos un lípido catiónico.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción se selecciona de entre un lípido de amina terciaria.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción comprende una amina terciaria, un enlazador de éster y una cola ramificada.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción comprende una amina terciaria, un enlazador de éster y al menos tres colas ramificadas.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción comprende una amina terciaria, un enlazador de éster y tres colas ramificadas.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción comprende una amina terciaria, un enlazador de éster y al menos cuatro colas ramificadas.

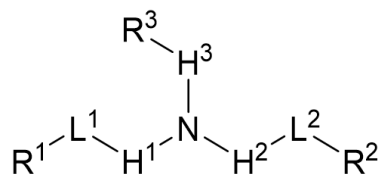
En algunas modalidades, la cola ramificada de la descripción puede ser una cola hidrofóbica saturada o insaturada que comprende de 6 a 20 átomos de carbono.

En algunas modalidades, la cola ramificada de la descripción puede ser una cola hidrofóbica

saturada que comprende de 6 a 20 átomos de carbono.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción comprende un extremo hidroxilo libre.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción es un compuesto representado  
5 por la Fórmula A,



A

en donde  $\text{L}^1$  y  $\text{L}^2$  se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})_x-$ ,  $-\text{S}-\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{S}-$ ,  $-\text{SC}(\text{O})-$ ,  $-\text{NR}^a \text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^a-$ ,  $-\text{NR}^a \text{C}(\text{O})\text{NR}^a-$ ,  $-\text{NR}^a \text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^a-$ , y un enlace, y  $\text{R}^a$  se selecciona del  
10 grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $\text{C}_{1-6}$  y alquenilo  $\text{C}_{2-6}$ ;

$\text{H}^1$  y  $\text{H}^2$  se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en heteroalquileo  $\text{C}_{1-12}$ , alquileo  $\text{C}_{1-12}$  y alquenileo  $\text{C}_{2-12}$ ;

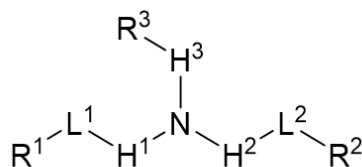
$\text{H}^3$  se selecciona del grupo que consiste en alquileo  $\text{C}_{1-24}$ , alquenileo  $\text{C}_{2-24}$ , cicloalquileo  $\text{C}_{3-8}$  y cicloalquenileo  $\text{C}_{3-8}$ ;

15  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en alquilo  $\text{C}_{1-24}$  y alquenilo  $\text{C}_{2-24}$ ;

$\text{R}^3$  se selecciona del grupo formado por hidrógeno,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^4$ ,  $-\text{OR}^5$  y  $-\text{NR}^5 \text{C}(\text{O})\text{R}^4$ , en donde  $\text{R}^4$  se selecciona del grupo que consiste en alquilo  $\text{C}_{1-6}$  y alquenilo  $\text{C}_{2-6}$ , y  $\text{R}^5$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo  $\text{C}_{1-6}$  y alquenilo  $\text{C}_{2-6}$ ;

20 x se selecciona del grupo que consiste en 0, 1 y 2.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción es un compuesto representado por la Fórmula A,



A

en donde  $\text{L}^1$  y  $\text{L}^2$  se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste  
25 en  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$  y  $-\text{O}-$ ;

$\text{H}^1$  y  $\text{H}^2$  se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en

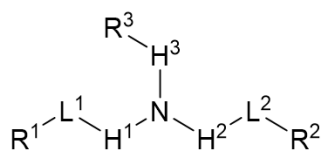
heteroalquileo C<sub>1-12</sub>, alquileo C<sub>1-12</sub> y alquileo C<sub>2-12</sub>;

H<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquileo C<sub>1-24</sub>, heteroalquileo C<sub>1-24</sub> y alquileo C<sub>2-24</sub>;

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en alquileo C<sub>1-24</sub> y alquileo C<sub>2-24</sub>;

R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -CN, -C(O)OR<sup>4</sup>, -OC(O)R<sup>4</sup>, -OR<sup>5</sup> y -NR<sup>5</sup>C(O)R<sup>4</sup>, en donde R<sup>4</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquileo C<sub>1-6</sub> y alquileo C<sub>2-6</sub>, y R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquileo C<sub>1-6</sub> y alquileo C<sub>2-6</sub>.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción es un compuesto representado por la Fórmula A,



A

en donde L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en -C(O)O- y -OC(O)-;

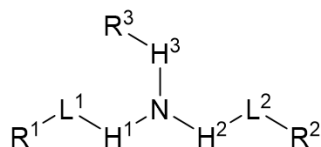
H<sup>1</sup> y H<sup>2</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en heteroalquileo C<sub>1-12</sub>, alquileo C<sub>1-12</sub> y alquileo C<sub>2-12</sub>;

H<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquileo C<sub>1-24</sub>, heteroalquileo C<sub>1-24</sub> y alquileo C<sub>2-24</sub>;

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en alquileo C<sub>1-24</sub> y alquileo C<sub>2-24</sub>;

R<sup>3</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, -CN, -C(O)OR<sup>4</sup>, -OC(O)R<sup>4</sup>, -OR<sup>5</sup> y -NR<sup>5</sup>C(O)R<sup>4</sup>, en donde R<sup>4</sup> se selecciona del grupo que consiste en alquileo C<sub>1-6</sub> y alquileo C<sub>2-6</sub>, y R<sup>5</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquileo C<sub>1-6</sub> y alquileo C<sub>2-6</sub>.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción es un compuesto representado por la Fórmula A,



A

en donde L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en -C(O)O- y -OC(O)-;

H<sup>1</sup> y H<sup>2</sup> se seleccionan cada uno de forma independiente del grupo que consiste en

heteroalquileo  $C_{1-12}$ , alquileo  $C_{1-12}$  y alquileo  $C_{2-12}$ ;

$H^3$  se selecciona del grupo que consiste en alquileo  $C_{1-24}$ , heteroalquileo  $C_{1-24}$  y alquileo  $C_{2-24}$ ;

$R^1$  y  $R^2$  se eligen, cada uno de forma independiente, del grupo formado por grupos alquilo con  $C_{1-24}$  y alquileo con  $C_{2-24}$ ;

$R^3$  se selecciona de  $-OR^5$ , y  $R^5$  se selecciona de hidrógeno.

En algunas modalidades, al menos uno de  $H^1$  y  $H^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste es un heteroalquileo, y el heteroalquileo comprende al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N y S.

En algunas modalidades,  $H^1$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se selecciona de entre heteroalquileo  $C_{1-12}$ , preferiblemente heteroalquileo  $C_{2-9}$ . En algunas modalidades, el heteroalquileo es un heteroalquileo que comprende al menos un átomo de oxígeno. En algunas modalidades, el heteroalquileo es un heteroalquileo que comprende dos átomos de oxígeno. En algunas modalidades, el heteroalquileo es un heteroalquileo que comprende al menos un átomo de nitrógeno. En algunas modalidades, el heteroalquileo es un heteroalquileo que comprende al menos un átomo de oxígeno.

En algunas modalidades, al menos uno de  $H^1$  y  $H^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste es un alquileo  $C_{1-9}$  o un alquileo  $C_{2-10}$ .

En algunas modalidades,  $H^3$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se selecciona de entre un alquileo  $C_{2-24}$ ; o  $H^3$  se selecciona de entre un alquileo  $C_{1-24}$ . En otras modalidades,  $H^3$  se selecciona de entre un heteroalquileo  $C_{1-24}$ .

En algunas modalidades,  $H^3$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se selecciona de entre alquileo  $C_{1-8}$ . En algunas modalidades,  $H^3$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se selecciona de entre alquileo  $C_{2-6}$ .

En algunas modalidades,  $L^1$  y  $L^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan de  $-C(O)O-$ .

En algunas modalidades,  $L^1$  y  $L^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan de entre  $-OC(O)-$ .

En algunas modalidades,  $R^1$  y  $R^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan, cada uno de forma independiente, entre grupos alquilo de  $C_{2-24}$  (incluidos, entre otros, los grupos alquilo de  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$  alquilo,  $C_8$  alquilo,  $C_9$  alquilo,  $C_{10}$  alquilo,  $C_{11}$  alquilo,  $C_{12}$  alquilo,  $C_{13}$  alquilo,  $C_{14}$  alquilo,  $C_{15}$  alquilo,  $C_{16}$  alquilo,  $C_{17}$  alquilo,  $C_{18}$  alquilo,  $C_{19}$  alquilo,  $C_{20}$  alquilo y  $C_{21}$  alquilo). En algunas otras modalidades,  $R^1$  y  $R^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan cada uno de forma independiente entre  $C_{4-18}$  alquilo.

En algunas modalidades,  $R^1$  y  $R^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan cada uno de forma independiente entre alquilo ramificado  $C_{4-18}$ .

En algunas modalidades,  $R^1$  y  $R^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan cada uno de forma independiente entre alquilo lineal  $C_{4-18}$ .

5 En algunas modalidades,  $R^1$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se selecciona de entre un grupo alquilo lineal de  $C_{4-18}$ , y  $R^2$  se selecciona de entre un grupo alquilo ramificado de  $C_{4-18}$ .

10 En algunas modalidades,  $R^1$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se selecciona de entre un grupo alquilo ramificado de  $C_{4-18}$ , y  $R^2$  se selecciona de entre un grupo alquilo ramificado de  $C_{4-18}$ .

En algunas modalidades,  $R^1$  y  $R^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan, cada uno de forma independiente, entre un grupo alqueno de  $C_{2-24}$  (incluidos, entre otros, un grupo alqueno de  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ ,  $C_7$  alqueno,  $C_8$  alqueno,  $C_9$  alqueno,  $C_{10}$  alqueno,  $C_{11}$  alqueno,  $C_{12}$  alqueno,  $C_{13}$  alqueno,  $C_{14}$  alqueno,  $C_{15}$  alqueno,  $C_{16}$  alqueno,  $C_{17}$  alqueno,  $C_{18}$  alqueno,  $C_{19}$  alqueno,  $C_{20}$  alqueno y  $C_{21}$  alqueno). En algunas otras modalidades,  $R^1$  y  $R^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan cada uno de forma independiente entre alquenos de  $C_{4-18}$ .

En algunas modalidades,  $R^1$  y  $R^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan cada uno de forma independiente entre alqueno ramificado  $C_{4-18}$ .

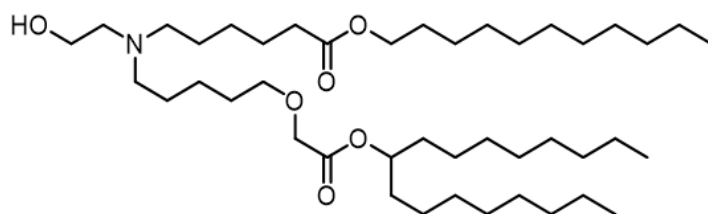
20 En algunas modalidades,  $R^1$  y  $R^2$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se seleccionan cada uno de forma independiente entre alqueno lineal  $C_{4-18}$ .

En algunas modalidades,  $R^1$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se selecciona de entre un grupo alqueno lineal de  $C_{4-18}$ , y  $R^2$  se selecciona de entre un grupo alqueno ramificado de  $C_{4-18}$ .

25 En algunas modalidades,  $R^1$  en el compuesto representado por la Fórmula A o una sal de éste se selecciona de entre un grupo alqueno ramificado de  $C_{4-18}$ , y  $R^2$  se selecciona de entre un grupo alqueno ramificado de  $C_{4-18}$ .

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción puede seleccionarse del grupo que consiste en el cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), el bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de 1,2-dioleoiltrimetilpropanoammonio (DOTAP) (también conocido como cloruro de N-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio y sal de cloruro de 1,2-dioleoiloxi-3-trimetilaminopropano), cloruro de N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleoiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-di-  
35  $\gamma$ -linoiloxi-N,N-dimetilaminopropano ( $\gamma$ -DLenDMA), 1,2-dilinoilcarbamoiloxi-3-

dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1.2-dilinoileloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1.2-dilinoileloxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1.2-dilinoileil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1.2-dilinoileiltiol-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoileil-2-linoileloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal cloruro de 1.2-dilinoileloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal cloruro de 1.2-dilinoileil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1.2-dilinoileloxi-3-(N-metilpiperazinil)propano (DLin-MPZ), o 3-(N,N-dilinoileilamino)-1.2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1.2-propanodiol (DOAP), 1.2-dilinoileloxi-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 2.2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1.3]-dioxolano (DLin-K-DMA) o análogos de los mismos, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2.2-di((9Z,12Z)-octadeca-9.12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1.3]dioxol-5-amina, (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6.9.28.31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (MC3), 1.1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanodiil)bisdodecan-2-ol (C12-200), 2.2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1.3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA), 2.2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1.3]-dioxolano (DLin-K-DMA), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6.9.28.31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (DLin-M-C3-DMA), 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6.9.28.31-tetraen-19-iloxi)-N,N-dimetilpropan-1-amina (MC3 Eter), 4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6.9.28.31-tetraen-19-iloxi)-N,N-dimetilbutan-1-amina (éter MC4), ((4-hidroxibutil)azanodiil)bis(hexano-6.1-diil)bis(2-hexildecanoato) (ALC-0315), éster 1-octilnonílico del ácido 8-[(2-hidroxietil)[6-oxo-6-(undeciloxi)hexil]amino]octanoico (SM-102), un compuesto representado por la Fórmula I, o cualquier combinación de los lípidos catiónicos anteriores.



I

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción es un compuesto representado por la Fórmula I.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción es ((4-hidroxibutil)azanodiil)bis(hexano-6.1-diil)bis(2-hexildecanoato) (ALC-0315).

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción es el éster 1-octilnonal del ácido 8-[(2-hidroxietil)[6-oxo-6-(undeciloxi)hexil]amino]octanoico (SM-102).

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa entre el 10 % y el 75 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, incluyendo,

entre otros, el 15 %, el 16 %, el 17 %, el 18 %, el 19 %, el 20 %, el 21 %, el 22 %, el 23 %, el 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, o un valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa entre el 15 % y el 49 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, incluyendo, entre otros, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, o un valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa entre el 20 % y el 70 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa entre el 30 % y el 70 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa entre el 20 % y el 60 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa entre el 30 % y el 60 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa entre el 42 % y el 49 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa el 45 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa el 46 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa el 47 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa el 48 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa el 49 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa entre el 5 % y el 40 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica, incluyendo, entre otros, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, o un valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, o un valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

En algunas modalidades, el lípido catiónico de la descripción representa entre el 40 % y el 70 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, incluyendo, entre otros, el 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, o un valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

En algunas modalidades, la fase lipídica de la descripción comprende al menos un lípido no catiónico de la serie de la .

En algunas modalidades, el lípido no catiónico de la descripción representa entre el 20 % y el 70 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, incluyendo, entre otros, el 20 %, el 21 %, el 22 %, el 23 %, el 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, o un valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico de la descripción representa entre el 50 % y el 65 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico de la descripción representa entre el 40 % y el 55 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico de la descripción representa entre el 55 % y el 62 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico de la descripción representa entre el 30 % y el 60 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico de la descripción representa entre el 30 % y el 50 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico de la descripción representa entre el 20 % y el 50 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico de la descripción representa entre el 20 % y el 40 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el lípido no catiónico de la descripción puede seleccionarse de una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de éste.

En algunas modalidades, el fosfolípido de la descripción puede seleccionarse del grupo que

consiste en 1.2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1.2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), 1.2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1.2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1.2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1.2-diundecanoil-sn-glicero-fosfocolina (DUPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1.2-di-O-octadecenil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0 Diether PC), 1-oleoil-2-colesterilhemisuccinoil-sn-glicero-3-fosfocolina (OChemPC), 1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfocolina (C16 Lyso PC), 1.2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1.2-diaracidoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1.2-didocosaheptanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1.2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1.2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (ME 16.0 PE), 1.2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1.2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1.2-dilinoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1.2-diaracidoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1.2-didocosaheptanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1.2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sal sódica (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), 1-estearoil-2-oleoil-estearoil-etanolamina (SOPE), 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (SOPC), esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina (LPE) y mezclas de los mismos.

En algunas modalidades, el fosfolípido de la descripción es 1.2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC).

En algunas modalidades, el fosfolípido de la descripción es 1.2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

En algunas modalidades, la relación en peso entre el fosfolípido y el lípido catiónico de la descripción es de 1:20 a 10:1; preferiblemente, la relación en peso entre el fosfolípido y el lípido catiónico es de 1:20 a 5:1; preferiblemente, la relación en peso entre el fosfolípido y el lípido catiónico es de 1:10 a 5:1; Más preferiblemente, la relación en peso entre el fosfolípido y el lípido catiónico es de 1:10 a 1:1.

En algunas modalidades, el contenido del fosfolípido de la descripción representa entre el 5 % y el 40 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, incluyendo, entre otros, el 5 %, el 6 %, el 7 %, el 8 %, el 9 %, el 10 %, el 11 %, el 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, o un valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

En algunas modalidades, el contenido del fosfolípido de la descripción representa entre el 5 % y el 20 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el contenido del fosfolípido de la descripción representa el 15 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el contenido del fosfolípido de la descripción representa el 20 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

5 En algunas modalidades, el contenido del fosfolípido de la descripción representa entre el 10 % y el 20 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el contenido del fosfolípido de la descripción representa el 10 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

10 En algunas modalidades, los derivados del colesterol incluyen, entre otros, sitosterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, tomatina y ácido ursólico.

En otro aspecto, el colesterol o sus derivados de la descripción presente representan entre el 20 % y el 60 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica, incluyendo, entre otros, el 20 %, el 21 %, el 22 %, el 23 %, el 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, o un valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

En algunas modalidades, el contenido de colesterol o de un derivado de éste de la descripción representa entre el 30 % y el 60 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

20 En algunas modalidades, el contenido de colesterol o de un derivado de éste de la descripción representa entre el 20 % y el 45 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el contenido de colesterol o de un derivado de éste de la descripción representa entre el 35 % y el 45 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el contenido de colesterol o de un derivado de éste de la descripción representa entre el 20 % y el 35 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

30 En algunas modalidades, el contenido de colesterol o de un derivado de éste de la descripción representa el 40.5 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el contenido de colesterol o de un derivado de éste de la descripción representa el 45 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

35 En algunas modalidades, la relación molar entre el colesterol o su derivado y el fosfolípido

de la descripción es de 1.0 a 5.0, incluyendo, pero sin limitarse a, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, o un valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

5 En algunas modalidades, la relación molar del colesterol o su derivado con respecto al fosfolípido en la nanopartícula lipídica de la descripción es de 2.0 a 5.0.

En otro aspecto, la fase lipídica de la descripción comprende además al menos un lípido conjugado; el lípido conjugado incluye, entre otros, una fosfatidiletanolamina modificada con PEG, un ácido fosfatídico modificado con PEG, una ceramida modificada con PEG, una  
10 dialquilamina modificada con PEG, un diacilglicerol modificado con PEG y un dialquiglicerol modificado con PEG.

En algunas modalidades, el lípido conjugado se selecciona del grupo que consiste en distearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol 2000 (DSPE-PEG2000), dimiristoilglicerol-3-metoxipolietilenglicol 2000 (DMG-PEG2000) y metoxipolietilenglicol ditetradecilacetamida (ALC-  
15 0159).

En algunas modalidades, el lípido conjugado se selecciona entre dimiristoilglicerol-3-metoxipolietilenglicol 2000.

En algunas modalidades, el lípido conjugado se selecciona de entre la distearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol 2000.

20 En algunas modalidades, el lípido conjugado actúa inhibiendo la agregación de las nanopartículas lipídicas (partículas).

En algunas modalidades, el contenido del lípido conjugado de la descripción representa entre el 0.5 % y el 4 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, incluyendo, pero sin limitarse a, 0.5 %, 0.6 %, 0.7 %, 0.8 %, 0.9 %, 1.0 %, 1.2 %, 1.4 %, 1.6 %, 1.8 %, 2.0 %, 2.2 %, 2.4 %, 2.6 %, 2.8 %, 3.0 %, 3.2 %, 3.4 %, 3.6 %, 3.8 %, 4.0 %, o un  
25 valor comprendido entre dos de los valores anteriores.

En algunas modalidades, el contenido del lípido conjugado de la descripción representa entre el 0.5 % y el 1.0 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

30 En algunas modalidades, el contenido del lípido conjugado de la descripción representa entre el 1.5 % y el 2.5 % de la cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el contenido del lípido conjugado de la descripción representa entre el 1 % y el 2 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula  
35 lipídica.

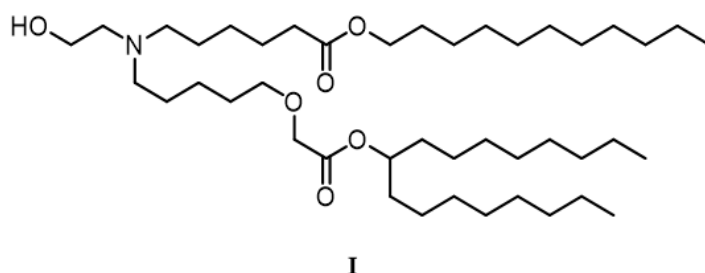
En algunas modalidades, el contenido del lípido conjugado de la descripción representa el 1.5 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, el contenido del lípido conjugado de la descripción representa el 2.0 % de la cantidad molar del total de lípidos presentes en la nanopartícula lipídica.

- 5 En algunas modalidades, la relación en peso entre el lípido conjugado y el lípido catiónico es de 1:100 a 1:1; preferiblemente, la relación en peso entre el lípido conjugado y el lípido catiónico es de 1:100 a 1:2; preferiblemente, la relación en peso entre el lípido conjugado y el lípido catiónico es de 1:50 a 1:1; Preferiblemente, la relación en peso entre el lípido conjugado y el lípido catiónico es de 1:50 a 1:2; preferiblemente, la relación en peso entre el lípido conjugado y el lípido catiónico es de 1:25 a 1:2; preferiblemente, la relación en peso entre el lípido conjugado y el lípido catiónico es de 1:20 a 1:2.

En algunas modalidades, la nanopartícula lipídica de la descripción comprende:

- a) un constructo de ácido nucleico;
- b) un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico comprende un compuesto representado por la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el lípido catiónico representa entre el 10 % y el 75 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica,



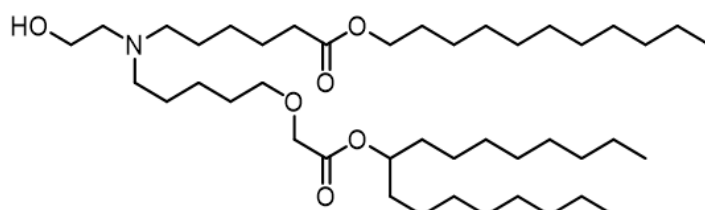
- c) un lípido no catiónico, en donde el lípido no catiónico se selecciona del grupo que consiste en un fosfolípido y colesterol o un derivado de éste, en donde el fosfolípido representa entre el 5 % y el 40 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, y el colesterol o derivado de éste representa entre el 15 % y el 60 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;

- y d) un lípido conjugado, en donde el conjugado representa entre el 0.5 % y el 2 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, la nanopartícula lipídica de la descripción comprende:

- a) un constructo de ácido nucleico;
- b) un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico comprende un compuesto representado por la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el lípido catiónico representa

entre el 20 % y el 70 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;



I

;

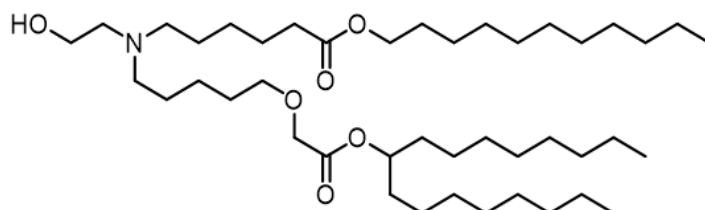
c) un lípido no catiónico, en donde el lípido no catiónico se selecciona del grupo que consiste en un fosfolípido y colesterol o un derivado de éste, en donde el fosfolípido representa entre el 5 % y el 40 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, y el colesterol o derivado de éste representa entre el 15 % y el 60 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;

y d) un lípido conjugado, en donde el conjugado representa entre el 0.5 % y el 2 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, la nanopartícula lipídica de la descripción comprende:

a) un constructo de ácido nucleico;

b) un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico comprende un compuesto representado por la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el lípido catiónico representa entre el 10 % y el 50 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;



I

;

c) un lípido no catiónico, en donde el lípido no catiónico se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos y colesterol o un derivado de éste, en donde el fosfolípido representa entre el 5 % y el 40 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, y el colesterol o derivado de éste representa entre el 30 % y el 60 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;

y d) un lípido conjugado, en donde el conjugado representa entre el 0.5 % y el 2 % de la

cantidad molar de los lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

En otro aspecto, en la formulación de nanopartículas de la descripción, el tamaño medio de partícula de la formulación de nanopartículas es de 10 nm a 200 nm.

En algunas modalidades, el tamaño medio de partícula de la formulación de nanopartículas es de 40 nm a 150 nm.

En algunas modalidades, el tamaño medio de partícula de la formulación de nanopartículas es de 40 nm a 140 nm.

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona una composición liofilizada que comprende la nanopartícula lipídica mencionada anteriormente.

En algunas modalidades, la formulación liofilizada de la descripción se obtiene mediante liofilización de la nanopartícula lipídica mencionada anteriormente o de la composición liofilizada mencionada anteriormente.

En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende la nanopartícula lipídica anterior y cloruro de sodio.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:10 a 10:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:10 a 5:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:5 a 10:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:5 a 5:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:3 a 5:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:2 a 5:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:2 a 4:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:5 a 3:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:3 a 3:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:3 a 2:1.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico

en la composición o formulación liofilizada de la descripción es de 1:2 a 2:1.

En otro aspecto, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende además al menos un lioprotector.

En algunas modalidades, el lioprotector es uno o más seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol y maltosa. Preferiblemente, el lioprotector se selecciona del grupo que consiste en sacarosa y una combinación de sacarosa y trehalosa.

En algunas modalidades, el lioprotector es la sacarosa.

En algunas modalidades, el lioprotector es una combinación de trehalosa y manitol;

En algunas modalidades, la relación en peso entre el lioprotector y el lípido catiónico es de 200:1 a 1:1; preferiblemente, la relación en peso entre el lioprotector y el lípido catiónico es de 150:1 a 1:1; preferiblemente, la relación en peso entre el lioprotector y el lípido catiónico es de 100:1 a 1:1; Preferiblemente, la relación en peso entre el lioprotector y el lípido catiónico es de 100:1 a 20:1; Preferiblemente, la relación en peso entre el lioprotector y el lípido catiónico es de 800:1 a 20:1; Preferiblemente, la relación en peso entre el lioprotector y el lípido catiónico es de 50:1 a 20:1.

En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende el lioprotector en una concentración del 5 % p/v al 20 % p/v, y preferiblemente el lioprotector en una concentración del 5 % p/v al 15 % p/v.

En algunas modalidades, la composición liofilizada de la descripción comprende sacarosa en una concentración del 5 % p/v al 20 % p/v, preferiblemente sacarosa en una concentración del 5 % p/v al 15 % p/v, preferiblemente sacarosa en una concentración del 5 % p/v al 10 % p/v, y preferiblemente sacarosa en una concentración del 8 % p/v.

En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende trehalosa en una concentración del 5 % p/v al 20 % p/v, y preferiblemente trehalosa en una concentración del 5 % p/v al 15 % p/v.

En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende sacarosa en una concentración del 5 % p/v al 10 % p/v y trehalosa en una concentración del 1 % p/v al 10 % p/v, y preferiblemente sacarosa en una concentración del 5 % p/v al 10 % p/v y trehalosa en una concentración del 2 % p/v al 8 % p/v.

En otro aspecto, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende además una solución reguladora.

En algunas modalidades, la solución reguladora se selecciona del grupo que consiste en ácido (N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-hidroxietilpiperazinaetanosulfónico (HEPES), tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido 4-morfolinoetanosulfónico (MES), un citrato y solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En algunas modalidades, la solución reguladora es TRIS.

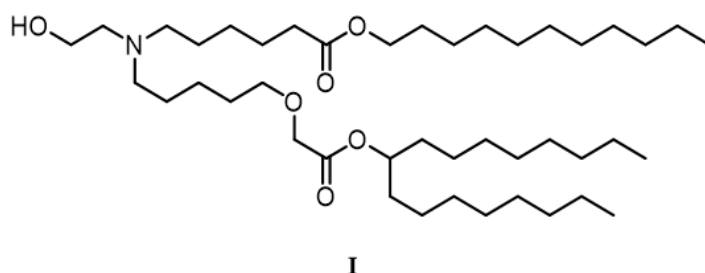
En algunas modalidades, la concentración de la solución reguladora es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM; preferiblemente, la concentración de la solución reguladora es de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 75 mM; más preferiblemente, la concentración de la solución reguladora es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM.

En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende:

i. un constructo de ácido nucleico;

ii. cloruro de sodio, en donde la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico es de 1:5 a 10:1;

iii. un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico comprende un compuesto representado por la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el lípido catiónico representa entre el 10 % y el 75 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica,



iv. un lípido no catiónico, en donde el lípido no catiónico se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos y colesterol o un derivado de éste, en donde el fosfolípido representa del 5 % al 40 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, y el colesterol o derivado de éste representa del 15 % al 60 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica; y

v. un lípido conjugado, en donde el conjugado representa entre el 0.5 % y el 2 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

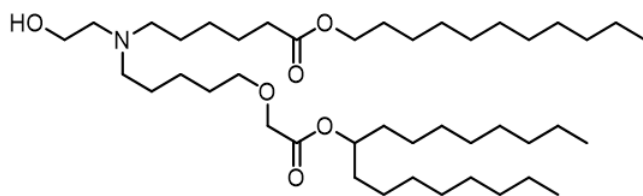
En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende:

i. un constructo de ácido nucleico;

ii. cloruro de sodio, en donde la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico es de 1:5 a 10:1;

iii. un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico comprende un compuesto representado

por la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el lípido catiónico representa entre el 20 % y el 70 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;



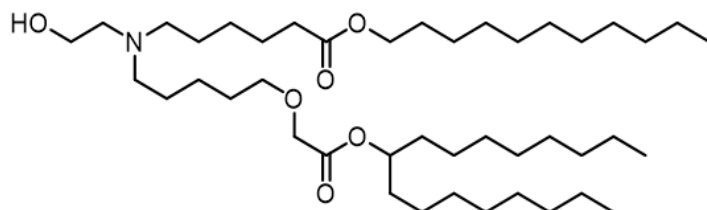
# I

•

- iv. un lípido no catiónico, en donde el lípido no catiónico se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos y colesterol o un derivado de éste, en donde el fosfolípido representa del 5 % al 40 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, y el colesterol o derivado de éste representa del 15 % al 60 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica; y
- v. un lípido conjugado, en donde el conjugado representa entre el 0.5 % y el 2 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende:

- 15            i. un constructo de ácido nucleico;
- ii. cloruro de sodio, en donde la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico es de 1:5 a 10:1;
- iii. un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico comprende un compuesto representado por la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el lípido catiónico representa entre el 10 % y el 50 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula
- 20    lipídica;



# I

•

- iv. un lípido no catiónico, en donde el lípido no catiónico se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos y colesterol o un derivado de éste, en donde el fosfolípido representa del 5 % al 40 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, y el colesterol

o derivado de éste representa del 30 % al 60 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica; y

v. un lípido conjugado, en donde el conjugado representa entre el 0.5 % y el 2 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

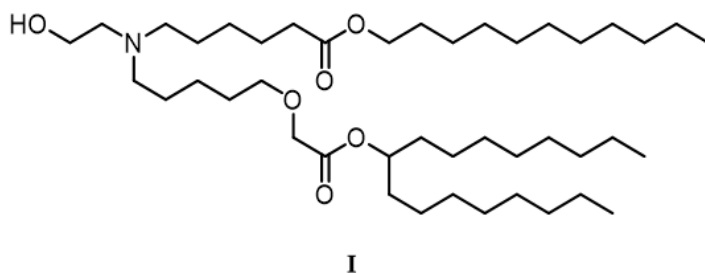
5 En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende:

1) cloruro de sodio, en donde la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico es de 1:5 a 10:1;

2) una nanopartícula lipídica, en donde la nanopartícula lipídica comprende:

10 un constructo de ácido nucleico;

un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico comprende un compuesto representado por la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el lípido catiónico representa entre el 10 % y el 75 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica,



15 un lípido no catiónico, en donde el lípido no catiónico se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos y colesterol o un derivado de éste, en donde el fosfolípido representa del 5 % al 40 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, y el colesterol o derivado de éste representa del 15 % al 60 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;

20 y un lípido conjugado, en donde el conjugado representa entre el 0.5 % y el 2 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica.

3) opcionalmente, un lioprotector, en donde la concentración del lioprotector es del 5 % p/v al 15 % p/v.

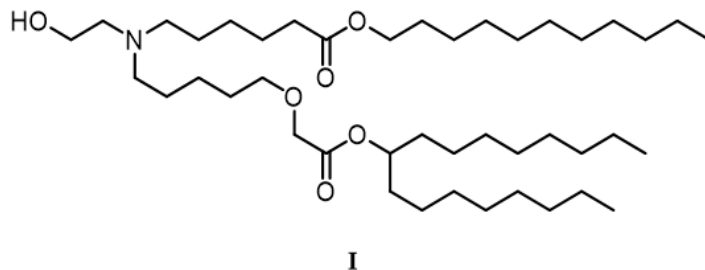
25 En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende:

1) cloruro de sodio, en donde la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico es de 1:5 a 10:1;

2) una nanopartícula lipídica, en donde la nanopartícula lipídica comprende:

un constructo de ácido nucleico;

un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico comprende un compuesto representado por la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el lípido catiónico representa entre el 20 % y el 70 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;



;

- 5 un lípido no catiónico, en donde el lípido no catiónico se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos y colesterol o un derivado de éste, en donde el fosfolípido representa entre el 5 % y el 40 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, y el colesterol o su derivado representa entre el 15 % y el 60 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;
- 10 y un lípido conjugado, en donde el conjugado representa entre el 0.5 % y el 2 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;

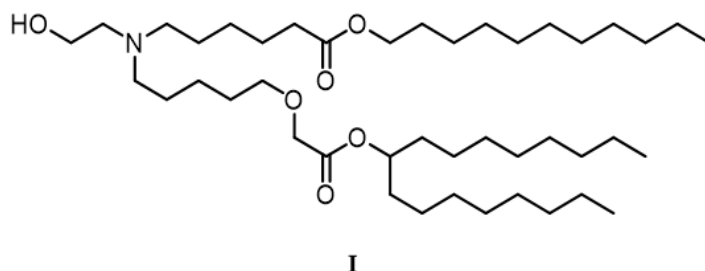
3) opcionalmente, un lioprotector, en donde la concentración del lioprotector es del 5 % p/v al 15 % p/v.

- 15 En algunas modalidades, la composición o formulación liofilizada de la descripción comprende:

1) cloruro de sodio, en donde la relación en peso entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico es de 1:5 a 10:1;

2) una nanopartícula lipídica, en donde la nanopartícula lipídica comprende:  
un constructo de ácido nucleico;

- 20 un lípido catiónico, en donde el lípido catiónico comprende un compuesto representado por la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y el lípido catiónico representa entre el 10 % y el 50 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;



;

un lípido no catiónico, en donde el lípido no catiónico se selecciona del grupo que consiste en fosfolípidos y colesterol o un derivado de éste, en donde el fosfolípido representa entre el 5 % y el 40 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica, y el colesterol o su derivado representa entre el 30 % y el 60 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;

y un lípido conjugado, en donde el conjugado representa entre el 0.5 % y el 2 % de la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica;

3) opcionalmente, un lioprotector, en donde la concentración del lioprotector es del 5 % p/v al 15 % p/v.

En algunas modalidades, la cantidad del agente activo en la composición o formulación liofilizada es de aproximadamente 0.01 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 0.05 mg/ml a aproximadamente 0.5 mg/ml, de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 0.5 mg/ml, o de aproximadamente 0.2 mg/ml, aproximadamente 0.05 mg/ml, o aproximadamente 0.02 mg/ml.

En algunas modalidades, la relación en peso entre el agente activo y el lípido catiónico es de 1:10 a 1:60; preferiblemente, la relación en peso entre el agente activo y el lípido catiónico es de 1:10 a 1:50; preferiblemente, la relación en peso entre el agente activo y el lípido catiónico es de 1:10 a 1:40.

En algunas modalidades, en cualquiera de las nanopartículas lipídicas o composiciones o formulaciones liofilizadas mencionadas anteriormente, la constructo de ácido nucleico comprende un ORF. En algunas modalidades, el ORF codifica el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés), un anticuerpo o un fragmento de este que se une al antígeno. En algunas modalidades específicas, el ORF codifica el factor de crecimiento de hepatocitos humano (HGF, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades específicas, el ORF codifica un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de este que se une al antígeno.

La presente descripción también proporciona un método para preparar una formulación liofilizada que comprende los siguientes pasos:

a. preparar una suspensión de la nanopartícula lipídica mencionada anteriormente en un medio líquido; y

b. ajustar el medio líquido para formar una suspensión que contenga NaCl;

c. liofilización.

En algunas modalidades, en el método de preparación de la descripción, el medio líquido comprende entre un 5 % p/v y un 20 % p/v de sacarosa, y preferiblemente entre un 5 % p/v y un 15 % p/v de sacarosa.

En algunas modalidades, en el método de preparación de la descripción, el medio líquido

comprende entre un 5 % p/v y un 10 % p/v de sacarosa y entre un 1 % p/v y un 10 % p/v de trehalosa.

En algunas modalidades, en el método de preparación de la descripción, el medio líquido comprende 10-200 mM de NaCl; preferiblemente de 10 a 150 mM de NaCl, más preferiblemente de 20 a 150 mM de NaCl, más preferiblemente de 20 a 120 mM de NaCl, más preferiblemente de 50 a 150 mM de NaCl, más preferiblemente de 50 a 120 mM de NaCl y, más preferiblemente, de 70 a 120 mM de NaCl.

La presente descripción también proporciona un método para reducir el tamaño medio de partícula de la nanopartícula lipídica en una composición liofilizada o una formulación liofilizada que comprende añadir o usar cloruro de sodio durante el proceso de liofilización.

La presente descripción también proporciona un método para reducir el tamaño medio de partícula de la nanopartícula lipídica tras la reconstitución de una composición liofilizada o una formulación liofilizada que comprende añadir o usar cloruro de sodio durante el proceso de liofilización.

La presente descripción también proporciona un uso del cloruro de sodio para reducir el tamaño medio de partícula de la nanopartícula lipídica en una composición liofilizada o una formulación liofilizada.

La presente descripción también proporciona un uso del cloruro de sodio para reducir el tamaño medio de partícula de la nanopartícula lipídica tras la reconstitución de una composición liofilizada o una formulación liofilizada, que comprende añadir o usar cloruro de sodio durante el proceso de liofilización.

En algunas modalidades, tras la reconstitución de la composición liofilizada o la formulación liofilizada de la descripción, el aumento del tamaño medio de partícula de la nanopartícula lipídica no supera el 100 %. En algunas modalidades, el aumento del tamaño medio de partícula de la nanopartícula lipídica no supera el 80 %. En algunas modalidades, el aumento del tamaño medio de partícula de la nanopartícula lipídica no supera el 60 %.

En algunas modalidades, en la composición liofilizada o la formulación liofilizada de la descripción, se comprueba la integridad del ARNm inmediatamente después de sacarlo del liofilizador, en donde la integridad del ARNm no es inferior al 75 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 80 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 85 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 86 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 87 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 88 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 89 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 90 %. La prueba inmediata se realiza en el plazo de 1 hora tras la extracción.

En algunas modalidades, en la composición liofilizada o la formulación liofilizada de la descripción, la integridad del ARNm se analiza tras haber sido mantenida a 37 °C durante 72

horas después de ser extraída del liofilizador, en donde la integridad del ARNm no es inferior al 75 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 80 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 85 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 86 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 87 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 88 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 89 %, o la integridad del ARNm no es inferior al 90 %.

La presente descripción proporciona una solución reconstituida obtenida mediante la reconstitución de la composición o formulación liofilizada mencionada anteriormente con un disolvente de reconstitución. En ciertas modalidades, la solución reconstituida se selecciona de entre, aunque sin limitarse a, el grupo que consiste en agua para inyección, solución salina fisiológica, solución de glucosa o el disolvente de reconstitución descrito a continuación.

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula lipídica y un disolvente de reconstitución.

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende la composición liofilizada y un disolvente de reconstitución.

En otro aspecto, la descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula lipídica, cloruro de sodio y un disolvente de reconstitución.

La presente descripción proporciona un método para preparar la composición farmacéutica mencionada anteriormente que comprende añadir o usar cloruro de sodio en la preparación de la composición liofilizada. La presente descripción proporciona un método para preparar la composición farmacéutica mencionada anteriormente que comprende un paso de reconstituir la composición o formulación liofilizada.

La presente descripción proporciona un método para preparar una solución reconstituida que comprende preparar la composición liofilizada mencionada anteriormente y someter la composición liofilizada a un tratamiento de liofilización para obtener la formulación liofilizada; y reconstituir la formulación liofilizada para obtener la solución reconstituida.

La presente descripción proporciona un método para preparar una formulación liofilizada que comprende preparar la composición liofilizada mencionada anteriormente y someter la composición liofilizada a un tratamiento de liofilización para obtener la formulación liofilizada.

En algunas modalidades, el disolvente de reconstitución de la descripción comprende un dispersante.

En algunas modalidades, el dispersante de la descripción puede seleccionarse del grupo que consiste en poloxámero, alcohol polivinílico, hidroxietilcelulosa, polietilenglicol, polisorbato, éster de ácido graso de polioxietileno, éster de ácido graso de sorbitán, éter de alcohol graso de polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno y N-alquilpirrolidona.

En algunas modalidades, el dispersante de la descripción puede seleccionarse del grupo

que consiste en poloxámero 188, alcohol polivinílico, hidroxietilcelulosa, polietilenglicol 400, polisorbato 20 (Tween 20), laurato de sorbitán (Span 20), monoestearato de polioxietileno (Myrj 45), éter laurílico de polioxietileno (Brij 35) y N-etilpirrolidona (NMP).

5 En algunas modalidades, el dispersante de la descripción puede seleccionarse entre el poloxámero 188.

En algunas modalidades, el porcentaje en peso del dispersante de la descripción con respecto al disolvente de reconstitución es del 0.01 al 5.0 %.

En algunas modalidades, el porcentaje en peso del dispersante de la descripción con respecto al disolvente de reconstitución es del 0.01 al 3.0 %.

10 En algunas modalidades, el porcentaje en peso del dispersante de la descripción con respecto al disolvente de reconstitución es del 0.05 al 3.0 %.

En algunas modalidades, el porcentaje en peso del dispersante de la descripción con respecto al disolvente de reconstitución es del 0.05 al 2.0 %.

15 En algunas modalidades, el porcentaje en peso del dispersante de la descripción con respecto al disolvente de reconstitución es del 0.05 al 1.0 %.

En algunas modalidades, el disolvente de reconstitución de la descripción comprende además un espesante.

20 En algunas modalidades, el espesante de la descripción puede seleccionarse del grupo que consiste en goma xantana (Xc), polivinilpirrolidona (PVP), hialuronato de sodio (HA), carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na) y quitosano (CTS).

En algunas modalidades, el espesante de la descripción puede seleccionarse del grupo que consiste en goma xantana (Xc), polivinilpirrolidona (PVP), hialuronato de sodio (HA) y carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na).

25 En algunas modalidades, la polivinilpirrolidona (PVP) de la descripción es polivinilpirrolidona K90 (PVP-K90).

En algunas modalidades, el porcentaje en peso del espesante de la descripción con respecto al disolvente de reconstitución es del 0.01 al 5.0 %.

En algunas modalidades, el porcentaje en peso del espesante de la descripción con respecto al disolvente de reconstitución es del 0.01 al 3.0 %.

30 En algunas modalidades, el porcentaje en peso del espesante de la descripción con respecto al disolvente de reconstitución es del 0.05 al 3.0 %.

En algunas modalidades, el porcentaje en peso del espesante de la descripción con respecto al disolvente de reconstitución es del 0.05 al 2.0 %.

35 La presente descripción también proporciona un artículo manufacturado que comprende un recipiente, el cual contiene la nanopartícula lipídica mencionada anteriormente, la composición

liofilizada mencionada anteriormente, la composición farmacéutica mencionada anteriormente o la solución reconstituida mencionada anteriormente.

La presente descripción también proporciona un artículo manufacturado que comprende:

- 1) la composición liofilizada o la formulación liofilizada mencionadas anteriormente; y
- 2) un disolvente de reconstitución.

La presente descripción también proporciona una formulación en aerosol que comprende la composición liofilizada, la formulación liofilizada o la solución reconstituida mencionadas anteriormente.

En ciertas modalidades, el artículo de fabricación comprende la composición liofilizada o la formulación y el disolvente de reconstitución en envases separados.

En ciertas modalidades, el envase es un vial tubular de inyección de vidrio de borosilicato neutro o un dispositivo para la administración por nebulización. En ciertas modalidades, el artículo de fabricación comprende un prospecto.

La nanopartícula lipídica mencionada anteriormente, la composición liofilizada mencionada anteriormente, la composición farmacéutica mencionada anteriormente o la solución reconstituida mencionada anteriormente, proporcionadas por la descripción, presentan una buena estabilidad, un aumento controlable del tamaño de las partículas y una excelente expresión del ARNm.

La presente descripción también proporciona la nanopartícula lipídica mencionada anteriormente, la composición liofilizada mencionada anteriormente, la composición farmacéutica mencionada anteriormente o la solución reconstituida mencionada anteriormente para su uso como medicamento para tratar o aliviar una enfermedad o un trastorno.

En algunas modalidades, cualquiera de las nanopartículas lipídicas mencionadas anteriormente comprende un constructo de ácido nucleico. El constructo de ácido nucleico comprende: al menos un elemento de ácido nucleico capaz de regular la expresión de un gen de interés, y el elemento de ácido nucleico es un UTR. Además, el constructo de ácido nucleico puede contener uno o más genes de interés, como el HGF.

#### Constructo de ácido nucleico

La presente descripción proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende:

- (a) un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés), y
- (b) un elemento de región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés).

En algunas modalidades, la constructo de ácido nucleico es una molécula de ADN; en otras, la constructo de ácido nucleico es una molécula de ARN (por ejemplo, ARNm).

En algunas modalidades, el ORF es una secuencia polinucleotídica que codifica un gen de interés.

En algunas modalidades, el gen de interés es heterólogo. En otras modalidades, el gen de interés es endógeno. En algunas modalidades, hay uno o más genes de interés (por ejemplo, 2, 3, 4).

En algunas modalidades, la UTR se deriva de la UTR del gen ACTG1, ATP6V0B, ATP6V0E1, CFL1, COX4I1, CTSB, FAM166A, NDUFB9, CHCHD10, SLC38A2, NDUFA11, NDUFV3, PRDX5, GUK1, IAH1, ABHD16A, SLC25A39, ATP1F1, ANAPC11, CCDC12, MRPL14 o APOA1BP. En algunas modalidades, los genes anteriores son genes humanos.

En algunas modalidades, el UTR es un elemento de la región no traducida 3' (3'UTR) o un elemento de la región no traducida 5' (5'UTR).

En algunas modalidades, el 3'UTR y el 5'UTR son de origen igual o diferente; por ejemplo, se derivan de genes iguales o diferentes. Por ejemplo, el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen ACTG1, y el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ACTG1. Por poner otro ejemplo, el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen CTSB, y el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen CHCHD10. En algunas modalidades, el 5'UTR y el 3'UTR se derivan de la misma especie o de especies diferentes.

En algunas modalidades, el 5'UTR se encuentra corriente arriba del ORF. En algunas modalidades, el 5'UTR en la constructo de ácido nucleico se encuentra en el extremo 5' del ORF. En algunas modalidades, el 3'UTR se encuentra corriente abajo del ORF. En algunas modalidades, el 3'UTR en la constructo de ácido nucleico se encuentra en el extremo 3' del ORF.

En algunas modalidades, la constructo de ácido nucleico mencionada anteriormente comprende:

(a) un marco de lectura abierto (ORF),

(b-1) un 3'UTR, en donde el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen ACTG1, ATP6V0B, ATP6V0E1, CFL1, COX4I1, CTSB, FAM166A o NDUFB9; y

(b-2) un 5'UTR, en donde el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ACTG1, ATP6V0B, ATP6V0E1, CFL1, COX4I1, CTSB, FAM166A, NDUFB9, CHCHD10, SLC38A2, NDUFA11, NDUFV3, PRDX5, GUK1, IAH1, ABHD16A, SLC25A39, ATP1F1, ANAPC11, CCDC12, MRPL14 o APOA1BP.

En algunas modalidades, la constructo de ácido nucleico mencionada anteriormente comprende:

(a) un marco de lectura abierto (ORF),

(b-1) un 3'UTR, en donde el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen CTSB, FAM166A o NDUFB9; y

(b-2) un 5'UTR, en donde el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ACTG1, CHCHD10 o NDUFA11.

En algunas modalidades, en el constructo de ácido nucleico mencionado anteriormente (por

ejemplo, una molécula de ADN o ARN), el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen ACTG1, que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 58, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen ATP6V0B que comprende una secuencia mostrada en  
5 SEQ ID NO: 2, 3 o SEQ ID NO: 59, 60, o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen ATP6V0E1 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, 5 o SEQ ID NO: 61, 62 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

10 el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen CFL1 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 6, 7, 8 o SEQ ID NO: 63, 64, 65 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen COX4I1 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9, 10, 11 o SEQ ID NO: 66, 67, 68 o una secuencia que tenga identidad con  
15 cualquiera de éstas;

el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen CTSB que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 69 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen FAM166A que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 70 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

20 o  
el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen NDUFB9 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas.

En algunas modalidades, en la constructo de ácido nucleico mencionada anteriormente (por ejemplo, una molécula de ADN o ARN), el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ACTG1 que  
25 comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 72, o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ATP6V0B que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16, 17 o SEQ ID NO: 73, 74 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

30 el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ATP6V0E1 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 18, 19 o SEQ ID NO: 75, 76 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen CFL1 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 20, 21, 22 o SEQ ID NO: 77, 78, 79 o una secuencia que tenga identidad con  
35 cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen COX4I1 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 23, 24, 25 o SEQ ID NO: 80, 81, 82 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

5 el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen CTSB, que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 83, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen FAM166A que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 84, o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

10 el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen NDUFB9 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 85 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen CHCHD10 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 29, 30 o SEQ ID NO: 86, 87 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

15 el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen SLC38A2 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 88 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen NDUFA11 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 89 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen NDUFV3 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 90 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

20 el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen PRDX5 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 34 o SEQ ID NO: 91;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen GUK1 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 35, 36, 37 o SEQ ID NO: 92, 93, 94 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

25 el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen IAH1 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 95 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ABHD16A que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 96 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

30 el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen SLC25A39 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 97 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ATP1F1 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 98 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

35 el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ANAPC11 que comprende una secuencia mostrada en

SEQ ID NO: 42, 43 o SEQ ID NO: 99, 100 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen CCDC12, que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 101, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas;

el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen MRPL14 que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 102, o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

o el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen APOA1BP que comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 46, 47 o SEQ ID NO: 103, 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas.

En algunas modalidades, se proporciona un constructo de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN o ARN), que comprende:

(a) un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés),

(b-1) un 3'UTR, y

(b-2) un 5'UTR;

en donde el 3'UTR y el 5'UTR se seleccionan de cualquiera de las siguientes combinaciones:

1) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 58 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

2) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 59 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

3) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 60 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

4) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 61 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

5) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 62 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia

mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

6) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 63 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

7) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 64 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

8) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 65, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o en cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas;

9) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 66 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

10) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 67 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

11) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 68 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

12) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 69 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

13) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 70, o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47, o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104, o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

14) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 71 o

una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 o cualquiera de las SEQ ID NO: 72 a 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

15) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14  
5 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 72 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

16) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14  
10 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 16 o el SEQ ID NO: 73 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

17) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14  
15 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 17 o el SEQ ID NO: 74 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

18) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14  
o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 18 o la SEQ ID NO: 75 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

19) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14  
20 o en cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 19 o en la SEQ ID NO: 76, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas;

20) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14  
25 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 20 o el SEQ ID NO: 77 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

21) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14  
30 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 21 o el SEQ ID NO: 78 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

22) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14  
35 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 22 o el SEQ ID NO: 79 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

23) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 80 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

5        24) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR de la comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 24 o el SEQ ID NO: 81 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

10       25) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 25 o el SEQ ID NO: 82 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

15       26) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 26 o el SEQ ID NO: 83 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

20       27) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 27 o la SEQ ID NO: 84 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

28) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 85 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

25       29) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 29 o la SEQ ID NO: 86 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

30       30) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o en cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 30 o en la SEQ ID NO: 87, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas;

35       31) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 31 o el SEQ ID NO:

88 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

32) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 32 o la SEQ ID NO: 89 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

33) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 33 o la SEQ ID NO: 90 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

34) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 34 o la SEQ ID NO: 91 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

35) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 35 o el SEQ ID NO: 92 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

36) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 36 o la SEQ ID NO: 93 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

37) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 37 o la SEQ ID NO: 94 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

38) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 38 o el SEQ ID NO: 95 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

39) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 39 o la SEQ ID NO: 96 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

40) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera

de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 40 o la SEQ ID NO: 97 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

41) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o en cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 41 o en la SEQ ID NO: 98, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas;

42) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 42 o el SEQ ID NO: 99 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

43) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 43 o la SEQ ID NO: 100 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

44) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 44 o el SEQ ID NO: 101 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

45) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 45 o el SEQ ID NO: 102 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

46) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 46 o el SEQ ID NO: 103 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas; o

47) el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 104 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas.

En algunas modalidades, se proporciona un constructo de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN o ARN), que comprende:

(a) un marco de lectura abierto (ORF),

(b-1) un 3'UTR, y

(b-2) un 5'UTR;

el 3'UTR se deriva del 3'UTR del gen CTSB, FAM166A o NDUFB9, y el 5'UTR se deriva del 5'UTR del gen ACTG1, CHCHD10 o NDUFA11;

por ejemplo, el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 12, 13, 14 o cualquiera de las SEQ ID NOs: 69, 70, 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 15, 29, 30, 32 o cualquiera de los SEQ ID NOs: 72, 86, 87, 89 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

por ejemplo, el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 12 o el SEQ ID NO: 69 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en el SEQ ID NO: 15 o el SEQ ID NO: 72 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 70 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 72 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 72 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 69, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 86, o una secuencia que presente identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 70, o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 86, o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 86 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 69 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 87 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 70 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 87 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

5 el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 87 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

10 el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 69 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 89 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas;

15 el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 70 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 89 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas; o

20 el 3'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 71 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas, y el 5'UTR comprende una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 89 o una secuencia que tenga identidad con cualquiera de éstas.

25 En las modalidades anteriores, "que tiene una identidad de..." abarca tener una identidad de al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % y el 100 %, así como un intervalo entre dos de los valores mencionados, incluyendo números enteros y decimales. Por ejemplo, "que tiene al menos un 90 % de identidad" o "que tiene al menos un 95 % de identidad".

30 En algunas modalidades, el 3'UTR y/o el 5'UTR es una variante del 3'UTR y/o del 5'UTR mencionados anteriormente; la variante es, por ejemplo, un truncamiento o un mutante de nucleótidos; la variante sigue conservando una actividad o función similar a la del 3'UTR y/o del 5'UTR mencionados anteriormente en la descripción; por ejemplo, conserva la función de regular la expresión de una proteína diana codificada por el ORF del gen de interés.

En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico mencionado anteriormente proporcionado por la descripción comprende además:

(c) una cola de poliadenilación (poli-A).

35 En algunas modalidades específicas, la cola poli-A en el constructo de ácido nucleico se encuentra corriente abajo del 3'UTR. En algunas modalidades específicas, la cola poli-A en el

constructo de ácido nucleico se encuentra en el extremo 3' del 3'UTR. En algunas modalidades específicas, la cola poli-A se encuentra en el extremo 3' del constructo de ácido nucleico. En algunas modalidades específicas, la longitud de la cola poli-A es de al menos unos 50, 100, 120, 150, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos.

5 En algunas modalidades específicas, la cola poli-A se selecciona del grupo que consiste en A120, A30L70, HGH poli-A, SV40 poli-A, BGH poli-A, rbGlob poli-A o SV40late poli-A. Por ejemplo, el A30L70 es una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 52; y el A120 comprende 120 nucleótidos de adenina.

10 En algunas modalidades, en la constructo de ácido nucleico antes mencionada proporcionada por la descripción, el gen de interés expresado (*es decir*, el marco de lectura abierto, ORF) es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste. Por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste que se une a un antígeno tumoral, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de éste que se une a un antígeno viral, y similares.

15 En algunas modalidades específicas, el polipéptido o la proteína codificados por el ORF es una proteína fluorescente o luciferasa, tal como una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 126.

En algunas modalidades específicas, el HGF es el factor de crecimiento de hepatocitos humano (hHGF).

20 En algunas modalidades específicas, la secuencia codificante de hHGF comprende cualquiera de las siguientes opciones 1) a 3):

1) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 109 o una secuencia de ácido nucleico con codones optimizados;

25 2) una secuencia de ADN mostrada en las SEQ ID N.º: 110 a 113 o una secuencia de ADN que tenga una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con las mismas;

3) una secuencia de ARN mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 128 a 131 o una secuencia de ARN que tenga una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con las mismas.

30 En algunas modalidades específicas, el constructo de ácido nucleico que expresa HGF como gen de interés comprende una secuencia mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 115, 116, 127 o una secuencia que tenga una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con las mismas.

En algunas modalidades específicas, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de éste es un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de éste.

35 En algunas modalidades específicas, la secuencia codificante del anticuerpo anti-PD-1 o del

fragmento de unión al antígeno de éste comprende cualquiera de las siguientes opciones 1) a 4):

1) una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico con codones optimizados que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 117, y una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico con codones optimizados que codifica una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 118;

2) una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico optimizada en cuanto a codones que codifica HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 117, y una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico optimizada en codones que codifica LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 118, en donde los CDR se definen según un sistema de numeración Kabat, IMGT, Chothia, AbM o Contact, por ejemplo, definidos según un sistema de numeración Kabat;

3) una secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 119 o una secuencia de ADN que tenga una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la misma, y una secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 120 o una secuencia de ADN que tenga una identidad de al menos un , 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con ella;

4) una secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 121 o una secuencia de ADN que tenga una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con la misma, y una secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 122 o una secuencia de ADN que tenga una identidad de al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % con ella.

En algunas modalidades específicas, el constructo de ácido nucleico que expresa el anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de éste comprende las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 124 y 125, o secuencias que tengan una identidad de al menos el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % con las SEQ ID NO: 124 y 125.

En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico mencionado anteriormente proporcionado por la descripción es ADN o ARN, por ejemplo, ARNm.

En algunas modalidades, en la dirección de 5' a 3', el constructo de ácido nucleico mencionado anteriormente (ADN o ARN) proporcionado por la descripción comprende cualquiera de los siguientes elementos 1) a 6):

1) un 5'UTR y un ORF;

- 2) un ORF y un 3'UTR;
- 3) un UTR 5', un ORF y un UTR 3';
- 4) un UTR 5', un ORF, un UTR 3' y una cola poli-A;
- 5) un UTR 5', un ORF y una cola poli-A;
- 5 6) un ORF, un 3'UTR y una cola poli-A;

el 5'UTR y el 3'UTR pueden derivarse de genes iguales o diferentes.

En algunas modalidades, en la dirección de 5' a 3', la constructo de ácido nucleico (ADN) mencionada anteriormente proporcionada por la descripción comprende cualquiera de los siguientes puntos 1) a 4):

- 10 1) un UTR 5' y un ORF;
- 2) un ORF y un 3'UTR;
- 3) un UTR 5', un ORF y un UTR 3';
- 4) un 5'UTR, un ORF, un 3'UTR y una cola poli-A;

El 5'UTR y el 3'UTR pueden proceder de genes iguales o diferentes.

- 15 En algunas modalidades específicas, el 5'UTR en 1), 3) y 4) comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 15 a 47. En algunas modalidades específicas, el ORF en 1) a 4) comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 110 o una secuencia de nucleótidos optimizada en cuanto a codones de la misma (por ejemplo, las SEQ ID NOs: 111 a 113). En algunas modalidades específicas, el ORF de 1) a
- 20 4) comprende o es las secuencias de nucleótidos mostradas en los SEQ ID NOs: 119 y 120. En algunas modalidades específicas, el 3'UTR de 2) a 4) comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 1 a 14.

En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico mencionado anteriormente (ARN o ARNm) proporcionado por la descripción comprende además:

- 25 (d) una estructura de casquete 5' (5'Cap).

- En algunas modalidades específicas, la estructura 5'Cap en la molécula de ARN se encuentra a un s corriente arriba de la 5'UTR. En algunas modalidades, la estructura 5'Cap en la molécula de ARN se encuentra en el extremo 5' de la 5'UTR. En algunas modalidades, la estructura de la tapa 5' es una estructura de tapa conocida por los expertos en la materia, como
- 30 Cap0 (metilación de la primera base nucleica, p. ej., m<sup>7</sup> GpppN), Cap1 (metilación adicional de la ribosa del nucleótido adyacente a m<sup>7</sup> GpppN, p. ej., m<sup>7</sup> G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG), Cap2 (metilación adicional de la ribosa del 3er. nucleótido corriente abajo de m<sup>7</sup> GpppN), Cap3 (metilación adicional de la ribosa del 3er. nucleótido corriente abajo de m<sup>7</sup> GpppN), Cap4 (metilación adicional de la ribosa del 4o. nucleótido corriente abajo de m<sup>7</sup> GpppN), ARCA
- 35 (análogo de la tapa antirreversa), ARCA modificado (p. ej., ARCA modificado con fosforotioato),

inosina, N1-metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-deaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina y 2-azido-guanosina.

En algunas modalidades específicas, se usa la síntesis química de ARN o la transcripción de ARN *in vitro* (capping cotranscripcional) para formar una estructura 5'Cap (como Cap0 o Cap1).

En algunas modalidades específicas, se usa una enzima de capping (por ejemplo, la enzima de capping del virus de la vacuna y/o la 2'-O-metiltransferasa dependiente de capping) mediante capping enzimático para formar una estructura de cap 5' (como Cap0 o Cap1). En algunas modalidades, se usa una enzima de capping inmovilizada para añadir una estructura de Cap 5' (Cap0 o Cap1). Los métodos y medios de capado descritos en WO2016/193226 se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades específicas, el 5'Cap se selecciona del grupo formado por ARCA, 3'-O-Me-m<sup>7</sup> G(5')ppp(5')G, m<sup>7</sup> G(5')ppp(5')(2'OMeA)pU, m<sup>7</sup> Gppp(A2'O-MOE)pG, m<sup>7</sup> G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, m<sup>7</sup> G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG, m<sup>7</sup> (3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeG)pG y m<sup>7</sup> (3'OMeG)(5')ppp(5')(2'OMeA)pG. En algunas modalidades específicas, el 5'Cap es 3'-O-Me-m<sup>7</sup> G(5')ppp(5')G o m<sup>7</sup> G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG.

En algunas modalidades, en la dirección de 5' a 3', el constructo de ácido nucleico (ARN o ARNm) proporcionado por la descripción comprende cualquiera de los siguientes 1) a 5):

- 1) un 5'UTR y un ORF;
  - 2) un ORF y un 3'UTR;
  - 3) un 5'UTR, un ORF y un 3'UTR;
  - 4) un 5'UTR, un ORF, un 3'UTR y una cola poli-A;
  - 5) una 5'Cap, un 5'UTR, un ORF, un 3'UTR y una cola poli-A;
- el 5'UTR y el 3'UTR pueden derivarse de genes iguales o diferentes.

En algunas modalidades específicas, el 5'UTR en 1), 3), 4) y 5) comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 72 a 104. En algunas modalidades específicas, el ORF en 1) a 5) comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 128 a 131. En algunas modalidades específicas, el 3'UTR en 2) a 5) comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71. En algunas modalidades específicas, las estructuras comprenden, entre otras, Cap0, Cap1 (por ejemplo, m<sup>7</sup> G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG), Cap2, Cap3, Cap4, ARCA.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un constructo de ácido nucleico (ADN) que comprende secuencialmente, en dirección de 5' a 3', una región 5'UTR, un ORF y una región 3'UTR, y que opcionalmente comprende además una cola poli-A en dirección 3'. En algunas modalidades, el 5'UTR comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada

en cualquiera de las SEQ ID NOs: 15 a 47, el ORF comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 110 o una secuencia de nucleótidos optimizada en cuanto a codones de la misma (por ejemplo, SEQ ID NOs: 111 a 113), el 3'UTR comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14. En algunas modalidades, el 5'UTR comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 15 a 47, el ORF comprende o es las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NOs: 119 y 120, el 3'UTR comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14. En algunas modalidades específicas, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en los SEQ ID NO: 115, 116 o 127.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un constructo de ácido nucleico (ARN o ARNm) que comprende secuencialmente, en dirección de 5' a 3', un 5'UTR, un ORF y un 3'UTR, y que opcionalmente comprende además una cola poli-A en dirección 3'. En algunas modalidades, el 5'UTR comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 72 a 104, el ORF comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 128 a 131, el 3'UTR comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 58 a 71, y la cola poli-A comprende o es 120 adenilatos consecutivos o una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 52. En algunas modalidades específicas, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 132.

En algunas modalidades, el 5'UTR comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 72 a 104, el ORF comprende o es las secuencias de nucleótidos mostradas en los SEQ ID NOs: 121 y 122, el 3'UTR comprende o es una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NOs: 58 a 71, y la cola poli-A comprende o es 120 adenilatos consecutivos o una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 52. En algunas modalidades específicas, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 124 o 125.

En algunas modalidades, en cualquiera de las construcciones de ácido nucleico mencionadas anteriormente (moléculas de ADN o ARN), el UTR se usa para aumentar el nivel de expresión de la proteína codificada por el ORF. A modo de ejemplo, en algunas modalidades específicas, en comparación con el 5'UTR mostrado en SEQ ID NO: 48 o 50, el 5'UTR mostrado en cualquiera de las SEQ ID NO: 15 a 47 y 72 a 104 de la descripción presenta un mayor nivel de expresión de la proteína diana expresada mediante la regulación del ORF. En algunas modalidades específicas, en comparación con el 5'UTR mostrado en SEQ ID NO: 49 o 51, el 3'UTR mostrado en cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 14, 58 a 71 de la descripción presenta un nivel de expresión aumentado de la proteína diana expresada mediante la regulación del ORF.

En algunas modalidades específicas, en comparación con la combinación del 5'UTR y el 3'UTR mostrados en las SEQ ID N.º: 48 y 49, la combinación del 5'UTR mostrado en cualquiera de las SEQ ID NOs: 15 a 47, 72 a 104 y el 3'UTR mostrado en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 14 y 58 a 71 de la descripción presenta un nivel de expresión aumentado de la proteína diana expresada mediante la regulación del ORF. En algunas modalidades específicas, en comparación con la combinación del 5'UTR y el 3'UTR mostrados en los SEQ ID NOs: 50 y 51, la combinación del 5'UTR mostrado en cualquiera de los SEQ ID NOs: 15 a 47 y 72 a 104 y el 3'UTR mostrado en cualquiera de los SEQ ID N.º: 1 a 14 y 58 a 71 de la descripción presenta un nivel de expresión aumentado de la proteína diana expresada mediante la regulación del ORF.

En algunas modalidades, el nivel de expresión de la proteína diana del constructo de ácido nucleico de la descripción es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 veces el del vector BioN, por ejemplo, aproximadamente 1 vez, aproximadamente 1.1 veces, aproximadamente 1.2 veces, aproximadamente 1.3 veces, aproximadamente 1.4 veces, aproximadamente 1.5 veces, aproximadamente 1.6 veces, aproximadamente 1.7 veces, aproximadamente 1.8 veces, aproximadamente 1.9 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2.1 veces, aproximadamente 2.3 veces, aproximadamente 2.5 veces, aproximadamente 2.8 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3.2 veces, aproximadamente 3.4 veces, aproximadamente 3.8 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4.5 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 5.2 veces, aproximadamente 5.5 veces, aproximadamente 5.8 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 12 veces, aproximadamente 15 veces, etc. En algunas modalidades específicas, el constructo de ácido nucleico de la descripción es una molécula de ARNm que expresa una proteína diana, y el nivel de expresión de la proteína diana de la molécula de ARNm es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 veces el del vector BioN. En algunas modalidades específicas, el vector BioN comprende un 5'UTR mostrado en SEQ ID NO: 50 o 107; y/o comprende un 3'UTR mostrado en SEQ ID NO: 51 o 108.

En algunas modalidades, el nivel de expresión de la proteína diana de la constructo de ácido nucleico de la descripción es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 veces el del vector Mod, por ejemplo, aproximadamente 1 vez, aproximadamente 1.1 veces, aproximadamente 1.2 veces, aproximadamente 1.3 veces, aproximadamente 1.4 veces, aproximadamente 1.5 veces, aproximadamente 1.6 veces, aproximadamente 1.7 veces, aproximadamente 1.8 veces, aproximadamente 1.9 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2.1 veces, aproximadamente 2.3 veces, aproximadamente 2.5 veces, aproximadamente 2.8 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3.2 veces, aproximadamente 3.4 veces,

aproximadamente 3.8 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4.5 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 5.2 veces, aproximadamente 5.5 veces, aproximadamente 5.8 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 12 veces, aproximadamente 15 veces, etc. En algunas modalidades específicas, el constructo de ácido nucleico de la descripción es una molécula de ARNm que expresa una proteína diana, y el nivel de expresión de la proteína diana de la molécula de ARNm es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 veces el del vector BioN. En algunas modalidades específicas, el vector Mod comprende un 5'UTR mostrado en SEQ ID NO: 48 o 105; y/o comprende un 3'UTR mostrado en SEQ ID NO: 49 o 106.

En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico de la descripción se administra a un sujeto, y la proteína diana (por ejemplo, la proteína hHGF) se expresa tras aproximadamente 0.5 a 1.5 h. En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico de la descripción se administra a un sujeto y alcanza un pico de expresión entre aproximadamente 2 h y 10 h (por ejemplo, aproximadamente 2 h, aproximadamente 3 h, aproximadamente 4 h, aproximadamente 5 h, aproximadamente 6 h, aproximadamente 7 h, aproximadamente 8 h, aproximadamente 10 h, etc.). En algunas modalidades específicas, el constructo de ácido nucleico de la descripción es una molécula de ARNm que expresa una proteína diana; por ejemplo, el constructo de nucleótidos es una molécula de ARNm que expresa la proteína hHGF.

En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico de la descripción es un e que se administra a un sujeto y presenta un rendimiento farmacocinético superior al del plásmido Collategene. En algunas modalidades específicas, el constructo de ácido nucleico es una molécula de ARNm; en comparación con el plásmido Collategene, la molécula de ARNm presenta un rendimiento farmacocinético mejorado (por ejemplo,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-inf}$ ,  $MRT_{0-inf}$ ).

En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico de la descripción (por ejemplo, m-A16-B12 (hHGF) que expresa la proteína hHGF) es capaz de mejorar la relación de perfusión sanguínea de la extremidad posterior isquémica en un sujeto. A modo de ejemplo, se pudo lograr una mejora en la relación de perfusión sanguínea en ratones con isquemia de las extremidades posteriores a los que se inyectaron 50 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF). Los ratones con isquemia de las extremidades posteriores a los que se inyectaron aproximadamente 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) pudieron alcanzar una restauración de la perfusión sanguínea de más del 90 %.

En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico de la descripción (por ejemplo, m-A16-B12 (hHGF) que expresa la proteína hHGF) es capaz de mejorar la necrosis isquémica en un sujeto con isquemia de las extremidades posteriores inducida. A modo de ejemplo, las

extremidades posteriores de ratones con isquemia en las extremidades posteriores inyectados con 50 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) mantuvieron ambas una buena integridad, y no se produjo necrosis en las extremidades posteriores.

En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico de la descripción (por ejemplo, m-A16-B12 (hHGF) que expresa la proteína hHGF) puede promover la angiogénesis en los músculos isquémicos de las extremidades posteriores de cada grupo. A modo de ejemplo, en los casos en los que se administraron 50 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF), se promovió significativamente la angiogénesis en los músculos de las extremidades posteriores isquémicas de cada grupo, y el número de vasos sanguíneos de nueva formación presentó una diferencia estadística significativa en comparación con el grupo PBS ( $p < 0.05$ ).

En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico de la descripción (por ejemplo, m-A16-B12 (hHGF) que expresa la proteína hHGF) es capaz de mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto diabético. A modo de ejemplo, en modelos de ratones diabéticos Db/Db a los que se inyectaron 50 ng/ratón, 200 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF), las heridas de los ratones se curaron bien en todos los casos. En el día 14, la tasa de cicatrización de las heridas para la dosis de 50 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) alcanzó el 66 %, y las dosis de 200 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) lograron una cicatrización del 100 %.

El ARNm proporcionado por la presente descripción comprende UTR 5' y UTR 3' de una estructura novedosa, lo que reduce la degradación temprana del ARNm o estabiliza la degradación del ARNm, pero sin perder o, más bien, mejorando la eficiencia de la traducción de proteínas. El ARNm tiene una mayor estabilidad y puede aplicarse en terapia génica y vacunación genética. Además, la presente descripción proporciona un ARNm capaz de expresar el factor de crecimiento de hepatocitos humanos (hHGF) y un sistema de administración de nanopartículas lipídicas (LNP) de éste, que puede lograr una transformación *in vivo* eficiente y rápida de la proteína hHGF exógena; presenta las ventajas de no suponer riesgo de integración y de facilitar la ampliación a escala industrial. Se trata de un régimen de tratamiento ideal en comparación con un plásmido desnudo, y puede usarse como fármaco de terapia génica para diversas enfermedades, como la CLI y la DFU.

#### Polinucleótido

La presente descripción también proporciona un polinucleótido aislado que comprende (a) un marco de lectura abierto (ORF). A modo de ejemplo, el marco de lectura abierto (ORF) codifica el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), como el factor de crecimiento de los hepatocitos humanos (hHGF).

En algunas modalidades, la secuencia codificante del hHGF comprende cualquiera de las siguientes opciones 1) a 3):

1) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 109 o una secuencia de la misma optimizada en cuanto a codones;

2) una secuencia de ADN mostrada en cualquiera de las SEQ ID NOs: 110 a 113 o una secuencia de ADN que tenga una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con las mismas;

3) una secuencia de ARN mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 128 a 131 o una secuencia de ARN que tenga una identidad de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con las mismas.

En algunas modalidades específicas, el extremo 5' del polinucleótido puede comprender cualquier 5'UTR proporcionado por la descripción, y/o el extremo 3' del polinucleótido puede comprender cualquier 3'UTR proporcionado por la descripción.

En algunas modalidades específicas, el extremo 5' del polinucleótido puede comprender cualquier 5'Cap proporcionado por la descripción, y/o el extremo 3' del polinucleótido puede comprender cualquier cola poli-A proporcionada por la descripción.

En algunas modalidades, el polinucleótido es ARN, como el ARNm.

#### Modificación

Con el fin de mejorar aún más la estabilidad del ARN o polinucleótido de la presente descripción en lo que respecta a la expresión de proteínas, el ARN o polinucleótido puede comprender además una o más modificaciones (incluidas modificaciones químicas), por ejemplo, una modificación de la cadena principal, una modificación glicosílica, una modificación de bases y/o una modificación lipídica. En algunas modalidades, el ARN o el polinucleótido se modifica uniformemente con una modificación específica (por ejemplo, modificado completamente a lo largo de toda la secuencia). Por ejemplo, el ARN puede modificarse uniformemente con pseudouridina (por ejemplo, N1-metilpseudouridina) de tal manera que cada U de la secuencia sea pseudouridina.

La modificación de la cadena principal a la que se refiere la descripción se refiere a una modificación química del grupo fosfato de la cadena principal del nucleótido contenido en el ARN o polinucleótido de la descripción. En algunas modalidades, la modificación de la cadena principal incluye, entre otras cosas, la sustitución completa del grupo fosfato no modificado de la cadena principal por un grupo fosfato modificado; por ejemplo, el grupo fosfato de la cadena principal puede modificarse sustituyendo uno o más átomos de oxígeno por diferentes sustituyentes. En algunas modalidades, el fosfato modificado incluye, entre otros, fosforotioato, fosforoselenoato, boranofosfato, fosfonato de hidrógeno, fosforamidato, fosfonato de alquilo o arilo y fosfotriéster.

La modificación glicosílica relacionada con la descripción se refiere a una modificación química del azúcar del nucleótido contenido en el ARN o polinucleótido de la descripción. En

algunas modalidades, la modificación glicosílica incluye, pero no se limita a , la modificación o sustitución del hidroxilo (OH) en posición 2' de la molécula de ARN por muchos sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes. En algunas modalidades, la modificación "oxi" incluye, entre otros, una modificación de sustitución con un alcoxi, un ariloxi, polietilenglicol (PEG) y similares. En algunas modalidades, la modificación "desoxi" incluye, entre otros, la modificación con un hidrógeno, un amino (p. ej., NH<sub>2</sub> , alquilamino, dialquilamino, heterocíclico, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o un aminoácido).

La modificación de la base relacionada con la descripción se refiere a una modificación química de la porción de base del nucleótido contenido en el ARN o polinucleótido de la descripción. En algunas modalidades, la modificación de la base incluye modificaciones de la adenina, la guanina, la citosina y el uracilo en el nucleótido. Por ejemplo, los nucleósidos y nucleótidos descritos en la descripción pueden modificarse químicamente en la superficie del surco mayor. En algunas modalidades, la modificación química del surco mayor puede incluir un grupo amino, tiol, alquilo o halógeno. En algunas modalidades, la modificación de la base incluye, entre otras, una modificación con pseudouridina, 1-metil-pseudouridina, 5-azacitidina, 5-metilcitosina-5'-trifosfato o 2-metoxiadenina. En algunas modalidades, la modificación de la base es una modificación con pseudouridina. Por ejemplo, el ARN puede modificarse uniformemente con pseudouridina de tal manera que cada U de la secuencia sea pseudouridina.

La modificación lipídica relacionada con la descripción se refiere a una modificación lipídica en el ARN o polinucleótido de la descripción. En algunas modalidades, la modificación lipídica incluye, entre otros, que el ARN o polinucleótido de la descripción esté unido covalentemente a al menos un enlazador, y que el enlazador correspondiente esté unido covalentemente a al menos un lípido. En algunas modalidades, la modificación lipídica incluye, sin limitarse a ello, que el ARN o polinucleótido de la descripción esté unido covalentemente a al menos un lípido (sin un enlazador).

### UTR

Los UTR (5'UTR y/o 3'UTR) pueden proporcionarse como regiones flanqueantes de la constructo de ácido nucleico, el ARN o la molécula de polinucleótido de la descripción. Los UTR pueden ser homólogos o heterólogos a la región codificante de la constructo de ácido nucleico, el ARN o la molécula de polinucleótido de la descripción. La región flanqueante puede comprender una o más 5'UTR y/o 3'UTR; las UTR pueden ser secuencias iguales o diferentes. Cualquier porción de la región flanqueante puede ser optimizada en cuanto a codones. Antes y/o después de la optimización de codones, cualquier porción de la región flanqueante puede comprender de forma independiente una o más modificaciones estructurales o químicas diferentes.

Con el fin de alterar una o más propiedades del constructo de ácido nucleico, ARN o polinucleótido de la descripción, se introducen o se diseñan y sintetizan UTR heterólogos al ORF de la descripción en el constructo de ácido nucleico, ARN o polinucleótido de la descripción. A continuación, el constructo de ácido nucleico recombinante, el ARN o el polinucleótido se

5 administra a una célula, tejido u organismo, y se miden los resultados (tales como el nivel de proteína, la localización y/o la vida media) para evaluar los efectos beneficiosos producidos por el UTR heterólogo en el ARN o el polinucleótido de la descripción. En algunas modalidades, el UTR incluye un UTR de tipo salvaje o una variante de éste; la variante del UTR incluye añadir o eliminar uno o más nucleótidos (incluidos A, T, C o G) en el extremo. En algunas modalidades,

10 la variante del UTR también incluye la optimización o modificación de codones realizada de cualquier manera. En algunas modalidades, la variante del UTR también incluye una secuencia derivada de cualquier modalidad de la descripción; por ejemplo, basándose en una secuencia natural del UTR, se somete a una mutación puntual a parte de los nucleótidos, manteniéndose o mejorándose el nivel de expresión del gen diana y la estabilidad de la variante mutada. Los

15 métodos de detección del nivel de expresión del gen diana y de la estabilidad son convencionales en la técnica, tales como los métodos de detección de los Ejemplos 3 y 4 de la descripción.

#### Vector

La presente descripción también proporciona un vector que comprende cualquiera de las construcciones de ácido nucleico, ARN o polinucleótidos mencionados anteriormente. La

20 constructo de ácido nucleico, el ARN o el polinucleótido pueden estar presentes en el vector y/o pueden formar parte del vector; el vector es, por ejemplo, un plásmido, un cósmido, un YAC o un vector viral. El vector puede ser un vector de expresión, es decir, un vector que puede proporcionar la expresión de un polipéptido codificado por la constructo de ácido nucleico, el ARN o el polinucleótido. El vector de expresión comprende generalmente al menos un ácido nucleico

25 de la descripción unido de manera operativa a uno o más elementos reguladores de la expresión adecuados (por ejemplo, un promotor, un terminador, etc.). Es de conocimiento común para los expertos en la materia seleccionar los elementos y sus secuencias para la expresión en un huésped específico. Los elementos reguladores y otros elementos útiles o necesarios para la expresión del polipéptido codificado de la descripción son, por ejemplo, un promotor, un

30 terminador, un marcador seleccionable, una secuencia líder, un gen reportero y similares.

En algunas modalidades, el vector es un vector terapéutico capaz de expresar el gen diana de la descripción (por ejemplo, HGF), tal como un plásmido (por ejemplo, un plásmido desnudo), un vector adenoviral, un vector viral adenoasociado y un vector lentiviral.

El constructo de ácido nucleico de la descripción puede prepararse u obtenerse por un

35 método conocido (por ejemplo, mediante síntesis automatizada de ADN y/o tecnología de ADN

recombinante) basándose en la información de la secuencia de nucleótidos de la descripción, y/o puede aislarse de una fuente natural adecuada.

En algunas modalidades, el vector de la descripción comprende además un promotor; por ejemplo, el promotor se encuentra en el extremo 5' del 5'UTR de la constructo de ácido nucleico; por ejemplo, el promotor es un promotor T7, un promotor T7 lac, un promotor Tac, un promotor Lac o un promotor Trp.

#### Célula huésped

La presente descripción también proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de las construcciones de ácido nucleico, ARN o polinucleótidos mencionados anteriormente. En algunas modalidades, la célula es capaz de expresar uno o más polipéptidos codificados por la constructo de ácido nucleico, el ARN o el polinucleótido de la presente descripción. En algunas modalidades e es, la célula huésped es una célula bacteriana, una célula fúngica o una célula de mamífero.

Las células bacterianas incluyen, por ejemplo, células de cepas bacterianas Gram-negativas (como cepas de *Escherichia coli*, cepas de *Proteus* y cepas de *Pseudomonas*) y cepas bacterianas Gram-positivas (como cepas de *Bacillus*, cepas de *Streptomyces*, cepas de *Staphylococcus* y cepas de *Lactococcus*).

Las células fúngicas incluyen, por ejemplo, células de especies de *Trichoderma*, *Neurospora* y *Aspergillus*; o células de especies de *Saccharomyces* (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (p. ej., *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (p. ej., *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*) y *Hansenula*.

Las células de mamíferos incluyen, por ejemplo, células HEK293, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS y similares.

Sin embargo, en la presente descripción también pueden usarse células de anfibios, células de insectos, células vegetales y cualquier otra célula usada en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas.

#### Método de producción o preparación

La presente descripción proporciona un método para preparar el constructo de ácido nucleico, el ARN o el polinucleótido de la presente descripción, y un método para preparar un polipéptido codificado por los mismos.

Los métodos y reactivos usados para preparar el constructo de ácido nucleico, el ARN o el polinucleótido, y el polipéptido codificado por los mismos, tales como vectores específicamente adecuados, métodos de transformación o transfección, marcadores seleccionables, métodos para inducir la expresión de proteínas, condiciones de cultivo y similares, son conocidos en la técnica. Del mismo modo, las técnicas de aislamiento y purificación de proteínas adecuadas para

su uso en los métodos de producción del polipéptido codificado de la descripción son bien conocidas por los expertos en la materia.

En algunas modalidades, el método para preparar el constructo de ácido nucleico o el polinucleótido comprende el cultivo de la célula huésped mencionada anteriormente y la recuperación del constructo de ácido nucleico o del polinucleótido producido a partir del cultivo. El constructo de ácido nucleico o el polinucleótido de la descripción, y el polipéptido codificado por el mismo, también pueden obtenerse mediante otros métodos de producción conocidos en la técnica, tales como la síntesis química, incluida la síntesis en fase sólida o en fase líquida.

En algunas modalidades, el método para preparar una molécula de ARN comprende: preparar un constructo de ácido nucleico o un vector, y a continuación realizar una transcripción inversa usando el constructo de ácido nucleico o el vector para obtener una molécula de ARN. En algunas modalidades específicas, el método comprende además añadir un 5'Cap al extremo 5' de la molécula de ARN.

En algunas modalidades, el ARN puede comprender además una o más modificaciones (incluidas modificaciones químicas), tales como una modificación de la cadena principal, una modificación glicosilica, una modificación de bases y/o una modificación lipídica. En algunas modalidades, el ARN o polinucleótido se modifica uniformemente con una modificación específica (por ejemplo, modificado completamente a lo largo de toda la secuencia). Por ejemplo, el ARN puede modificarse uniformemente con pseudouridina (p. ej., N1-metilpseudouridina) de tal manera que cada U de la secuencia sea pseudouridina (p. ej., N1-metilpseudouridina).

#### Método de tratamiento de enfermedades y uso farmacéutico

La presente descripción proporciona un uso farmacéutico de la nanopartícula lipídica, la composición liofilizada, la formulación liofilizada, la solución reconstituida, la formulación en aerosol o la composición farmacéutica mencionadas anteriormente en la preparación de un medicamento para prevenir, tratar o aliviar las enfermedades o síntomas mencionados anteriormente.

La presente descripción proporciona un uso y un método de la nanopartícula lipídica, la composición liofilizada, la formulación liofilizada, la solución reconstituida, la formulación en aerosol o la composición farmacéutica mencionadas anteriormente para prevenir, tratar o aliviar una enfermedad o un síntoma.

La presente descripción proporciona un método para prevenir, tratar o aliviar una enfermedad o un síntoma que comprende la administración a un paciente o a un sujeto de una cantidad profiláctica y/o terapéuticamente eficaz de la nanopartícula lipídica, la composición liofilizada, la formulación liofilizada, la solución reconstituida, la formulación en aerosol o la composición farmacéutica mencionadas anteriormente.

En algunas modalidades, se usa un método que comprende la administración de una cantidad eficaz de la nanopartícula lipídica, la composición liofilizada, la formulación liofilizada, la solución reconstituida, la formulación en aerosol o la composición farmacéutica mencionadas anteriormente a un sujeto que lo necesite para prevenir, tratar o aliviar una enfermedad o un  
5 síntoma.

En algunas modalidades, la enfermedad o el síntoma se selecciona del grupo que consiste en enfermedad isquémica, síndrome metabólico, diabetes y sus complicaciones, reestenosis y lesión nerviosa;

preferiblemente, la enfermedad isquémica se selecciona del grupo que consiste en  
10 enfermedad coronaria (EC, por sus siglas en inglés), enfermedad arterial periférica (PAD, por sus siglas en inglés), infarto de miocardio, isquemia de las extremidades, tromboangiítis obliterante (TAO, por sus siglas en inglés) y arteritis obliterante diabética (DAO, por sus siglas en inglés); más preferiblemente, la isquemia de las extremidades es isquemia de las extremidades inferiores, y más preferiblemente aún, la isquemia de las extremidades es isquemia crítica de las  
15 extremidades (CLI, por sus siglas en inglés);

preferiblemente, la diabetes y sus complicaciones se seleccionan del grupo formado por la neuropatía periférica diabética, la úlcera del pie diabético (DFU, por sus siglas en inglés) y la arteria obliterante diabética (DAO, por sus siglas en inglés);

preferiblemente, la reestenosis se selecciona del grupo que consiste en la reestenosis  
20 posquirúrgica y la reestenosis posperfusión;

preferiblemente, la lesión nerviosa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad neurodegenerativa, lesión nerviosa traumática y neuropatía periférica; más preferiblemente, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ELA, por sus siglas en inglés), enfermedad de Parkinson y demencia, y la neuropatía  
25 periférica es neuropatía periférica diabética.

La composición farmacéutica de la presente descripción puede usarse para tratar a un paciente que necesite dicho tratamiento mediante administración parenteral. La vía de administración parenteral puede seleccionarse del grupo que consiste en la inyección subcutánea, la inyección intramuscular y la inyección intravenosa.

30

### **Breve descripción de las figuras**

Las Figura 1A a Figura 1C son diagramas esquemáticos de la construcción del vector. La Figura 1A es un diagrama esquemático de la construcción de un vector de cribado del elemento 5'UTR; el control es una secuencia de ARNm que contiene elementos 5'UTR y 3'UTR  
35 de Moderna, concretamente 5'UTR-Fluc- $\alpha$  globina 3'UTR-120A (abreviado como Mod.), su

5'UTR es una secuencia de ácido nucleico artificial, y su 3'UTR se deriva del ARNm de la  $\alpha$ -globina humana. Cuando se construye el vector de cribado 5'UTR, la región 5'UTR se sustituye a través de sitios de enzimas de restricción adecuados. PmeI es el sitio de restricción de linealización. La Figura 1B es un diagrama esquemático de la construcción de un vector de cribado de elementos 3'UTR; el control es Mod. Cuando se construye el vector de cribado 3'UTR, la región 3'UTR se sustituye mediante sitios de enzimas de restricción adecuados. La Figura 1C es un diagrama esquemático de la construcción de un vector de cribado de la combinación de elementos 5' y 3'UTR; el control es Mod. Cuando se construye el vector de cribado de la combinación de elementos 5'UTR y 3'UTR, las regiones 5' y 3'UTR se sustituyen mediante sitios de enzimas de restricción adecuados, o se usa la síntesis del gen completo.

La Figura 2 muestra los resultados de la evaluación de los efectos de diferentes elementos 3'UTR de la descripción en diferentes líneas celulares. Se transfectaron ARNm que contenían diferentes elementos 3'UTR en células HEK293, HeLa y A549. A las 24 horas tras la transfección, se detectó la expresión de luciferasa para evaluar el efecto de la secuencia 3'UTR sobre el nivel de expresión de la proteína. Se usó Mod. como control, y el nivel de expresión de Mod. se estableció en 1. Los resultados mostraron que los efectos de los elementos 3'UTR sobre los niveles de expresión de proteínas eran consistentes en las diferentes líneas celulares.

La Figura 3 muestra los resultados del efecto de los diferentes elementos del 3'UTR de la descripción sobre la eficiencia de expresión del ARNm. Se transducían ARNm que contenían diferentes elementos del 3'UTR en células HEK293 mediante lipofección, y se detectaba el nivel de expresión de la luciferasa a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la transfección. Se usó Mod. como control y su nivel de expresión se estableció en 1. Los resultados mostraron que los elementos 3'UTR numerados B9, B10, B12, B13 y B14 aumentaron significativamente el nivel de expresión de la proteína.

La Figura 4 muestra los resultados del efecto de los diferentes elementos 5'UTR de la descripción sobre la eficiencia de expresión del ARNm. Se transducían ARNm que contenían diferentes elementos 5'UTR en células HEK293 mediante lipofección, y se detectaba el nivel de expresión de luciferasa a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la transfección. Se usó Mod. como control, y su nivel de expresión se estableció en 1. Los resultados mostraron que los elementos 5'UTR numerados A1, A3 a A7 y A9 a A14 aumentaron significativamente el nivel de expresión de la proteína.

La Figura 5 muestra los resultados del efecto de los diferentes elementos 5'UTR de la descripción sobre la eficiencia de expresión del ARNm. Se transducían ARNm que contenían diferentes elementos 5'UTR en células HEK293 mediante lipofección, y se detectaba el nivel de expresión de luciferasa a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la transfección. Se usó Mod. como control,

y su nivel de expresión se estableció en 1. Los resultados mostraron que los elementos 5'UTR numerados A15, A16, A18-A19, A21, A24, A27, A28 y A30 a A33 aumentaron significativamente el nivel de expresión de la proteína.

La Figura 6 muestra los resultados del efecto de diferentes elementos 5'UTR de la descripción sobre la eficiencia de expresión del ARNm. Se transducían ARNm que contenían diferentes elementos 5'UTR en células HEK293 mediante lipofección, y se detectaba el nivel de expresión de la luciferasa a las 6 h, 24 h y 48 h tras la transfección. Se usó BioN. como control, y su nivel de expresión se estableció en 1. Los resultados mostraron que los elementos 5'UTR numerados A1, A15, A16 y A18 aumentaron significativamente el nivel de expresión de la proteína en comparación con la molécula de ácido nucleico de control.

La Figura 7 muestra los resultados del efecto de las combinaciones de elementos UTR de la descripción sobre la eficiencia de expresión del ARNm. Se transducían ARNm que contenían diferentes elementos 5'UTR y 3'UTR en células HEK293 mediante lipofección, y se detectaba el nivel de expresión de luciferasa a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la transfección. Se usó Mod. como control, y su nivel de expresión se estableció en 1. Los resultados mostraron que las combinaciones de los elementos 5'UTR numerados A1, A15, A16 y A18 con los elementos 3'UTR numerados B12, B13 y B14 aumentaron significativamente el nivel de expresión de la proteína.

Las Figuras 8A a 8B muestran los resultados del efecto de las combinaciones de elementos UTR de la descripción sobre la eficiencia de expresión de diferentes proteínas diana. La Figura 8A muestra la regulación de los niveles de expresión de hHGF por los ARNm que contienen los elementos 5'UTR y 3'UTR seleccionados de la descripción en células HEK293. Los resultados mostraron que, en comparación con el Mod. de control, las combinaciones de los elementos 5'UTR numerados A1, A15, A16 y A18 con los elementos 3'UTR numerados B12, B13 y B14 aumentaron significativamente el nivel de expresión de hHGF. La Figura 8B muestra la regulación de los niveles de expresión del anticuerpo anti-PD-1 por ARNm que contienen los elementos 5'UTR y 3'UTR seleccionados de la descripción en células HEK293. Los resultados mostraron que, en comparación con el Mod. de control, las combinaciones de UTR A1-B12 y A15-B12 aumentaron significativamente el nivel de expresión del anticuerpo anti-PD-1.

La Figura 9 es un diagrama esquemático de los resultados experimentales que muestra la evolución temporal de los niveles de expresión de la proteína hHGF en tejidos musculares de ratón para m-A16-B12 (hHGF) de la descripción y el plásmido de control. Los resultados mostraron que tanto la inyección de m-A16-B12 (hHGF) como el plásmido Collatogene expresaron eficazmente la proteína hHGF. La hHGF se pudo expresar 1 h después de la inyección intramuscular de m-A16-B12 (hHGF); a las 6 h tras la inyección, apareció un pico de

expresión de hHGF de forma dependiente de la dosis; una dosis baja de m-A16-B12 (hHGF) pudo alcanzar un nivel comparable al AUCinf (hr\*pg/mg de proteína) de Collategene.

Las Figura 10A a Figura 10B muestran los resultados del efecto terapéutico de m-A16-B12 (hHGF) de la descripción y del plásmido de control en un modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores. La Figura 10A es un diagrama esquemático del protocolo del estudio y fotografías de los resultados experimentales que muestran el efecto de m-A16-B12 (hHGF) y del plásmido Collategene sobre la perfusión sanguínea en el modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores. La Figura 10B muestra los resultados estadísticos del efecto de m-A16-B12 (hHGF) y del plásmido Collategene sobre la relación de perfusión sanguínea en el modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores. Los resultados mostraron que, en el grupo de tratamiento c , con 50 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) y 200 ng/ratón de plásmido desnudo Collategene, la tasa de perfusión sanguínea de la extremidad posterior isquémica de cada ratón mejoró significativamente en comparación con el grupo de control; la tasa de perfusión sanguínea de la extremidad posterior isquémica se recuperó gradualmente con el tiempo. El grupo de 50 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) mostró un efecto de recuperación del flujo sanguíneo similar al del grupo de 200 ng/ratón de plásmido desnudo Collategene; el grupo de 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) fue significativamente superior al grupo de 200 ng/ratón de plásmido desnudo de Collategene en cuanto al efecto de recuperación del flujo sanguíneo, logrando una recuperación de más del 90 % en la perfusión sanguínea.

Las Figura 11A a Figura 11B muestran los resultados del efecto terapéutico del m-A16-B12 (hHGF) de la descripción y del plásmido de control en el modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores. La Figura 11A muestra los criterios de puntuación para los diferentes grados de necrosis de las extremidades posteriores en el modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores y fotografías representativas. La Figura 11B muestra los resultados estadísticos del efecto de m-A16-B12 (hHGF) y del plásmido Collategene sobre la necrosis de las extremidades posteriores en el modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores. Los resultados experimentales mostraron que, en los grupos de tratamiento inyectados con m-A16-B12 (hHGF) y el plásmido desnudo Collategene, las extremidades posteriores de todos los ratones mantuvieron una buena integridad y no se produjo necrosis de las extremidades posteriores.

La Figura 12 muestra fotografías representativas y resultados estadísticos del efecto del m-A16-B12 (hHGF) de la descripción actual y del plásmido de control sobre la angiogénesis en el modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores. Los resultados mostraron que, bajo el tratamiento con 50 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) y 200 ng/ratón del plásmido desnudo Collategene, se promovió significativamente la angiogénesis en los músculos

de las extremidades posteriores isquémicas.

La Figura 13 muestra el protocolo de tratamiento, fotografías representativas y resultados estadísticos del efecto de m-A16-B12 (hHGF) de la descripción y del plásmido de control sobre las heridas en un modelo murino Db/Db con lesión cutánea de espesor total. Los resultados mostraron que, bajo el tratamiento con 50 ng/ratón, 200 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) y 200 µg/ratón del plásmido desnudo Collategene, las heridas de los ratones se curaron bien en comparación con el grupo de control. La promoción de la cicatrización de las heridas por parte de m-A16-B12 (hHGF) fue significativamente superior a la del plásmido desnudo Collategene a 200 µg/ratón.

La Figura 14 muestra fotografías representativas del efecto del m-A16-B12 (hHGF) de la descripción y del plásmido de control sobre la remodelación tisular en el modelo de ratón Db/Db con lesión cutánea de espesor total. Los resultados mostraron que, bajo el tratamiento con m-A16-B12 (hHGF), se logró una cobertura epitelial completa en el epitelio de la herida de los ratones de todos los grupos, y se completó la remodelación tisular. Sin embargo, la recobertura epitelial no se completó en el grupo de control ni en el grupo tratado con 200 µg/ratón del plásmido desnudo Collategene, y se produjo una proliferación anómala de colágeno y un desorden estructural en las heridas.

Figura 15: Tamaños de partícula de las formulaciones 1-4 en diferentes soluciones reguladoras antes de la liofilización.

Figura 16: Tamaños de partícula de las formulaciones 1-4 tras la liofilización y la reconstitución.

Figura 17: Tasas de variación del tamaño de partícula de las formulaciones 1-4 antes y después de la liofilización.

Figura 18: Integridad del ARNm de las formulaciones 1-4 tras su extracción del liofilizador.

Figura 19: Integridad del ARNm de las formulaciones 7-9 tras su extracción del liofilizador.

Figura 20: Integridad del ARNm de las formulaciones 1-4 en condiciones de almacenamiento a alta temperatura (37 °C).

Figura 21: Integridad del ARNm de las formulaciones 7-9 en condiciones de almacenamiento a alta temperatura (37 °C).

Figura 22: Valores de intensidad de fluorescencia de las cantidades de expresión de la transfección celular de los productos liofilizados de las formulaciones 7 y 9.

## **Descripción Detallada de la Invención**

### **I. Términos**

Para facilitar la comprensión de la presente descripción, a continuación se definen

específicamente ciertos términos técnicos y científicos. A menos que se defina específicamente lo contrario en la presente descripción, todos los demás términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen los significados comúnmente entendidos por los expertos en la materia a la que pertenece la presente descripción. Los códigos de tres letras y los códigos de una letra para los aminoácidos usados en la presente descripción son los descritos en J. Biol. Chem, 243, p. 3558 (1968).

Por "secuencia" debe entenderse, en general, tanto la secuencia de aminoácidos pertinente como la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia, a menos que la descripción requiera una interpretación más restrictiva.

"Homología" o "identidad" se refiere a la similitud de secuencia entre dos secuencias de polinucleótidos o entre dos polipéptidos. Cuando las posiciones en dos secuencias alineadas están ocupadas por la misma base o subunidad monomérica de aminoácido, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas  $\times 100\%$ . Por ejemplo, en una alineación óptima de secuencias, si 6 de cada 10 posiciones en dos secuencias coinciden o son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas en un 60 %. Generalmente, la comparación se realiza cuando las dos secuencias se alinean para obtener el máximo porcentaje de homología.

"Aproximadamente" significa que un valor numérico se encuentra dentro de un rango de error aceptable para el valor específico, según lo determine un experto en la materia, lo cual depende en parte de cómo se mida o determine el valor (*es decir*, de las limitaciones del sistema de medición). Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar. Alternativamente, "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" puede significar un rango de hasta el 20 %, como por ejemplo, que varía entre el 1 % y el 15 %, entre el 1 % y el 10 %, entre el 1 % y el 5 %, entre el 0.5 % y el 5 %, o entre el 0.5 % y el 1 %. En la presente descripción, cada caso en el que un valor numérico o un rango vaya precedido del término "aproximadamente" incluye también la modalidad del número dado. A menos que se especifique lo contrario, cuando aparezca un valor específico en la presente descripción y en las reivindicaciones, se debe suponer que el significado de "aproximadamente" o "que comprende esencialmente" se encuentra dentro de un rango de error aceptable para ese valor específico.

"Solución reguladora" se refiere a una solución reguladora que tolera cambios en el pH mediante la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Entre los ejemplos de soluciones reguladoras que controlan el pH dentro de un rango adecuado se incluyen el

tris(hidroximetil)aminometano (Tris), el acetato, el succinato, el gluconato, la histidina, el oxalato, el lactato, el fosfato, el citrato, el tartrato, el fumarato, la glicilglicina y otras soluciones reguladoras de ácidos orgánicos.

Una "solución reguladora de histidina" es una solución reguladora que comprende un ion histidina. Entre los ejemplos de soluciones reguladoras de histidina se incluyen las soluciones reguladoras de clorhidrato de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina y similares, preferiblemente la solución reguladora de clorhidrato de histidina o la solución reguladora de acetato de histidina; la solución reguladora de acetato de histidina se prepara a partir de histidina y ácido acético; la solución reguladora de clorhidrato de histidina se prepara a partir de histidina y clorhidrato de histidina, o a partir de histidina y ácido clorhídrico.

Una "solución reguladora de fosfato" es una solución reguladora que comprende un ion fosfato. Entre los ejemplos de solución reguladora de fosfato se incluyen el hidrogenofosfato disódico-dihidrogenofosfato sódico, el hidrogenofosfato disódico-dihidrogenofosfato potásico, el hidrogenofosfato disódico-ácido cítrico y similares. Preferiblemente, la solución reguladora de fosfato es hidrogenofosfato disódico-dihidrogenofosfato sódico.

Por "composición farmacéutica" se entiende una mezcla que comprende uno o más de los anticuerpos descritos en el presente documento y otros componentes químicos; los demás componentes son, por ejemplo, excipientes y portadores fisiológica o farmacéuticamente aceptables. El objetivo de la composición farmacéutica es mantener la estabilidad de los principios activos, facilitar su administración a un organismo y facilitar la absorción de los principios activos para que ejerzan sus actividades biológicas.

En la presente descripción, "composición farmacéutica" y "formulación" no son términos mutuamente excluyentes.

En la forma de solución de la composición farmacéutica según la descripción, a menos que se especifique lo contrario, el disolvente es agua.

"Formulación liofilizada" significa una formulación o composición farmacéutica obtenida después de que una composición farmacéutica o una formulación en forma líquida o de solución se someta a una etapa de liofilización al vacío.

Los términos "administración", "administrar" y "tratamiento", cuando se aplican a un animal, un ser humano, un sujeto experimental, una célula, un tejido, un órgano o un fluido biológico, se refieren al contacto de un fármaco exógeno, un agente terapéutico, un agente diagnóstico o una composición con el animal, el ser humano, el sujeto, la célula, el tejido, el órgano o el fluido biológico. "Administración", "administrar" y "tratamiento" pueden referirse, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación y experimentales. El tratamiento de una célula incluye el contacto de un agente con la célula, así como el contacto de

un agente con un fluido, en donde el fluido está en contacto con la célula. "Administración", "administrar" y "tratamiento" también significan el tratamiento *in vitro* y *ex vivo* de, por ejemplo, una célula a través de un agente, un diagnóstico, una composición de unión e , o a través de otra célula. "Tratamiento", cuando se aplica a un ser humano, a la medicina veterinaria o a un sujeto de investigación, se refiere al tratamiento terapéutico, a medidas profilácticas o preventivas, y a aplicaciones de investigación y diagnóstico.

"Tratar" o "tratamiento" significa administrar un agente terapéutico sistémico o tópico a un sujeto; por ejemplo, el agente terapéutico comprende cualquiera de los anticuerpos o composiciones farmacéuticas de los mismos de la descripción, y el sujeto ya padece, se sospecha que padece o está predispuesto a padecer una o más enfermedades proliferativas o síntomas de las mismas, en donde se sabe que el agente terapéutico tiene un efecto terapéutico sobre dichos síntomas. Por lo general, el agente terapéutico se administra al sujeto o a la población tratada en una cantidad eficaz para aliviar uno o más síntomas de la enfermedad, lo que puede lograrse induciendo la regresión de dichos síntomas o inhibiendo su progresión en cualquier grado clínicamente medible. La cantidad de un agente terapéutico eficaz para aliviar cualquier síntoma específico de la enfermedad (también denominada "cantidad terapéuticamente eficaz") puede variar en función de diversos factores, por ejemplo, el estado de la enfermedad, la edad y el peso del sujeto, y la capacidad del fármaco para provocar el efecto terapéutico deseado en el sujeto. La evaluación de si se ha aliviado un síntoma de la enfermedad puede realizarse mediante cualquier método de prueba clínica comúnmente usado por un médico u otro profesional sanitario para evaluar la gravedad o la progresión del síntoma. Aunque las modalidades de la presente descripción (por ejemplo, un método de tratamiento o un artículo manufacturado) pueden no ser eficaces para aliviar el síntoma de la enfermedad objetivo en un sujeto determinado, deberían aliviar dicho síntoma en un número estadísticamente significativo de sujetos, según se determine mediante cualquier método de prueba estadística conocido en la técnica, como la prueba t de Student, la prueba de chi-cuadrado, la prueba U de Mann-Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis (prueba H), la prueba de Jonckheere-Terpstra y la prueba de Wilcoxon.

La "cantidad eficaz" incluye una cantidad suficiente para mejorar o prevenir un síntoma o una afección de una enfermedad. Una cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar el diagnóstico. Una cantidad eficaz para un sujeto puede variar en función de factores tales como la afección a tratar, el estado de salud general del sujeto, el método y la vía de administración, la dosis y la gravedad de los efectos secundarios. Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o el régimen de dosificación que evite efectos secundarios significativos o efectos tóxicos. El sujeto de la presente descripción puede ser un animal o un

sujeto humano.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrito a continuación puede ocurrir, pero no es necesario que ocurra, y esta descripción incluye casos en los que el evento o circunstancia ocurre y casos en los que no.

5 "Sujeto" o "paciente" significa un mamífero, especialmente un primate, y en particular un ser humano.

A menos que el contexto exija claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, palabras como "comprender", "tener", "incluir" y similares deben interpretarse en un sentido inclusivo más que en un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de  
10 "incluyendo, pero sin limitarse a".

El término "fase lipídica" se refiere a un término colectivo para todos los lípidos en una nanopartícula lipídica; esto incluye, pero no se limita a, un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un fosfolípido, colesterol o un derivado de éste, un lípido conjugado y similares, que son bien conocidos por los expertos en la materia y pueden usarse para preparar una nanopartícula  
15 lipídica.

El término "lípido" se refiere a una clase de compuestos orgánicos, que incluye, entre otros, un éster de un ácido graso, y se caracteriza por ser insoluble en agua pero soluble en muchos disolventes orgánicos. Generalmente se clasifican en al menos tres categorías: (1) "lípidos simples", que incluyen grasas y aceites, así como ceras; (2) "lípidos compuestos", que incluyen  
20 fosfolípidos y glicolípidos; y (3) "lípidos derivados", como los esteroides.

El término "lípido catiónico" se refiere a cualquiera de las numerosas especies de lípidos que llevan una carga neta positiva a un pH seleccionado, como un pH fisiológico (por ejemplo, un pH de aproximadamente 7.0).

El término "lípido aniónico" se refiere a cualquier lípido que tenga una carga negativa a un  
25 pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, entre otros, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoilfosfatidiletanolamina, N-succinilfosfatidiletanolamina, N-glutarilfosfatidiletanolamina, lisilfosfatidilglicerol, palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG) y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

30 El término "lípido neutro" se refiere a cualquiera de las numerosas especies lipídicas que existen en forma zwitteriónica sin carga o neutra a un pH seleccionado. A un pH fisiológico, dichos lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol, cerebroside y diacilglicerol.

El término "lípido anfifílico" se refiere en parte a cualquier material adecuado en el que una  
35 porción hidrofóbica de un material lipídico se orienta hacia una fase hidrofóbica, mientras que

una porción hidrofílica se orienta hacia una fase acuosa. Las propiedades hidrofílicas se derivan de la presencia de grupos polares o cargados, tales como carbohidratos, fosfato, carboxilo, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxilo y otros grupos similares. La hidrofobicidad puede conferirse mediante la inclusión de grupos no polares, incluyendo, entre otros, grupos hidrocarburos alifáticos saturados y insaturados de cadena larga y dichos grupos sustituidos por uno o más grupos aromáticos, alicíclicos o heterocíclicos. Entre los ejemplos de compuestos anfífilos se incluyen, entre otros, los fosfolípidos, los aminolípidos y los esfingolípidos.

El término "lípidos no catiónicos" se refiere a cualquier lípido anfílico, así como a cualquier otro lípido neutro o lípido aniónico.

El término "lípidos conjugados" se refiere a un lípido unido que inhibe la agregación de partículas lipídicas. El lípido conjugado incluye, entre otros, fosfatidiletanolamina modificada con PEG, ácido fosfatídico modificado con PEG, ceramida modificada con PEG, dialquilamina modificada con PEG, diacilglicerol modificado con PEG y dialciloilglicerol modificado con PEG.

El término "mamífero" se refiere a cualquier especie de mamífero, como humanos, ratones, ratas, perros, gatos, hámsters, cobayas, conejos, ganado y similares.

El "tamaño medio de partícula" (tamaño medio Z) de la presente descripción, por ejemplo, "un tamaño medio de partícula inferior a 2000 nm", es un valor medio de intensidad luminosa calculado a partir de la intensidad luminosa aportada por diferentes tipos de partículas. El "tamaño medio de partícula" puede medirse mediante una técnica convencional de medición del tamaño de partícula bien conocida por los expertos en la materia para medir el tamaño medio de las partículas. Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, el fraccionamiento por flujo de campo de sedimentación, la espectroscopia de correlación de fotones, la dispersión de luz y similares.

El índice de polidispersidad (PDI) en la presente descripción refleja la uniformidad de los tamaños de partícula y es un índice importante para la caracterización del tamaño de partícula.

Los términos "incorporar a" y "mezclar" implican que el orden de adición de los componentes no está limitado. Por ejemplo, incorporar A a B puede significar añadir A a B, o bien añadir B a A; mezclar A y B puede significar añadir A a B para mezclarlos, o bien añadir B a A para mezclarlos.

Los valores numéricos de la presente descripción son valores de medición instrumental y presentan un cierto grado de error. En términos generales,  $\pm 10\%$  se considera un margen de error razonable. Por supuesto, se tendrá en cuenta el contexto en el que se aplica el valor numérico; por ejemplo, para el tamaño de partícula de un ingrediente activo, el valor es una variación de error tras la medición que no excede del  $\pm 10\%$ , lo que puede ser  $\pm 9\%$ ,  $\pm 8\%$ ,  $\pm 7\%$ ,  $\pm 6\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 4\%$ ,  $\pm 3\%$ ,  $\pm 2\%$  o  $\pm 1\%$ , preferiblemente  $\pm 5\%$ .

El compuesto representado por la Fórmula I de la descripción se preparó tomando como referencia el método descrito en WO2023125738A, y los contenidos relevantes se incorporan

aquí a modo de ilustración.

**El equipo y los métodos usados en el proceso de detección fueron los siguientes:**

**Contenido total y eficiencia de encapsulación:**

5        Bajo la acción de Triton X-100 al 2 %, los LNP de ARNm podían liberar el ARNm encapsulado en los lípidos; el ARNm se unía a RiboGreen; se podía leer en el modo de fluorescencia de un lector de microplacas seleccionando una luz de excitación de 485 nm y una luz de emisión de 535 nm. Se usó un método con colorante fluorescente para detectar los contenidos de ARNm en las muestras antes y después de la liberación tratadas con Triton X-100, y se midieron  
10        respectivamente los contenidos de ARN libre y ARN total; el contenido de ARN total era el contenido total; la proporción de la diferencia entre el ARN total y el ARN libre respecto al ARN total se consideró como la eficiencia de encapsulación de la muestra.

Instrumento de detección del contenido total y la eficiencia de encapsulación: Molecular Devices - lector de microplacas multifuncional.

15        **Detección de ARN bicatenario:**

Se aplicó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich de doble anticuerpo para detectar el contenido de ARN bicatenario en una solución madre de un producto de ARN transcrito *in vitro*. Se recubrió una microplaca con un anticuerpo de captura para formar un anticuerpo en fase sólida; se añadieron un patrón de ARNs y una muestra a analizar a la  
20        microplaca de anticuerpos en fase sólida ; a continuación, se añadió un anticuerpo de detección; por último, se añadió un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante para formar un complejo "anticuerpo de recubrimiento-antígeno-anticuerpo de detección marcado con enzima"; tras el lavado, se añadió una solución cromogénica para el desarrollo del color; bajo la catálisis de la enzima HRP, la solución cromogénica se convirtió en azul y, finalmente, en amarillo  
25        bajo la acción de un ácido; la intensidad del color se correlacionó positivamente con la cantidad de ARN bicatenario en la muestra.

Instrumento de detección de ARNs: Molecular Devices - lector de microplacas multifuncional.

30        **Detección de HGF:**

En este experimento, se recogió como muestra de ensayo un sobrenadante de expresión obtenido 3 días después de la infección de células HEK293 con un fármaco de ARNm (en forma de liposoma). Se adoptó un método ELISA sándwich de doble anticuerpo: Se recubrió una microplaca con un anticuerpo anti-HGF humano; el HGF humano de la muestra y el patrón se  
35        unieron al anticuerpo inmovilizado en la placa, y los componentes libres se eliminaron por lavado;

posteriormente, se añadió un anticuerpo de detección anti-HGF humano biotinilado para la incubación; tras el lavado para eliminar las sustancias no unidas, se añadió peroxidasa de rábano picante marcada con estreptavidina (estreptavidina-HRP) para la incubación. Tras el lavado para eliminar los reactivos no unidos, se añadió una solución de sustrato TMB (agente cromogénico).

- 5 El color de la solución era directamente proporcional a la proteína diana unida; se añadió una solución de parada; se determinó la absorbancia con un lector de microplacas.

Instrumento de detección de HGF: Molecular Devices - lector de microplacas multifuncional.

### **Ejemplos y ejemplos de ensayo**

- 10 La presente descripción se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

- En el caso de los métodos experimentales en los que no se indican condiciones específicas en los ejemplos de la descripción, se suelen seguir las condiciones convencionales; o bien, se siguen las condiciones sugeridas por los fabricantes de las materias primas o de los productos comerciales. Véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, editado por Ausubel *et al.*, Greene Publishing Associates, Wiley Interscience, Nueva York. Los reactivos cuya procedencia específica no se indica son reactivos convencionales adquiridos en el mercado.

20

### **Ejemplo 1. Preparación de ARNm**

#### **1.1 Cribado de 5'UTR y 3'UTR**

- Con el fin de seleccionar un elemento de la región no traducida 3' (elemento 3'UTR) y un elemento de la región no traducida 5' (elemento 5'UTR) que pudieran mejorar la eficiencia de la expresión proteica, en este ejemplo se seleccionaron secuencias de UTR en ARNm de genes de mantenimiento.

- En primer lugar, se identificaron 301 genes de mantenimiento humanos candidatos, incluidos Abhd16a y similares, a través de una base de datos ([https://esbl.nhlbi.nih.gov/helixweb/Database/NephronRNAseq/Housekeeping\\_Genes.html](https://esbl.nhlbi.nih.gov/helixweb/Database/NephronRNAseq/Housekeeping_Genes.html)). A continuación, se analizaron los niveles de expresión de los genes mencionados y se clasificaron por cantidad de expresión mediante métodos bioinformáticos, y se recuperó la información sobre las secuencias de transcritos y UTR de los genes. Los elementos UTR se seleccionaron posteriormente según el nivel de expresión de los genes y la longitud de las secuencias UTR; se obtuvieron múltiples secuencias UTR candidatas; entre ellas, se seleccionaron 33 UTR 5' numeradas de A1 a A33 y 14 UTR 3' numeradas de B1 a B14. Las fuentes genéticas y los

35

números de secuencia se muestran en la Tabla 1 y la Tabla 2.

Tabla 1. Nuevas 3'UTR obtenidas mediante cribado

| N.º de 3'UTR | Fuente génica<br>(Todas proceden de Homo sapiens) | N.º de secuencia de ADN correspondiente | N.º de secuencia de ARNm correspondiente |
|--------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| B1           | ACTG1                                             | SEQ ID NO:1                             | SEQ ID NO:58                             |
| B2           | ATP6V0B                                           | SEQ ID NO:2                             | SEQ ID NO:59                             |
| B3           | ATP6V0B                                           | SEQ ID NO:3                             | SEQ ID NO:60                             |
| B4           | ATP6V0E1                                          | SEQ ID NO: 4                            | SEQ ID NO:61                             |
| B5           | ATP6V0E1                                          | SEQ ID NO:5                             | SEQ ID NO:62                             |
| B6           | CFL1                                              | SEQ ID NO:6                             | SEQ ID NO:63                             |
| B7           | CFL1                                              | SEQ ID NO:7                             | SEQ ID NO:64                             |
| B8           | CFL1                                              | SEQ ID NO:8                             | SEQ ID NO:65                             |
| B9           | COX4I1                                            | SEQ ID NO:9                             | SEQ ID NO:66                             |
| B10          | COX4I1                                            | SEQ ID NO:10                            | SEQ ID NO:67                             |
| B11          | COX4I1                                            | SEQ ID NO:11                            | SEQ ID NO:68                             |
| B12          | CTSB                                              | SEQ ID NO:12                            | SEQ ID NO:69                             |
| B13          | FAM166A                                           | SEQ ID NO: 13                           | SEQ ID NO: 70                            |
| B14          | NDUFB9                                            | SEQ ID NO: 14                           | SEQ ID NO:71                             |

5

Tabla 2. Nuevos 5'UTR obtenidos mediante cribado

| N.º de 5'UTR | Origen del gen<br>(Todos proceden de Homo sapiens) | N.º de secuencia de ADN correspondiente | N.º de secuencia de ARNm correspondiente |
|--------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| A1           | ACTG1                                              | SEQ ID NO:15                            | SEQ ID NO:72                             |
| A2           | ATP6V0B                                            | SEQ ID NO:16                            | SEQ ID NO:73                             |
| A3           | ATP6V0B                                            | SEQ ID NO:17                            | SEQ ID NO:74                             |
| A4           | ATP6V0E1                                           | SEQ ID NO:18                            | SEQ ID NO: 75                            |
| A5           | ATP6V0E1                                           | N.º de identificación de secuencia: 19  | SEQ ID NO: 76                            |
| A6           | CFL1                                               | SEQ ID NO:20                            | SEQ ID NO: 77                            |
| A7           | CFL1                                               | SEQ ID NO: 21                           | SEQ ID NO: 78                            |

|     |          |               |                |
|-----|----------|---------------|----------------|
| A8  | CFL1     | SEQ ID NO: 22 | SEQ ID NO:79   |
| A9  | COX4I1   | SEQ ID NO:23  | SEQ ID NO:80   |
| A10 | COX4I1   | SEQ ID NO:24  | SEQ ID NO:81   |
| A11 | COX4I1   | SEQ ID NO:25  | SEQ ID NO:82   |
| A12 | CTSB     | SEQ ID NO:26  | SEQ ID NO:83   |
| A13 | FAM166A  | SEQ ID NO: 27 | SEQ ID NO: 84  |
| A14 | NDUFB9   | SEQ ID NO: 28 | SEQ ID NO: 85  |
| A15 | CHCHD10  | SEQ ID NO: 29 | SEQ ID NO: 86  |
| A16 | CHCHD10  | SEQ ID NO: 30 | SEQ ID NO: 87  |
| A17 | SLC38A2  | SEQ ID NO: 31 | SEQ ID NO: 88  |
| A18 | NDUFA11  | SEQ ID NO: 32 | SEQ ID NO: 89  |
| A19 | NDUFV3   | SEQ ID NO: 33 | SEQ ID NO:90   |
| A20 | PRDX5    | SEQ ID NO:34  | SEQ ID NO: 91  |
| A21 | GUK1     | SEQ ID NO: 35 | SEQ ID NO: 92  |
| A22 | GUK1     | SEQ ID NO:36  | SEQ ID NO:93   |
| A23 | GUK1     | SEQ ID NO: 37 | SEQ ID NO:94   |
| A24 | IAH1     | SEQ ID NO:38  | SEQ ID NO:95   |
| A25 | ABHD16A  | SEQ ID NO:39  | SEQ ID NO:96   |
| A26 | SLC25A39 | SEQ ID NO: 40 | SEQ ID NO:97   |
| A27 | ATPIF1   | SEQ ID NO:41  | SEQ ID NO:98   |
| A28 | ANAPC11  | SEQ ID NO:42  | SEQ ID NO:99   |
| A29 | ANAPC11  | SEQ ID NO: 43 | SEQ ID NO: 100 |
| A30 | CCDC12   | SEQ ID NO: 44 | SEQ ID NO: 101 |
| A31 | MRPL14   | SEQ ID NO: 45 | SEQ ID NO: 102 |
| A32 | APOA1BP  | SEQ ID NO: 46 | SEQ ID NO:103  |
| A33 | APOA1BP  | SEQ ID NO:47  | SEQ ID NO:104  |

## 1.2 Preparación del ARNm

Los UTR obtenidos mediante el cribado descrito en 1.1 se construyeron en un vector de ADN para la transcripción *in vitro* con el fin de obtener un ARNm que expresara de forma estable los elementos 5'UTR y 3'UTR. El vector contenía un promotor T7, una secuencia que codifica la luciferasa de luciérnaga (Fluc) como marco de lectura abierto (ORF) (SEQ ID NO: 126) y una secuencia de poliadenilación (polyA); la secuencia polyA iba seguida de un sitio de restricción usado para linealizar el vector. La secuencia polyA se seleccionó del grupo formado por A120 (es

decir, 120 adenilatos consecutivos) y A30L70 (SEQ ID NO: 52). Los elementos 5'UTR y 3'UTR se construyeron respectivamente en el extremo 5' y el extremo 3' del marco de lectura abierto ORF (Fluc) mediante sitios de enzimas de restricción apropiados. En las Figuras 1A a 1C se muestran ejemplos de los vectores contruidos, y en la tabla 3 se muestran las combinaciones de 5'UTR y 3'UTR.

Los vectores de control usados en este ejemplo incluían el Mod.-120A con una cola de poli-A de A120 (SEQ ID NO: 53), el Mod.-A30L70 con un poliA de A30L70 (SEQ ID NO: 54) y BioN.-A30L70 (SEQ ID NO: 55), siendo todos los genes diana Fluc, que se construyeron mediante síntesis de genes completos. Se construyeron diferentes elementos UTR en los vectores anterior, respectivamente, mediante digestión con enzimas de restricción. Entre ellos, el vector de construcción para los vectores V-B1 a V-B14 fue Mod.-120A, los sitios de enzimas de restricción seleccionados fueron Agel y SacII, sus poliA fueron todos A120, y el control usado fue Mod.-120A (SEQ ID NO: 53). El vector de construcción para los vectores V-A1 a V-A14 fue Mod.-120A (SEQ ID NO: 53), los sitios de enzimas de restricción seleccionados fueron BamHI y NheI, sus polyA eran todos A120, y el control usado fue también Mod.-120A (SEQ ID NO: 53). El vector de construcción para V-A15 a V-A33 fue Mod.-A30L70 (SEQ ID NO: 54), los sitios de enzimas de restricción seleccionados fueron BamHI y NheI, sus polyA fueron todos A30L70, y el control usado fue Mod.-A30L70 (SEQ ID NO: 54). El vector de construcción para los vectores V-A1-B12, V-A1-B13 y V-A1-B14 fue Mod.-A30L70 (SEQ ID NO: 54), los sitios de enzimas de restricción seleccionados fueron BamHI y SacII, sus polyA fueron todos A30L70, y los controles usados fueron Mod.-A30L70 (SEQ ID NO: 54) y BioN.-A30L70 (SEQ ID NO: 55). Los fragmentos del gen del elemento UTR insertados fueron todos sintetizados como genes completos (Suzhou Genewiz Biological Technology Co., Ltd.). Los fragmentos se construyeron en los vectores correspondientes mediante digestión con enzimas de restricción y ligación. Una vez completada la construcción de los vectores, se requirió la digestión con enzimas de restricción y la identificación mediante secuenciación. Cuando la identificación fue correcta, se usaron para el siguiente experimento.

Tabla 3. Combinaciones de 5'UTR y 3'UTR en vectores

| N.º de vector<br>(N.º de ARNm<br>correspondiente) | 5'UTR | 3'UTR |
|---------------------------------------------------|-------|-------|
|                                                   |       |       |

| Mod.          | Mod. 5'UTR<br>(SEQ ID NO:48)                    | 3'UTR de la $\alpha$ -globina<br>(SEQ ID NO:49) |
|---------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| V-B1 (m-B1)   |                                                 | B1 (SEQ ID NO:1)                                |
| V-B2 (m-B2)   |                                                 | B2 (SEQ ID NO:2)                                |
| V-B3 (m-B3)   |                                                 | B3 (SEQ ID NO:3)                                |
| V-B4 (m-B4)   |                                                 | B4 (SEQ ID NO:4)                                |
| V-B5 (m-B5)   |                                                 | B5 (SEQ ID NO:5)                                |
| V-B6 (m-B6)   |                                                 | B6 (SEQ ID NO:6)                                |
| V-B7 (m-B7)   |                                                 | B7 (SEQ ID NO:7)                                |
| V-B8 (m-B8)   |                                                 | B8 (SEQ ID NO:8)                                |
| V-B9 (m-B9)   |                                                 | B9 (SEQ ID NO:9)                                |
| V-B10 (m-B10) |                                                 | B10 (SEQ ID NO:10)                              |
| V-B11 (m-B11) |                                                 | B11 (SEQ ID NO:11)                              |
| V-B12 (m-B12) |                                                 | B12 (SEQ ID NO:12)                              |
| V-B13 (m-B13) |                                                 | B13 (SEQ ID NO:13)                              |
| V-B14 (m-B14) |                                                 | B14 (SEQ ID NO: 14)                             |
| V-A1 (m-A1)   | A1 (SEQ ID NO:15)                               | 3'UTR de la $\alpha$ -globina<br>(SEQ ID NO:49) |
| V-A2 (m-A2)   | A2 (SEQ ID NO:16)                               |                                                 |
| V-A3 (m-A3)   | A3 (SEQ ID NO:17)                               |                                                 |
| V-A4 (m-A4)   | A4 (SEQ ID NO:18)                               |                                                 |
| V-A5 (m-A5)   | A5 (SEQ ID NO:19)                               |                                                 |
| V-A6 (m-A6)   | A6 (SEQ ID NO:20)                               |                                                 |
| V-A7 (m-A7)   | A7 (SEQ ID NO:21)                               |                                                 |
| V-A8 (m-A8)   | A8 (SEQ ID NO:22)                               |                                                 |
| V-A9 (m-A9)   | A9 (SEQ ID NO:23)                               |                                                 |
| V-A10 (m-A10) | A10 (SEQ ID NO:24)                              |                                                 |
| V-A11 (m-A11) | A11 (SEQ ID NO:25)                              |                                                 |
| V-A12 (m-A12) | A12 (N.º de identificación<br>de secuencia: 26) |                                                 |
| V-A13 (m-A13) | A13 (SEQ ID NO:27)                              |                                                 |
| V-A14 (m-A14) | A14 (SEQ ID NO:28)                              |                                                 |
| V-A15 (m-A15) | A15 (SEQ ID NO:29)                              |                                                 |
| V-A16 (m-A16) | A16 (SEQ ID NO:30)                              |                                                 |

|                     |                                                |                                               |
|---------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| V-A17 (m-A17)       | A17 (SEQ ID NO:31)                             |                                               |
| V-A18 (m-A18)       | A18 (N.º de identificación de secuencia: 32)   |                                               |
| V-A19 (m-A19)       | A19 (SEQ ID NO:33)                             |                                               |
| V-A20 (m-A20)       | A20 (SEQ ID NO:34)                             |                                               |
| V-A21 (m-A21)       | A21 (SEQ ID NO:35)                             |                                               |
| V-A22 (m-A22)       | A22 (N.º de identificación de secuencia: 36)   |                                               |
| V-A23 (m-A23)       | A23 (SEQ ID NO:37)                             |                                               |
| V-A24 (m-A24)       | A24 (N.º de identificación de secuencia: 38)   |                                               |
| V-A25 (m-A25)       | A25 (SEQ ID NO:39)                             |                                               |
| V-A26 (m-A26)       | A26 (SEQ ID NO:40)                             |                                               |
| V-A27 (m-A27)       | A27 (N.º de identificación de secuencia: 41)   |                                               |
| V-A28 (m-A28)       | A28 (SEQ ID NO:42)                             |                                               |
| V-A29 (m-A29)       | A29 (SEQ ID NO:43)                             |                                               |
| V-A30 (m-A30)       | A30 (SEQ ID NO:44)                             |                                               |
| V-A31 (m-A31)       | A31 (SEQ ID NO:45)                             |                                               |
| V-A32 (m-A32)       | A32 (N.º de identificación de secuencia: 46)   |                                               |
| V-A33 (m-A33)       | A33 (SEQ ID NO:47)                             |                                               |
| V-A1-B12 (m-A1-B12) | A1 (N.º de identificación de secuencia: 15)    | B12 (SEQ ID NO:12)                            |
| V-A1-B13 (m-A1-B13) | A1 (N.º de identificación de secuencia: 15)    | B13 (SEQ ID NO:13)                            |
| V-A1-B14 (m-A1-B14) | A1 (SEQ ID NO:15)                              | B14 (SEQ ID NO:14)                            |
| BioN.               | 5'UTR de la $\alpha$ -1-globina (SEQ ID NO:50) | haplogrupo U8b1b1 mitocondrial (SEQ ID NO:51) |

Los vectores (*es decir*, las plantillas de ADN) de la Tabla 3 se digirieron con una endonucleasa de restricción para linealizar las plantillas de ADN; a continuación, se usó ARN polimerasa T7 para la transcripción *in vitro*. Para la transcripción *in vitro*, se usaron ARN

polimerasa T7 (Roche), las soluciones reguladoras de reacción correspondientes, pirofosfatasa, inhibidores de RNasa y NTP. Con el fin de realizar un capping eficaz del ARN, se añadió a la reacción una cantidad en exceso del compuesto análogo de cap ARCA (3'-O-Me-m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G, Trilink, N-7003-1) o CleanCap (m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG, Trilink, N-7113) a la  
 5 reacción, en donde se seleccionó ARCA para el capping en la producción de ARN de las Figuras 2 a 5, y se seleccionó CleanCap para el capping del ARN de las Figuras 6 a 9. Al mismo tiempo, con el fin de reducir la inmunogenicidad del ARNm y mejorar la eficiencia de traducción, todos los ARNm de la descripción se sometieron a una modificación de ácidos nucleicos, en donde todo el trifosfato de uridina (abreviado como UTP) del sistema de reacción se sustituyó por  
 10 trifosfato de N1-metil-pseudouridina (abreviado como 1m-ψUTP, adquirido a ThermoFisher). Este método de modificación se basó en la solicitud de patente US 2014/0194494 A1. Tras incubar el sistema de transcripción *in vitro* a 37 °C durante 2.5 horas, el ARN se purificó mediante perlas magnéticas carboxiladas (Invitrogen) y se resuspendió en agua libre de ARNasa; la concentración y la calidad del ARN se evaluaron mediante espectrofotometría y análisis en un  
 15 Bioanalyzer 5200 (Agilent). Tras la detección, se obtuvo el ARNm diana.

Las secuencias desde el 5'UTR hasta el polyA de Mod. de la descripción se muestran en los SEQ ID N.º: 53 y 54; la secuencia desde el 5'UTR hasta el polyA de BioN. se muestra en el SEQ ID N.º: 55. Las secuencias del 5'UTR y del 3'UTR en Mod. son consistentes con las secuencias de las patentes y la literatura publicada de Moderna Inc. (US10849920B2, WO2013151667A1,  
 20 US10730924B2, DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.017). Las secuencias 5'UTR y 3'UTR de BioN. se derivan de la solicitud de patente WO 2018/160540.

La secuencia linealizada de V-B1 se proporciona a modo de ejemplo, y la secuencia desde el 5'UTR hasta el polyA se muestra en SEQ ID NO: 56; para la secuencia linealizada de V-A1, la secuencia desde el 5'UTR hasta el polyA se muestra en SEQ ID NO: 57.

25

### 1.3 Validación funcional de 5'UTR, 3'UTR y combinaciones de los mismos

En este ejemplo, se usó un sistema de expresión de luciferasa basado en lipofección de ARNm para la validación funcional de los UTR.

Métodos experimentales: Se sembraron células renales embrionarias humanas (HEK293, adquiridas a ATCC) en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $4 \times 10^4$  células/pocillo. Al día siguiente, se llevó a cabo la transfección mediante el reactivo de transfección de ARNm Lipofectamine™ MessengerMAX™; se transfectaron 100 ng del ARNm con caperuza preparado en el ejemplo 2 anterior en cada pocillo. Tras 6 horas de transfección, se sustituyó el medio por medio fresco. Se aspiraron 100 µL de medio y se añadieron 50 µL de un sustrato de luciferasa;  
 30 la intensidad de la luminiscencia se detectó usando un lector de microplacas multifuncional

PerkinElmer. Los métodos experimentales para las células de cáncer de cuello uterino humano (HeLa, adquiridas a ATCC) y las células de cáncer de pulmón humano (A549, adquiridas a ATCC) fueron los mismos que para las HEK293.

Métodos de evaluación: En las tablas 4 a 7 y 9 a 11, se estableció en 1 la cantidad de expresión de luciferina del control positivo de referencia Mod. en las diferentes líneas celulares ( ); a continuación, se calcularon los pliegos de expresión de los diferentes ARNm en relación con el control positivo Mod. En la Tabla 8, la cantidad de expresión de luciferina del control positivo de referencia BioN. en diferentes líneas celulares se estableció en 1. Se calcularon los pliegues de la cantidad de expresión de diferentes ARNm en relación con el control positivo BioN. Todos los valores numéricos de las tablas son pliegues del valor medio de detección.

1) Determinación de la capacidad de los 3'UTR para regular la expresión de genes diana en diferentes líneas celulares

Para verificar la capacidad de diferentes 3'UTR para regular la expresión de genes diana en diferentes líneas celulares, se preparó ARNm que expresaba luciferasa (Fluc) usando el método del Ejemplo 2; el ARN obtenido se capó con ARCA; la estructura de la cola poli-A fue A120. El ARN se transfectó en células humanas HeLa, HEK293 y A549, y se midieron los niveles de luciferasa 24 horas después de la transfección. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y la Figura 2.

Tabla 4. Cantidades de expresión de luciferasa (Fluc) expresadas por ARNm que portan diferentes 3'UTR

(capping con ARCA, todos los genes diana eran Fluc, todos los poliA eran A120)

| N.º de ARNm | Número de secuencia de ARNm del 5'UTR | Número de secuencia de ARNm del 3'UTR | Línea celular |        |      |
|-------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------|--------|------|
|             |                                       |                                       | HeLa          | HEK293 | A549 |
| Mod.        | SEQ ID NO: 105                        | SEQ ID NO: 106                        | 1             | 1      | 1    |
| m-B1        |                                       | SEQ ID NO: 58                         | 1.25          | 1.52   | 1.55 |
| m-B2        |                                       | SEQ ID NO: 59                         | 1.72          | 1.85   | 1.94 |
| m-B3        |                                       | SEQ ID NO: 60                         | 1.56          | 1.66   | 1.83 |
| m-B4        |                                       | SEQ ID NO: 61                         | 1.63          | 1.68   | 1.77 |
| m-B5        |                                       | SEQ ID NO: 62                         | 0.99          | 1.01   | 1.08 |
| m-B6        |                                       | SEQ ID NO: 63                         | 1.13          | 1.30   | 1.40 |
| m-B7        |                                       | SEQ ID NO: 64                         | 1.41          | 1.72   | 1.69 |
| m-B8        |                                       | SEQ ID NO: 65                         | 1.31          | 1.40   | 1.57 |
| m-B9        |                                       | SEQ ID NO: 66                         | 2.04          | 1.71   | 2.13 |

|       |  |               |      |      |      |
|-------|--|---------------|------|------|------|
| m-B10 |  | SEQ ID NO: 67 | 1.72 | 1.83 | 1.82 |
| m-B11 |  | SEQ ID NO: 68 | 1.65 | 1.61 | 1.63 |
| m-B12 |  | SEQ ID NO: 69 | 2.29 | 2.22 | 2.24 |
| m-B13 |  | SEQ ID NO: 70 | 2.21 | 2.27 | 2.28 |
| m-B14 |  | SEQ ID NO: 71 | 2.07 | 1.92 | 2.27 |

Los resultados mostraron que, en diferentes líneas celulares, en comparación con el control positivo Mod., los efectos de los 3'UTR de B1 a B14 sobre las cantidades de expresión proteica fueron consistentes; no hubo diferencias significativas entre las diferentes líneas celulares ( $p > 0.05$ ). Esto indicaba que los efectos de los elementos 3'UTR obtenidos mediante cribado en la presente descripción sobre las cantidades de expresión proteica eran de aplicación universal y podían usarse para mejorar el nivel de expresión proteica de los genes diana.

2) Determinación de la duración de la regulación de la expresión del gen diana por los 3'UTR en las células

Para determinar la capacidad de diferentes 3'UTR para regular la duración de la expresión de los genes diana en las células, se transfectaron los ARNm de la Tabla 4 en células HEK293; se midieron los niveles de expresión de luciferasa a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la transfección. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y la Figura 3.

Tabla 5. Cantidades de luciferasa (Fluc) expresadas por ARNm que portan diferentes 3'UTR

| N.º de ARNm | HEK293 |      |      |      |
|-------------|--------|------|------|------|
|             | 6 h    | 24 h | 48 h | 72 h |
| Mod.        | 1      | 1    | 1    | 1    |
| m-B1        | 2.61   | 1.88 | 1.73 | 1.40 |
| m-B2        | 2.26   | 1.94 | 1.78 | 1.38 |
| m-B3        | 2.09   | 1.95 | 1.67 | 1.51 |
| m-B4        | 2.08   | 1.80 | 1.93 | 2.10 |
| m-B5        | 1.41   | 1.05 | 1.04 | 0.98 |
| m-B6        | 1.59   | 1.47 | 1.44 | 1.29 |
| m-B7        | 1.77   | 1.76 | 1.78 | 1.53 |
| m-B8        | 1.69   | 1.75 | 1.64 | 1.41 |
| m-B9        | 1.99   | 3.39 | 2.32 | 1.78 |
| m-B10       | 2.96   | 2.83 | 2.36 | 2.05 |
| m-B11       | 2.52   | 2.13 | 1.99 | 1.68 |

|       |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|
| m-B12 | 2.95 | 2.54 | 2.71 | 2.01 |
| m-B13 | 2.44 | 2.77 | 2.56 | 2.54 |
| m-B14 | 2.99 | 2.44 | 2.68 | 2.51 |

Los resultados mostraron que, en las células HEK293, los cambios en los elementos 3'UTR podían afectar a la cantidad de expresión de las proteínas diana. Excepto el elemento B5-3'UTR, los demás elementos 3'UTR podían aumentar la cantidad de expresión de la proteína en más de 1.2 veces, y se observaron diferencias significativas en los distintos momentos de detección ( $p < 0.05$ ). Entre ellos, los elementos 3'UTR de B12, B13 y B14 mostraron el mejor efecto, ya que podían aumentar la cantidad de expresión proteica en más de 2 veces y presentaban una buena continuidad a lo largo del tiempo.

### 3) Determinación de la regulación de la expresión del gen diana por los 5'UTR en las células

Para determinar la capacidad de diferentes 5'UTR para regular la duración de la expresión del gen diana en las células, se preparó ARNm que expresaba luciferasa (Fluc) mediante el método mencionado anteriormente. Los ARN usados en la Tabla 6 y la Figura 4 se caparon con ARCA, y la estructura de la cola poli-A fue A120. Los ARN usados en la Tabla 7 y la Figura 5 se caparon con CleanCap, y la estructura de la cola poli-A fue A30L70. Los ARN anteriores se transfectaron respectivamente en células HEK293; los niveles de expresión de luciferasa se midieron a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la transfección. Los resultados se muestran en la Tabla 6, la Tabla 7 y la Figura 4, Figura 5.

Tabla 6. Cantidades de luciferasa (Fluc) expresadas por ARNm que portan diferentes 5'UTR (capping ARCA, todos los genes diana eran Fluc, todos los polyA eran A120)

| N.º de ARNm | N.º de secuencia de ARNm del 5'UTR | Número de secuencia de ARNm del 3'UTR | HEK293 |      |      |      |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------|------|------|------|
|             |                                    |                                       | 6 h    | 24 h | 48 h | 72 h |
| Mod.        | SEQ ID NO:105                      | $\alpha$ -globina (SEQ ID NO:106)     | 1      | 1    | 1    | 1    |
| m-A1        | SEQ ID NO: 72                      |                                       | 2.83   | 4.42 | 4.22 | 4.05 |
| m-A2        | SEQ ID NO: 73                      |                                       | 0.25   | 0.27 | 0.26 | 0.25 |
| m-A3        | SEQ ID NO: 74                      |                                       | 1.56   | 1.72 | 1.72 | 1.55 |
| m-A4        | SEQ ID NO: 75                      |                                       | 2.02   | 2.18 | 2.12 | 1.97 |
| m-A5        | SEQ ID NO: 76                      |                                       | 1.97   | 2.28 | 2.17 | 2.04 |
| m-A7        | SEQ ID NO: 78                      |                                       | 2.08   | 2.10 | 2.06 | 1.97 |
| m-A8        | SEQ ID NO: 79                      |                                       | 1.26   | 1.17 | 1.18 | 1.11 |

|       |               |  |      |      |      |      |
|-------|---------------|--|------|------|------|------|
| m-A9  | SEQ ID NO: 80 |  | 1.95 | 1.99 | 2.05 | 1.87 |
| m-A10 | SEQ ID NO: 81 |  | 1.69 | 1.70 | 1.78 | 1.55 |
| m-A11 | SEQ ID NO: 82 |  | 2.20 | 2.23 | 2.24 | 2.23 |
| m-A12 | SEQ ID NO: 83 |  | 1.51 | 1.48 | 1.36 | 1.34 |
| m-A13 | SEQ ID NO: 84 |  | 1.72 | 1.70 | 1.59 | 1.52 |
| m-A14 | SEQ ID NO: 85 |  | 1.80 | 1.97 | 1.81 | 1.73 |

Tabla 7. Cantidades de luciferasa (Fluc) expresadas por ARNm que portan diferentes 5'UTR (capping con CleanCap, todos los genes diana eran Fluc, todos los polyA eran A30L70)

| N.º de ARNm | N.º de secuencia de ARNm del 5'UTR | Número de secuencia de ARNm del 3'UTR | HEK293 |      |      |      |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------|------|------|------|
|             |                                    |                                       | 6 h    | 24 h | 48 h | 72 h |
| Mod.        | SEQ ID NO:105                      | $\alpha$ -globina<br>(SEQ ID NO:106)  | 1      | 1    | 1    | 1    |
| m-A15       | SEQ ID NO: 86                      |                                       | 2.07   | 2.31 | 2.73 | 3.11 |
| m-A16       | SEQ ID NO: 87                      |                                       | 1.54   | 2.09 | 2.50 | 3.17 |
| m-A17       | SEQ ID NO: 88                      |                                       | 1.19   | 1.36 | 1.59 | 2.01 |
| m-A18       | SEQ ID NO: 89                      |                                       | 1.47   | 1.95 | 2.50 | 2.94 |
| m-A19       | SEQ ID NO: 90                      |                                       | 1.14   | 1.25 | 1.56 | 2.06 |
| m-A20       | SEQ ID NO: 91                      |                                       | 0.76   | 0.86 | 1.24 | 1.38 |
| m-A21       | SEQ ID NO: 92                      |                                       | 1.43   | 1.69 | 2.23 | 2.59 |
| m-A22       | SEQ ID NO: 93                      |                                       | 0.53   | 0.69 | 0.88 | 0.97 |
| m-A23       | SEQ ID NO: 94                      |                                       | 0.13   | 0.20 | 0.24 | 0.29 |
| m-A24       | SEQ ID NO: 95                      |                                       | 1.37   | 1.98 | 2.40 | 2.70 |
| m-A25       | SEQ ID NO: 96                      |                                       | 1.03   | 0.98 | 1.20 | 1.27 |
| m-A26       | SEQ ID NO: 97                      |                                       | 0.70   | 0.69 | 0.93 | 0.89 |
| m-A27       | SEQ ID NO: 98                      |                                       | 1.62   | 1.62 | 2.09 | 1.94 |
| m-A28       | SEQ ID NO: 99                      |                                       | 1.39   | 1.34 | 1.76 | 1.65 |
| m-A29       | SEQ ID NO: 100                     |                                       | 1.01   | 1.04 | 1.28 | 1.34 |
| m-A30       | SEQ ID NO: 101                     |                                       | 1.37   | 1.27 | 1.13 | 1.06 |
| m-A31       | SEQ ID NO: 102                     |                                       | 1.17   | 1.09 | 1.34 | 1.43 |
| m-A32       | SEQ ID NO: 103                     |                                       | 1.31   | 1.41 | 1.64 | 1.60 |
| m-A33       | SEQ ID NO: 104                     |                                       | 1.31   | 1.20 | 1.44 | 1.42 |

para el cribado, respectivamente. Los resultados mostraron que, en diferentes vectores de cribado, los cambios en los elementos 5'UTR podían afectar a la cantidad de expresión de las proteínas diana, y que los elementos 5'UTR poseían universalidad a la hora de aumentar los niveles de expresión de las proteínas diana. Entre ellos, los elementos 5'UTR numerados A1, A3 a A7, A9 a A16, A18, A21, A24, A27, A28, A32 y A33 podían aumentar la cantidad de expresión de la proteína en más de 1.2 veces, y se observaron diferencias significativas en los puntos de detección de 24 h, 48 h y 72 h ( $p < 0.05$ ). Entre ellos, los elementos 5'UTR A1, A15, A16 y A18 mostraron el mejor efecto, ya que podían aumentar la cantidad de expresión proteica en más de 2 veces y presentaban una buena continuidad a lo largo del tiempo.

4) Determinación de la regulación de la intensidad de expresión del gen diana por los 5'UTR candidatos en comparación con el vector BioN. de control positivo

Para determinar la capacidad de diferentes 5'UTR candidatos para regular la intensidad de la expresión del gen diana en comparación con el vector BioN. de control positivo, se incorporaron los elementos 5'UTR óptimos A1, A15, A16 y A18, seleccionados previamente, a un vector que contenía un elemento de cola poli-A A30L70. Se preparó ARNm que expresaba luciferasa (Fluc) usando el método mencionado anteriormente y se transfectó en células HEK293. Los niveles de expresión de luciferasa se midieron a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la transfección. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y la Figura 6.

Tabla 8. Cantidades de luciferasa (Fluc) expresadas por ARNm que portan diferentes 5'UTR (capping con CleanCap, todos los genes diana eran Fluc, todos los polyA eran A30L70)

| N.º de ARNm | Número de secuencia de ARNm del 5'UTR | Número de secuencia de ARNm del 3'UTR | HEK293 |      |      |
|-------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------|------|------|
|             |                                       |                                       | 6 h    | 24 h | 48 h |
| BioN.       | SEQ ID NO:107                         | SEQ ID NO:108                         | 1      | 1    | 1    |
| m-A1        | SEQ ID NO:72                          | $\alpha$ -globina<br>(SEQ ID NO:106)  | 1.34   | 1.78 | 1.92 |
| m-A15       | SEQ ID NO: 86                         |                                       | 1.32   | 1.58 | 1.76 |
| m-A16       | SEQ ID NO: 87                         |                                       | 1.01   | 1.37 | 1.54 |
| m-A18       | SEQ ID NO: 89                         |                                       | 1.07   | 1.29 | 1.49 |

Los resultados mostraron que todos los elementos candidatos de la región 5'UTR podían aumentar la cantidad de expresión proteica en al menos más de 1.2 veces a las 24 h y 48 h en comparación con el vector BioN. de , y todos mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

5) Determinación de la regulación de la expresión del gen diana en las células mediante diferentes combinaciones de 5'UTR y 3'UTR

Para estudiar los efectos de diferentes combinaciones de 5'UTR y 3'UTR sobre la expresión de proteínas diana por parte de los ARNm, se compararon los ARNm que contenían diferentes combinaciones de elementos 5'UTR y 3'UTR con los 5'UTR y 3'UTR usados por Moderna. Los resultados se muestran en la Tabla 9 y la Figura 7.

5

Tabla 9. Cantidades de expresión de los ARNm que portan diferentes combinaciones de 5'UTR y 3'UTR

(capping con CleanCap, todos los genes diana eran Fluc, todos los polyA eran A30L70)

| N.º de ARNm | Número de secuencia de ARNm del 5'UTR | Número de secuencia de ARNm del 3'UTR | HEK293 |      |      |      |
|-------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------|------|------|------|
|             |                                       |                                       | 6 h    | 24 h | 48 h | 72 h |
| Mod.        | SEQ ID NO:105                         | SEQ ID NO: 106                        | 1      | 1    | 1    | 1    |
| m-A1-B12    | SEQ ID NO:72                          | SEQ ID NO:69                          | 2.78   | 3.06 | 2.46 | 2.96 |
| m-A1-B13    |                                       | SEQ ID NO: 70                         | 2.62   | 2.67 | 2.30 | 2.57 |
| m-A1-B14    |                                       | SEQ ID NO: 71                         | 2.20   | 2.14 | 1.74 | 1.90 |
| m-A15-B12   | SEQ ID NO:86                          | SEQ ID NO: 69                         | 2.11   | 2.14 | 1.78 | 1.90 |
| m-A15-B13   |                                       | SEQ ID NO: 70                         | 2.04   | 2.15 | 1.74 | 1.87 |
| m-A15-B14   |                                       | SEQ ID NO: 71                         | 2.09   | 1.90 | 1.68 | 1.68 |
| m-A16-B12   | SEQ ID NO:87                          | SEQ ID NO: 69                         | 2.32   | 2.02 | 1.82 | 1.81 |
| m-A16-B13   |                                       | SEQ ID NO: 70                         | 2.43   | 1.96 | 1.78 | 1.89 |
| m-A16-B14   |                                       | SEQ ID NO: 71                         | 2.30   | 1.79 | 1.63 | 1.68 |
| m-A18-B12   | SEQ ID NO:89                          | SEQ ID NO: 69                         | 1.87   | 1.90 | 1.27 | 1.41 |
| m-A18-B13   |                                       | SEQ ID NO: 70                         | 2.17   | 2.31 | 1.71 | 2.08 |
| m-A18-B14   |                                       | SEQ ID NO: 71                         | 1.40   | 1.66 | 1.31 | 1.51 |

10 Los resultados mostraron que, en comparación con los elementos 5'UTR y 3'UTR usados por Moderna, las combinaciones de elementos 5'UTR y 3'UTR seleccionadas en la presente descripción podían aumentar la cantidad de expresión de proteína en más de 1.3 veces en los puntos de detección de 24 h, 48 h y 72 h, y todas mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las proteínas diana en los puntos 1) a 5) anteriores eran todas luciferasa (Fluc); las proteínas

15 diana en el punto 6) siguiente eran proteínas secretoras (p. ej., hHGF, anticuerpo anti-PD-1).

6) Determinación de la regulación de la expresión de la proteína diana secretora mediante

diferentes combinaciones de 5'UTR y 3'UTR

Para estudiar los efectos de diferentes combinaciones de UTR 5' y UTR 3' sobre la expresión de proteínas secretoras por parte de los ARNm, en el presente trabajo se construyó el ARNm de tal forma que la proteína diana expresada por el ORF fuera el factor de crecimiento de los hepatocitos humanos (hHGF) o el anticuerpo anti-PD-1 ( ).

La secuencia de aminoácidos del hHGF es la que se muestra en la SEQ ID NO: 109, y su secuencia de ADN es la que se muestra en la SEQ ID NO: 110; tras la optimización de los codones, se obtuvieron los ARNm OS1, OS2 y OS3, y sus secuencias de codones optimizadas son las que se muestran en las SEQ ID NO: 129 a 131.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo PD-1 son las que se muestran en las SEQ ID N.º: 117 y 118, respectivamente; las secuencias de ADN de la cadena pesada y la cadena ligera son las que se muestran en las SEQ ID N.º: 119 y 120, respectivamente; las secuencias de ARNm de la cadena pesada y la cadena ligera son las que se muestran en las SEQ ID N.º: 121 y 122, respectivamente.

En primer lugar, con el fin de mejorar la eficiencia de traducción de la proteína hHGF, se llevó a cabo una optimización de codones en la secuencia de nucleótidos de la hHGF de tipo salvaje (SEQ ID NO: 110). Las secuencias optimizadas incluyeron hHGF-OS1 (SEQ ID NO: 111), hHGF-OS2 (SEQ ID NO: 112) y hHGF-OS3 (SEQ ID NO: 113), y las secuencias de ARNm correspondientes son las que se muestran en los SEQ ID NOs: 129 a 131, respectivamente. Las secuencias mencionadas anteriormente de hHGF natural y hHGF con codones optimizados se construyeron en vectores para producir ARNm. La cantidad de expresión de la proteína hHGF se detectó mediante ELISA, lo que demostró que las secuencias de hHGF con codones optimizados podían aumentar la cantidad de expresión de la proteína hHGF.

El ARNm que expresa hHGF-OS2 y que contiene diferentes combinaciones de elementos 5'UTR y 3'UTR (la secuencia de ADN correspondiente es la SEQ ID NO: 112) se comparó con el ARNm Mod.(hHGF) que expresa hHGF-OS2 y que contiene una combinación de elementos 5'UTR y 3'UTR de Moderna (la secuencia de ADN correspondiente es la SEQ ID NO: 114). Se transfectaron células HEK293 con el ARNm que codifica hHGF. Se recogieron los sobrenadantes a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la transfección, y se determinó la cantidad de expresión de la proteína hHGF mediante ELISA para evaluar el aumento o la prolongación de la expresión de HGF por los vectores candidatos. Los resultados se muestran en la Tabla 10 y la Figura 8A.

Tabla 10. Cantidades de expresión de la proteína diana de los ARNm que portan diferentes combinaciones de 5'UTR y 3'UTR

(capping CleanCap, todos los genes diana eran hHGF, todos los polyA eran A30L70)

| N.º de ARNm<br>(número de<br>secuencia) | Número de<br>secuencia de<br>ARNm del<br>5'UTR | Número de<br>secuencia del<br>ARNm del<br>3'UTR | Cantidad de proteína hHGF<br>(ng/mL) |       |       |       |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|-------|-------|-------|
|                                         |                                                |                                                 | 6 h                                  | 24 h  | 48 h  | 72 h  |
| Mod. (hHGF)<br>(SEQ ID NO:114)          | SEQ ID NO:<br>105                              | SEQ ID NO:<br>106                               | 1.16                                 | 21.83 | 26.89 | 15.37 |
| m-A1-B12(hHGF)<br>(SEQ ID NO:115)       | SEQ ID NO:72                                   | SEQ ID NO:69                                    | 2.06                                 | 38.65 | 41.49 | 23.76 |
| m-A1-B13(hHGF)                          |                                                | SEQ ID NO:<br>70                                | 1.98                                 | 30.19 | 30.57 | 19.00 |
| m-A1-B14(hHGF)                          |                                                | SEQ ID NO:<br>71                                | 2.27                                 | 34.61 | 37.75 | 19.33 |
| m-A15-B12(hHGF)<br>(SEQ ID NO:116)      | SEQ ID NO:86                                   | SEQ ID NO:69                                    | 1.84                                 | 33.15 | 36.79 | 19.06 |
| m-A15-B13(hHGF)                         |                                                | SEQ ID NO:<br>70                                | 2.14                                 | 31.68 | 36.60 | 25.04 |
| m-A15-B14(hHGF)                         |                                                | SEQ ID NO:71                                    | 1.74                                 | 30.08 | 26.85 | 14.81 |
| m-A16-B12(hHGF)<br>(SEQ ID NO:127)      | SEQ ID NO:87                                   | SEQ ID NO:69                                    | 2.34                                 | 40.39 | 42.82 | 24.50 |
| m-A16-B13(hHGF)                         |                                                | SEQ ID NO: 70                                   | 1.95                                 | 30.53 | 32.31 | 20.36 |
| m-A16-B14(hHGF)                         |                                                | SEQ ID NO:<br>71                                | 2.22                                 | 33.56 | 37.61 | 21.10 |
| m-A18-B12(hHGF)                         | SEQ ID NO:89                                   | SEQ ID NO:69                                    | 2.45                                 | 49.06 | 55.14 | 30.24 |
| m-A18-B13(hHGF)                         |                                                | SEQ ID NO:<br>70                                | 1.94                                 | 38.38 | 38.05 | 25.52 |
| m-A18-B14(hHGF)                         |                                                | SEQ ID NO:<br>71                                | 1.93                                 | 36.75 | 38.37 | 23.25 |

Se comparó el ARNm de longitud completa que expresa el anticuerpo anti-PD-1 y que contiene diferentes combinaciones de elementos 5'UTR y 3'UTR (las secuencias de ADN correspondientes son los N.º de identificación de secuencia: 124 a 125) con el ARNm que expresa el anticuerpo anti-PD-1 y que contiene una combinación de elementos 5'UTR y 3'UTR de Moderna (la secuencia de ADN correspondiente es el N.º de identificación de secuencia: 123). Se transfectaron células HEK293 con el ARNm de longitud completa que codifica el anticuerpo

anti-PD-1. Se recogieron los sobrenadantes a las 6 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la transfección, y se determinó la cantidad de expresión del anticuerpo anti-PD-1 mediante ELISA para evaluar el aumento o la prolongación de la expresión del anticuerpo anti-PD-1 por los vectores candidatos. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y la Figura 8B.

5

Tabla 11. Cantidades de expresión de la proteína diana de los ARNm que portan diferentes combinaciones de UTR 5' y UTR 3'

(capping con CleanCap; los genes diana fueron todos la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti-PD-1; los polyA fueron todos A30L70)

| N.º de ARNm (número de secuencia de ADN correspondiente) | Anticuerpo anti-PD-1 (ng/mL) |       |       |       |
|----------------------------------------------------------|------------------------------|-------|-------|-------|
|                                                          | 6 h                          | 24 h  | 48 h  | 72 h  |
| Mod. (PD-1 Ab) (SEQ ID NO:123)                           | 2.79                         | 23.11 | 30.04 | 28.23 |
| m-A1-B12 (PD-1 Ab) (SEQ ID NO:124)                       | 3.22                         | 33.47 | 52.50 | 43.19 |
| m-A15-B12 (anticuerpo PD-1) (SEQ ID NO:125)              | 2.77                         | 34.39 | 45.72 | 49.90 |

10

Los resultados anteriores mostraron que, tras la expresión continua de las proteínas secretoras hHGF y el anticuerpo anti-PD-1 durante 72 horas, las combinaciones de 5'UTR y 3'UTR seleccionadas en la descripción podían aumentar significativamente las cantidades de expresión de las proteínas secretoras en comparación con los elementos 5'UTR y 3'UTR usados por Moderna ( $p < 0.05$ ).

15

#### 1.4 Validación de la expresión de la proteína hHGF *in vivo* en ratones mediante ARNm que expresa hHGF

Con el fin de determinar la capacidad de la molécula de ARNm m-A16-B12 (hHGF) (la secuencia de ADN correspondiente es SEQ ID NO: 127) para expresar hHGF *in vivo* en animales, se usaron nanopartículas lipídicas LNP (compuestas por un 50 % molar de lípido ionizable (SM-102), un 10 % molar de DSPC, un 38.5 % molar de colesterol y un 1.5 % molar de PEG-DMG) para la administración del ARNm. Las mismas nanopartículas lipídicas (LNP) se usaron también en los Ejemplos 5 y 6 que figuran a continuación. El control positivo fue el plásmido Collategene (AnGes, Inc.), que se administró como plásmido desnudo e . Se dividió aleatoriamente a ratones Balb/c (6-8 semanas, machos) en 4 grupos de 33 ratones cada uno. Se inyectaron diferentes dosis de m-A16-B12 (hHGF) y del plásmido Collategene por vía intramuscular en los músculos gastrocnemios de los ratones. Los grupos experimentales se organizaron de acuerdo con el protocolo de la Tabla 12 de la siguiente manera: 1) se inyectó 1.0 µg/ratón de m-A16-B12 (hHGF);

20

25

2) se inyectaron 0.3 µg/ratón de m-A16-B12 (hHGF); 3) se inyectaron 0.1 µg/ratón de m-A16-B12 (hHGF); 4) se inyectaron 200 µg/ratón de plásmido desnudo Collategene. Se obtuvieron muestras del músculo gastrocnemio de ratón a las 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h, 216 h y 336 h. Los tejidos musculares se homogeneizaron y lisaron usando una solución reguladora de lisis RIPA que contenía inhibidores de proteasas. Se recogió el sobrenadante tras la centrifugación y se determinó la concentración de proteína hHGF usando un kit de ensayo de concentración de proteínas BCA. El nivel de expresión de hHGF se evaluó mediante un método ELISA. Los datos de cada grupo se expresan como media ± desviación estándar (media ± DE); se usó el software GraphPad Prism 9.0 para la representación gráfica y el análisis estadístico.

Tabla 12. Agrupación experimental de la expresión de hHGF *in vivo* por m-A16-B12 (hHGF) y Collategene

| Grupo                        | G1                                                                                                             | G2               | G3               | G4               |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Número de animales           | 33                                                                                                             | 33               | 33               | 33               |
| Agente analizado             | Plásmido (Collategene)                                                                                         | m-A16-B12 (hHGF) | m-A16-B12 (hHGF) | m-A16-B12 (hHGF) |
| Dosis                        | 200 µg                                                                                                         | 0.1 µg           | 0.3 µg           | 1.0 µg           |
| Vía de administración        | i.m.                                                                                                           |                  |                  |                  |
| Frecuencia de administración | Dosis única                                                                                                    |                  |                  |                  |
| Indicador                    | Se recogieron muestras de plasma y músculo para determinar el contenido de proteína hHGF                       |                  |                  |                  |
| Recolección de muestras      | Las muestras se tomaron 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, D7, D10 y D14 después de la administración |                  |                  |                  |

Los resultados experimentales se muestran en la parte A de la Figura 9. m-A16-B12 (hHGF) pudo expresar la proteína hHGF 1 h después de la inyección intramuscular, alcanzándose un pico de expresión a las 6 h tras la inyección de forma dependiente de la dosis. Como se muestra en la parte B de la Figura 9, Collategene alcanzó un pico de expresión a los 7 días tras la inyección. La cantidad de expresión de la proteína disminuyó a las 48 h tras la administración de m-A16-B12 (hHGF). La cantidad de expresión de la proteína con una dosis de 1 µg/ratón de m-A16-B12 (hHGF) a las 72 h fue comparable a la de Collategene. Al mismo tiempo, el análisis

estadístico de los datos farmacocinéticos de cada grupo reveló que, incluso con la dosis más baja de 0.1 µg de m-A16-B12 (hHGF), su  $C_{\max}$  era más de 5 veces superior a la de Collategene, y el  $AUC_{\text{inf}}$  (hr\*pg/mg de proteína) de 0.1 µg de m-A16-B12 (hHGF) también era comparable a la de Collategene (Tabla 13). Por lo tanto, el m-A16-B12 (hHGF) pudo lograr una expresión de alta eficiencia de hHGF *in vivo* en animales, y no se detectó expresión de hHGF en plasma en ningún punto temporal.

Tabla 13. Resultados de la expresión de hHGF *in vivo* mediante m-A16-B12 (hHGF) y Collategene

| Ruta | Agente analizado | Dosis (µg) | $C_{\max}$<br>(pg/mg de proteína) | $AUC_{0-\text{inf}}$<br>(h*pg/mg de proteína) | $MRT_{0-\text{inf}}$ (h) |
|------|------------------|------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------|
| I.M. | m-A16-B12 (hHGF) | 0.1 µg     | 369.1 ± 24.8                      | 16 158.3 ± 978.7                              | 201.5 ± 73.8             |
|      |                  | 0.3 µg     | 463.1 ± 16.5                      | 20 133.6 ± 770.2                              | 125.9 ± 26.4             |
|      |                  | 1 µg       | 570.6 ± 42.5                      | 29 652.8 ± 2 555.9                            | 142.8 ± 71.9             |
|      | Collategene      | 200 µg     | 78.0 ± 5.7                        | 15 300.4 ± 491.2                              | 183.5 ± 3.0              |

### 1.5 Validación de la función terapéutica del ARNm que expresa hHGF en un modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores

El modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores es un modelo clásico que simula la isquemia crítica de las extremidades en humanos. Se usaron ratones Balb/c machos de entre 6 y 8 semanas de edad para el modelo, de la siguiente manera: 1) Se anestesiaba al animal y se colocaba en posición supina sobre una mesa de operaciones; se depilaban y fijaban completamente las extremidades posteriores, y se desinfectaba la piel de la zona quirúrgica; 2) Se realizó una incisión cutánea de aproximadamente 1 cm de longitud desde la rodilla hasta la parte interna del muslo; se incisa y disecciona el tejido adiposo subcutáneo para exponer completamente la arteria femoral; 3) Se perforó suavemente la vaina femoral membranosa con microtijeras para exponer el haz neurovascular; se aisló la posición proximal de la arteria femoral de la vena femoral y el nervio cerca de la ingle; tras un aislamiento limpio, se ligó el extremo proximal de la arteria femoral con una sutura 6-0 por debajo del extremo proximal de la arteria femoral; 4) La arteria femoral y la vena femoral se separaron en un extremo distal cerca de la rodilla; el extremo distal de la arteria femoral se ligó por debajo del extremo distal con una sutura 6-0 en el extremo proximal de la arteria poplítea; 5) Se suturó la herida.

Se usaron los LNP del ejemplo 1.4 como vector para administrar m-A16-B12 (hHGF); Collatogene se administró en forma de plásmido desnudo. Los ratones del modelo de isquemia de las extremidades posteriores se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 5 ratones cada uno. Se inyectó intramuscularmente m-A16-B12 (hHGF) y el plásmido desnudo Collatogene en los

5 músculos gastrocnemios de los ratones, respectivamente. La agrupación experimental fue la siguiente: 1) se inyectaron 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF); 2) se inyectaron 50 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF); 3) se inyectaron 200 µg/ratón de plásmido desnudo Collatogene; 4) se inyectó un volumen equivalente de PBS como grupo de control. El día de la inducción del modelo se consideró el día 0. Se observó el estado de las extremidades en los días 0, 4, 7, 10, 12 y 14

10 tras el tratamiento en cada grupo. Se detectó el estado de perfusión sanguínea en las extremidades posteriores de los ratones usando un medidor de flujo sanguíneo y se tomaron fotografías.

La relación de perfusión sanguínea de cada grupo se calculó según la siguiente fórmula: relación de perfusión sanguínea = volumen de perfusión sanguínea en la extremidad posterior de un ratón el día / volumen de perfusión sanguínea en la extremidad posterior del ratón el día 0

15  $\times 100 \%$ . Los datos de cada grupo se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (media  $\pm$  DE); se usó el software GraphPad Prism 9.0 para la representación gráfica y el análisis estadístico.

Los resultados se muestran en la Figura 10A y la Figura 10B; en el caso en que se inyectaron 50 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) y 200 ng/ratón del plásmido desnudo Collatogene para el tratamiento, la relación de perfusión sanguínea de las extremidades

20 posteriores isquémicas de cada ratón mejoró significativamente en relación con el grupo de control, y la relación de perfusión sanguínea de las extremidades posteriores isquémicas se recuperó gradualmente con el tiempo. Entre ellos, el grupo al que se le inyectaron 50 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) mostró un efecto de recuperación del flujo sanguíneo similar al del grupo al que se le inyectaron 200 ng/ratón del plásmido desnudo Collatogene. En particular, el grupo al

25 que se le inyectaron 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) fue significativamente superior al grupo al que se le inyectaron 200 ng/ratón del plásmido desnudo Collatogene en cuanto al efecto de recuperación del flujo sanguíneo, logrando una recuperación de más del 90 % en la perfusión sanguínea.

30 Con el fin de determinar con mayor precisión el efecto terapéutico de m-A16-B12 (hHGF) sobre el grado de necrosis de las extremidades posteriores en el modelo murino de isquemia de las extremidades posteriores, se observó y fotografió el estado de las patas de los ratones el día 14 tras la administración, y se puntuó el grado de necrosis de las extremidades posteriores de los ratones según los criterios que se muestran en la Figura 11A. Los criterios usados fueron los

35 siguientes: 0 = autodesprendimiento de la extremidad posterior; 1 = necrosis de la pata; 2 =

necrosis del pie; 3 = > 2 dedos descoloridos; 4 = 1 dedo descolorido; 5 = > 2 uñas descoloridas; 6 = 1 uña descolorida; 7 = sin necrosis. Los datos de cada grupo se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (media  $\pm$  DE); se usó el software GraphPad Prism 9.0 para la representación gráfica y el análisis estadístico.

5 Los resultados se muestran en la Figura 11B. Tras inducir isquemia en las extremidades posteriores de los ratones, los ratones del grupo de control presentaron una necrosis isquémica evidente en las extremidades posteriores en las dos semanas posteriores a la intervención quirúrgica y, para el día 14, las extremidades posteriores de algunos ratones se desprendieron por completo. En los grupos de tratamiento a los que se inyectó m-A16-B12 (hHGF) y el plásmido desnudo Collatogene, las extremidades posteriores de todos los ratones pudieron mantener una  
10 buena integridad y no se produjo necrosis en las extremidades posteriores, lo que indica que m-A16-B12 (hHGF) poseía una capacidad para mejorar la isquemia de las extremidades posteriores comparable a la del plásmido desnudo Collatogene de control.

El CD31 es un marcador importante de la angiogénesis. Para determinar el efecto de m-A16-B12 (hHGF) en la promoción de la angiogénesis en el modelo murino de isquemia de las  
15 extremidades posteriores, se tomaron muestras del músculo gastrocnemio cerca de los tejidos isquémicos de los ratones el día 14 tras la administración y se prepararon secciones de parafina. El CD31 en las muestras de los cortes se sometió a tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-CD31 y se fotografió. Las imágenes se analizaron usando el software ImageJ (NIH) y se  
20 calculó el área de tinción de CD31. Los datos de cada grupo se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (media  $\pm$  DE); se usó el software GraphPad Prism 9.0 para la representación gráfica y el análisis estadístico.

Los resultados se muestran en la Figura 12. En los casos en los que se administraron 50  
ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) y 200 ng/ratón del plásmido desnudo Collatogene  
25 se administraron por vía e a para el tratamiento, la angiogénesis en los músculos de las extremidades posteriores isquémicas de cada grupo se promovió de forma significativa, y el número de vasos sanguíneos de nueva formación presentó una diferencia estadística significativa en relación con el grupo PBS ( $p < 0.05$ ). El grupo de 50 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) mostró un efecto promotor de la angiogénesis comparable al de 200 ng/ratón del  
30 plásmido desnudo Collatogene; los grupos de administración de m-A16-B12 (hHGF) mostraron una promoción de la angiogénesis dependiente de la dosis.

### **1.6 Validación de la función terapéutica del ARNm que expresa hHGF en un modelo de ratón Db/Db con lesión cutánea de espesor total**

35 El modelo de ratón Db/Db es un modelo clásico de ratón diabético, que presenta un defecto

en el gen del receptor de leptina. Como resultado, los ratones muestran características similares a las de los pacientes diabéticos, como hiperglucemia, hiperlipidemia y resistencia a la insulina, a medida que aumenta su edad en semanas. En este experimento, se usó un modelo de lesión cutánea de espesor total para simular las lesiones cutáneas en pacientes con pie diabético que son difíciles de curar. El método para modelar el mencionado modelo de ratón Db/Db fue el siguiente: se anestesiaron los ratones Db/Db y se les depiló con crema depilatoria, y se desinfectaron con bolas de algodón impregnadas en alcohol al 75 %. Se usó un punzón de biopsia cutánea de 8 mm de diámetro para crear heridas cutáneas de espesor total en la zona lumbar.

Con el fin de determinar el efecto terapéutico de m-A16-B12 (hHGF) en la cicatrización de heridas en el modelo murino de lesión cutánea de espesor total, se usaron las LNP del ejemplo 1.4 para administrar m-A16-B12 (hHGF); el Collategene de control se administró en forma de plásmido desnudo. El método de administración fue la inyección subcutánea en 4 puntos. Los ratones Db/Db del modelo de lesión cutánea de espesor total se dividieron en 5 grupos según el peso corporal y el nivel de glucosa en sangre, con 7 ratones en cada grupo. La agrupación experimental fue la siguiente: 1) se inyectaron 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF); 2) se inyectaron 200 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF); 3) se inyectaron 50 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF); 4) se inyectaron 200 µg/ratón de plásmido desnudo Collategene; 5) un grupo de control al que se inyectó un volumen equivalente de PBS. El día de la modelización se consideró el día 0. Tras realizar los tratamientos en cada grupo, se observaron las condiciones de cicatrización de la herida los días 0, 3, 5, 7, 10, 12 y 14, respectivamente. Se fotografiaron las zonas de la herida, se analizaron las imágenes con el software ImageJ (NIH) y se calculó el área de la herida.

El porcentaje de cicatrización de la herida se calculó según la siguiente fórmula:  $P = (AD - A0) / A0 \times 100 \%$  (P: porcentaje de cicatrización de la herida; AD: área de la herida el día de la fotografía; A0: área de la herida el día después de la cirugía).

El porcentaje de cicatrización de la herida de cada grupo se expresa como media  $\pm$  desviación estándar (media  $\pm$  DE); se usó el software GraphPad Prism 9.0 para la representación gráfica y el análisis estadístico.

Los resultados se muestran en la Figura 13. Bajo los tratamientos con 50 ng/ratón, 200 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) y 200 µg/ratón del plásmido desnudo Collategene, las heridas de los ratones se curaron bien en comparación con el grupo de control. Además, la promoción de la cicatrización de las heridas en ratones por parte de m-A16-B12 (hHGF) fue dependiente de la dosis. El día 14, la tasa de cicatrización de las heridas con una dosis de 50 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) alcanzó el 66 %, y las dosis de 200 ng/ratón y 500 ng/ratón de m-A16-B12 (hHGF) lograron una cicatrización del 100 %. Además, la promoción de la

cicatrización de la herida por m-A16-B12 (hHGF) fue significativamente superior a la de 200 µg/ratón del plásmido desnudo Collategene ( $p < 0.05$ ). Incluso la dosis más baja (50 ng/ratón) de m-A16-B12 (hHGF) mostró un porcentaje de cicatrización de la herida con una diferencia significativa respecto al del plásmido desnudo Collategene a 200 µg/ratón ( $p < 0.05$ ).

5 Con el fin de determinar el efecto terapéutico de m-A16-B12 (hHGF) sobre la remodelación tisular en el modelo murino de lesión cutánea de espesor total, se evaluaron la regeneración epitelial y la remodelación tisular mediante tinción de Masson. El día 17 tras la administración, se recogieron muestras de piel de espesor total de los ratones y se prepararon cortes en parafina. Se usó la tinción de Masson para teñir los tejidos cutáneos de los ratones.

10 Los resultados se muestran en la Figura 14. Con el tratamiento con m-A16-B12 (hHGF), se logró una cobertura epitelial completa en el epitelio de las heridas de los ratones de todos los grupos. El epitelio de las heridas del grupo de dosis baja presentaba un engrosamiento anormal y proliferación de colágeno. El epitelio de los grupos de dosis media y alta recuperó su grosor normal y el colágeno se dispuso de forma ordenada, completando la remodelación tisular. Sin embargo, el grupo de control y el grupo tratado con el plásmido desnudo Collategene a 200 µg/ratón no completaron la recobertura epitelial, y se produjo una proliferación anormal de colágeno y un desorden estructural en las heridas.

## **Ejemplo 2:**

20 Preparación de partículas lipídicas LNP

El compuesto 1 (el compuesto representado por la Fórmula I, preparado con referencia a WO2023125738A), DSPC, colesterol y la solución de DMG-PEG 2000 se mezclaron en un determinado porcentaje molar (mol %, es decir, el porcentaje de la cantidad molar de cada componente respecto a la cantidad molar de lípidos totales presentes en la nanopartícula lipídica) para formular una solución lipídica de etanol. La relación molar de los cuatro componentes se formuló tal y como se muestra en la Tabla 14. El ARNm que codifica la proteína luciferasa se disolvió en una solución reguladora de acetato de pH 4 para formular una solución acuosa de ARNm. La solución lipídica de etanol y la solución acuosa de ARNm se mezclaron en una proporción volumétrica de 1:3 mediante un dispositivo microfluídico, y se preparó el liposoma con una proporción en peso de lípidos totales respecto al ARNm de aproximadamente 20:1. Se eliminó el etanol mediante diálisis en una solución de Tris 20 mM para obtener una composición de nanopartículas liposomales que encapsulaba el ARNm.

Caracterización de la composición de las partículas lipídicas

Métodos de caracterización

35 El tamaño de las nanopartículas y el índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas

liposomales se determinaron mediante dispersión dinámica de luz usando un Malvern Zetasizer Pro en un modo de detección de retrodispersión a 173°.

La eficiencia de encapsulación de las nanopartículas liposomales se determinó usando un kit de ensayo cuantitativo de ARN Quant-iT RiboGreen.

5

Tabla 14

| N.º | Compuesto 1<br>% mol | DSP C<br>% mol | Coolesterol<br>% mol | PEG-DMG<br>% mol | Tamaño de partícula<br>nm | PDI  | Eficiencia de encapsulación<br>% |
|-----|----------------------|----------------|----------------------|------------------|---------------------------|------|----------------------------------|
| 1   | 48.0                 | 10.0           | 40.5                 | 1.5              | 90.8                      | 0.12 | 97                               |

### Ejemplo 3:

#### Liofilización de composiciones de partículas lipídicas

10 Se prepararon nanopartículas lipídicas según el ejemplo 2. Las nanopartículas lipídicas preparadas se transfirieron a una solución reguladora de formulación liofilizado (que contenía Tris 20 mM, pH 7.5, sacarosa al 8 %, trehalosa al 5 % y soluciones de cloruro de sodio de diferentes concentraciones según la tabla siguiente) mediante ultrafiltración. La solución de formulación liofilizada de las nanopartículas lipídicas se introdujo en viales de 2 ml a razón de 15 0.6 ml por vial, con una concentración del lípido catiónico en cada vial de 1.78 mg/ml. Los viales se colocaron en un liofilizador; se realizó una precongelación a -45 °C durante 3 horas, un secado primario a -40 °C durante 30 horas y un secado secundario a 30 °C durante 10 horas, respectivamente, a un grado de vacío de 0.05 mmbar. El producto liofilizado final se obtuvo tras sacarlo del liofilizador.

20 Se tomó el producto liofilizado y se reconstituyó añadiendo 0.6 ml de agua para inyección. El tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas se determinó según el método mencionado anteriormente. Se compararon los tamaños de partícula de las nanopartículas lipídicas antes y después de la liofilización. Los resultados se muestran en la Tabla 15 y en las Figuras 15 a 17.

25

Tabla 15

| N.º | Concentración de NaCl (mM) | Relación de masa entre cloruro de sodio y lípido | Tamaño de partícula antes de la liofilización | Tamaño de las partículas (nm) tras la liofilización y | Tasa de variación (%) |
|-----|----------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|
|-----|----------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|

|              |     | cati3nico | (nm) | la<br>reconstituci3n |      |
|--------------|-----|-----------|------|----------------------|------|
| F3rmula<br>1 | 0   | 0         | 94.3 | 186.7                | 98.0 |
| F3rmula<br>2 | 25  | 1:1.2     | 86.4 | 128.2                | 48.4 |
| F3rmula<br>3 | 50  | 1.6:1     | 85.4 | 118.3                | 38.5 |
| F3rmula<br>4 | 100 | 3.3:1     | 73.7 | 99.2                 | 34.6 |

Las soluciones madre de las nanopartículas lipídicas anteriores se diluyeron a concentraciones de 1/2 y 1/3 usando la soluci3n reguladora de formulaci3n liofilizado, respectivamente. Las nanopartículas lipídicas obtenidas se llenaron y se liofilizaron de acuerdo con los funcionamientos experimentales anteriores. Se determinaron los tamaños de partícula de las nanopartículas lipídicas tras la liofilizaci3n y la reconstituci3n, respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16

| N.º          | Concentraci3n<br>de NaCl (mM) | Relaci3n de<br>masa entre el<br>cloruro de<br>sodio y el<br>lípido<br>cati3nico | Tamaño de<br>las<br>partículas<br>antes de la<br>liofilizaci3n<br>(nm) | Tamaño de<br>las partículas<br>(nm) tras la<br>liofilizaci3n y<br>la<br>reconstituci3n<br>c | Tasa de<br>variaci3n<br>(%) |
|--------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| F3rmula<br>5 | 100                           | 6.6:1                                                                           | 74.7                                                                   | 101.4                                                                                       | 35.7                        |
| F3rmula<br>6 | 100                           | 9.9:1                                                                           | 73.4                                                                   | 100.4                                                                                       | 36.8                        |

Las nanopartículas lipídicas bien preparadas se intercambiaron por otras soluciones reguladoras de formulaci3n liofilizados (que contenían Tris 20 mM, pH 7.5, sacarosa al 8 % y soluciones de cloruro de sodio de diferentes concentraciones, segun se indica en la tabla siguiente) mediante ultrafiltraci3n para el intercambio de líquidos. La soluci3n de la formulaci3n

lío­filizada de las nanopar­tí­culas lipídicas se introdujo en viales de 2 ml a razón de 0.6 ml por vial, con una concentración del lípido catiónico en cada vial de 2.38 mg/ml. Los viales se colocaron en un liofilizador. La precon­gelación se realizó a -45 °C durante 3 horas, el secado primario se realizó a -40 °C durante 30 horas y el secado secundario se realizó a 30 °C durante 10 horas, respectivamente, a un grado de vacío de 0.05 mmbar. El producto liofilizado final se obtuvo tras sacarlo del liofilizador.

Se tomó el producto liofilizado y se reconstituyó añadiendo 0.6 ml de agua para inyección; el tamaño de partícula de las nanopar­tí­culas lipídicas se determinó según el método mencionado anteriormente. Se compararon los tamaños de partícula de las nanopar­tí­culas lipídicas antes y después de la liofilización. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17

| N.º       | Concentración de NaCl (mM) | Relación de masa entre el cloruro de sodio y el lípido catiónico | Tamaño de partícula antes de la liofilización (nm) | Tamaño de las partículas (nm) tras la liofilización y la reconstitución | Tasa de variación (%) |
|-----------|----------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Fórmula 7 | 0                          | 0                                                                | 93.5                                               | 162.6                                                                   | 73.9                  |
| Fórmula 8 | 25                         | 1:1.6                                                            | 81.5                                               | 121.8                                                                   | 49.4                  |
| Fórmula 9 | 50                         | 1.2:1                                                            | 82.0                                               | 121.7                                                                   | 48.4                  |

#### Ejemplo 4:

Evaluación de la integridad del ARNm en composiciones de nanopar­tí­culas lipídicas

Las nanopar­tí­culas lipídicas liofilizadas se prepararon según el ejemplo 3. La integridad del ARNm en cada grupo de muestras se determinó usando un instrumento de electroforesis capilar (Agilent 5200 Fragment Analyzer), respectivamente.

El ARNm se degrada fácilmente y se ve afectado por la temperatura; a medida que la temperatura aumenta, la estabilidad del ARNm disminuye. Con la prolongación del tiempo de almacenamiento, se produce degradación y la integridad disminuye en condiciones de alta temperatura. Durante el proceso de liofilización, se produce un aumento de la temperatura desde el secado primario hasta el secundario, y la temperatura del secado secundario es relativamente

alta. Por lo tanto, se evaluaron los efectos del cloruro de sodio en diferentes formulaciones sobre la integridad del ARNm durante el proceso de liofilización y en condiciones de almacenamiento a alta temperatura. Como se muestra en la Tabla 18 y en las Figura 18 a Figura 21, con el aumento de la concentración de cloruro de sodio, la integridad del ARNm tras su extracción del liofilizador aumentó. De manera similar, en condiciones de almacenamiento a alta temperatura de 37 °C, con el aumento de la concentración de cloruro de sodio, la integridad del ARNm aumentó.

Tabla 18

| N.º       | Concentración de NaCl (mM) | Integridad del ARNm (%)       |                       |
|-----------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|
|           |                            | Tras sacarlo del liofilizador | Tras 72 horas a 37 °C |
| Fórmula 1 | 0                          | 87.7                          | 72.7                  |
| Fórmula 2 | 25                         | 88.1                          | 75.3                  |
| Fórmula 3 | 50                         | 88.3                          | 76.6                  |
| Fórmula 4 | 100                        | 91.8                          | 81.3                  |
| Fórmula 7 | 0                          | 86.9                          | 72.9                  |
| Fórmula 8 | 25                         | 87.2                          | 77.2                  |
| Fórmula 9 | 50                         | 90.2                          | 80.0                  |

### Ejemplo 5:

Evaluación de la eficiencia de la administración de ARNm mediante nanopartículas lipídicas en células

Se sembraron células HEK 293 en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche, hasta que la densidad celular alcanzó más del 80 %; a continuación, se añadieron al medio de cultivo en los pocillos de la placa celular las soluciones de nanopartículas lipídicas que encapsulaban el ARNm de luciferasa (el producto liofilizado de la fórmula 7 y el producto liofilizado de la fórmula 9). La dosis de ARNm fue de 100 ng/pocillo. Tras 24 horas, se determinó

la intensidad de fluorescencia de la proteína luciferasa expresada usando un kit de ensayo de reportero de luciferasa (Promega) y un lector de microplacas. El valor de intensidad de fluorescencia fue el valor de fluorescencia determinado por el lector de microplacas, que representaba la cantidad de expresión de la proteína luciferasa. Cuanto mayor era la intensidad de fluorescencia, mayor era la cantidad de expresión de la proteína. La intensidad de fluorescencia media para las nanopartículas lipídicas correspondientes a cada fórmula se calculó a partir de al menos 3 réplicas.

Tabla 19

| N.º       | Intensidad de fluorescencia media |
|-----------|-----------------------------------|
| Fórmula 7 | 2.34E+07                          |
| Fórmula 9 | 4.12E+07                          |

Conclusión: Tal y como muestran las intensidades de fluorescencia de la Tabla 19 y la Figura 22, la cantidad de expresión del producto de nanopartículas lipídicas liofilizadas correspondiente a la fórmula 9 fue significativamente mayor que la de la fórmula 7. El símbolo \*\*\* de la Figura 22 representa una diferencia estadísticamente significativa, con  $P < 0.001$ .

#### **Ejemplo 6. Proceso de preparación de la formulación en aerosol de HGF-mRNA-LNP**

Preparación del polvo liofilizado de HGF-mRNA-LNP. HGF-mRNA-LNP (0.09 mg de m-A16-B12, 1.07 mg del lípido catiónico representado por la Fórmula I; los porcentajes molares del lípido catiónico, DSPC, colesterol y DMG-PEG 2000 en relación con el total de moles es de las nanopartículas lipídicas fueron del 48 % mol, 10 % mol, 40.5 % mol y 1.5 % mol, respectivamente) se preparó según el método del Ejemplo 2. El polvo liofilizado de HGF-mRNA-LNP (fórmula 10) se preparó según la fórmula 4 del Ejemplo 3. Se tomó el producto liofilizado y se reconstituyó añadiendo 0.6 ml de agua para inyección. El tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas se determinó según el método mencionado anteriormente. Se compararon los tamaños de partícula de las nanopartículas lipídicas antes y después de la liofilización. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20

| N.º | Concentración de NaCl (mM) | Relación de masa entre el | Tamaño de partícula | Tamaño de las partículas | Tasa de variación |
|-----|----------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|
|-----|----------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|

|            |     | cloruro de sodio y el lípido catiónico | antes de la liofilización (nm) | (nm) tras la liofilización y la reconstitución | (%)  |
|------------|-----|----------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------|------|
| Fórmula 10 | 100 | 3.3:1                                  | 76.8                           | 102.5                                          | 33.5 |

Se formuló un disolvente de reconstitución y se sometió a filtración esterilizante. Este se usó para reconstituir el polvo liofilizado de HGF-mRNA-LNP mencionado anteriormente con el fin de elaborar una formulación en aerosol.

5

#### **Ejemplo 7. Selección del componente del disolvente de reconstitución: el dispersante**

Cuando el mRNA-LNP se encuentra en forma de solución (tras la reconstitución del polvo liofilizado), sus partículas presentan problemas de estabilidad relativamente importantes, que se manifiestan en una tendencia a la agregación de partículas y al aumento del tamaño de estas.

10 Cuando el LNP se nebuliza a través de un dispositivo de administración por nebulización, las partículas de LNP tendrán una mayor probabilidad de agregarse bajo fuerzas mecánicas externas de compresión o cizallamiento. Para reducir el riesgo de que se produzca la agregación de partículas durante el proceso de nebulización del LNP, es necesario añadir un dispersante al disolvente de reconstitución. Se formularon disolventes de reconstitución de WFI, 0.2 % de PF68  
15 (poloxámero 188), 0.2 % de PF127 (poloxámero 407), 0.25 % de PVA (alcohol polivinílico), 0.1 % de HEC (hidroxietilcelulosa) y 1 % de PEG400 (polietilenglicol 400) se formularon respectivamente (en proporción en peso). La nebulización se realizó usando un dispositivo de administración nasal desechable, y la solución nebulizada se recogió a una distancia de 3 cm de la boquilla de nebulización. Se determinaron como indicadores de evaluación el tamaño de  
20 partícula, el PDI, el contenido total de ARNm y la eficiencia de encapsulación de la solución recolección tras la nebulización y de la solución reconstituida antes de la nebulización.

Los resultados se muestran en la Tabla 21. Cuando se usaron diferentes disolventes de reconstitución para reconstituir el polvo liofilizado de LNP, en comparación con la reconstitución con agua para inyección (WFI), solo la reconstitución con PF127 al 0.2 % dio lugar a una  
25 disminución significativa del tamaño de partícula del LNP (81.3 nm frente a 96.7 nm), lo que indica que la estructura del LNP podría haberse destruido tras la reconstitución con PF127 al 0.2 %. Tras la reconstitución con otros disolventes de reconstitución, el tamaño de las partículas de LNP no presentó diferencias significativas en comparación con el tamaño de las partículas tras la reconstitución con WFI. Además, el contenido total de ARNm y la eficiencia de encapsulación  
30 de la solución tras la reconstitución con otros disolventes de reconstitución fueron comparables

a los de la solución tras la reconstitución con WFI. En cuanto a los cambios en el tamaño de partícula, el PDI, el contenido total de ARNm y la eficiencia de encapsulación de la solución antes y después de la aspersión, no se observaron diferencias significativas en estos indicadores para la solución antes y después de la aspersión tras la reconstitución con cada disolvente de reconstitución. Esto indicaba que los niveles de riesgo de daño a la estructura de las partículas de LNP y de adsorción del medicamento durante el proceso de aspersión usando el dispositivo de administración nasal desechable eran todos relativamente bajos.

En conjunto, el PF68 al 0.2 %, el PVA al 0.25 %, el HEC al 0.1 % y el PEG400 al 1 % pueden usarse como componentes del disolvente de reconstitución y dispersante.

Tabla 21. Resultados de la selección del componente del disolvente de reconstitución - dispersante

| Fórmula del disolvente de reconstitución |                         | Tamaño de partícula (nm) | PDI  | Contenido total de ARNm (µg/ml) | Eficiencia de encapsulación |
|------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|------|---------------------------------|-----------------------------|
| WFI                                      | Antes de la aspersión   | 96.7                     | 0.22 | 66.88                           | 81.7 %                      |
|                                          | Después de la aspersión | 98.6                     | 0.21 | 67.20                           | 77.5                        |
| 0.2 % PF68                               | Antes de la aspersión   | 96.7                     | 0.19 | 79.27                           | 86.7 %                      |
|                                          | Después de la aspersión | 98.1                     | 0.22 | 81.24                           | 81.2                        |
| 0.2 % PF127                              | Antes de la aspersión   | 81.3                     | 0.16 | 82.27                           | 83.0 %                      |
|                                          | Después de la aspersión | 84.1                     | 0.18 | 84.02                           | 81.2                        |
| 0.25 % de PVA                            | Antes de la aspersión   | 98.7                     | 0.17 | 77.64                           | 86.4 %                      |
|                                          | Después de la aspersión | 103.3                    | 0.22 | 76.17                           | 79.4 %                      |
| 0.1 % HEC                                | Antes de la aspersión   | 101.5                    | 0.17 | 78.47                           | 87.5 %                      |

|               |                         |       |      |       |        |
|---------------|-------------------------|-------|------|-------|--------|
|               | Después de la aspersión | 105.6 | 0.23 | 83.97 | 83.9   |
| 1 % de PEG400 | Antes de la aspersión   | 100.7 | 0.18 | 72.93 | 79.8 % |
|               | Después de la aspersión | 103.0 | 0.20 | 73.66 | 83.8   |

### Ejemplo 8. Selección del componente del disolvente de reconstitución: espesante

Al tratarse de una formulación de aspersión externa, la formulación debe tener una cierta viscosidad para aumentar el tiempo de retención de la misma en el lugar de administración. Se seleccionaron como espesantes la goma xantana (Xc), la polivinilpirrolidona K90 (PVP-K90), el hialuronato de sodio (HA), la carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na) y el quitosano (CTS). Las formulaciones específicas son las siguientes (en proporción en peso):

- 1) 0.24 % de goma xantana (Xc);
- 2) 0.5 % de polivinilpirrolidona K90 (PVP-K90);
- 3) 0.1 % de hialuronato de sodio (HA);
- 4) 0.5 % de carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na);
- 5) 0.2 % de quitosano (CTS).

Cada uno de los disolventes de reconstitución mencionados se formuló, filtró, envasó, tapó y precintó para su uso posterior. Se usó un dispositivo desechable de administración nasal para transferir de cada uno de los disolventes de reconstitución mencionados anteriormente con el fin de reconstituir el polvo liofilizado y, a continuación, realizar la aspersión; se recogieron las muestras asperjadas. Se determinaron el tamaño de partícula, el PDI, la eficiencia de encapsulación y el contenido total de ARNm de las muestras antes y después de la aspersión. Los resultados se muestran en la Tabla 22 a continuación.

Tabla 22. Selección del componente del disolvente de reconstitución: espesante

| Fórmula del disolvente de reconstitución |                       | Tamaño de partícula (nm) | PDI  | Contenido total de ARNm (µg/ml) | Eficiencia de encapsulación |
|------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|------|---------------------------------|-----------------------------|
| WFI                                      | Antes de la aspersión | 96.7                     | 0.22 | 66.88                           | 81.7 %                      |

|              |                         |       |      |       |        |
|--------------|-------------------------|-------|------|-------|--------|
|              | Después de la aspersión | 98.6  | 0.21 | 67.20 | 77.5   |
| 0.24 % Xc    | Antes de la aspersión   | 101.7 | 0.15 | 70.42 | 82.7 % |
|              | Después de la aspersión | 103.2 | 0.21 | 72.12 | 81.2   |
| 0.5 % PVPK90 | Antes de la aspersión   | 98.4  | 0.13 | 73.14 | 83.3 % |
|              | Después de la aspersión | 100.1 | 0.18 | 74.02 | 82.2 % |
| 0.1 % de HA  | Antes de la aspersión   | 98.6  | 0.16 | 71.69 | 84.4 % |
|              | Después de la aspersión | 97.1  | 0.21 | 76.37 | 81.4   |
| 0.5 % CMC-Na | Antes de la aspersión   | 104.5 | 0.16 | 80.13 | 84.5 % |
|              | Después de la aspersión | 100.5 | 0.20 | 83.87 | 83.9   |
| 0.2 % CTS    | Antes de la aspersión   | 99.2  | 0.18 | 72.23 | 83.8 % |
|              | Después de la aspersión | 107.5 | 0.25 | 69.66 | 79.8   |

Según los resultados anteriores, cuando se usó un 0.2 % de quitosano (CTS) como disolvente de reconstitución y se asperjó la muestra reconstituida, su tamaño de partícula y su PDI mostraron una tendencia al alza en comparación con los valores previos a la aspersión (107.5 nm frente a 99.2 nm), lo que sugiere que podría haberse producido una agregación de partículas en la muestra tras la aspersión. Otros disolventes de reconstitución (0.24 % de Xc, 0.5 % de PVPK90, 0.1 % de HA, 0.5 % de CMC-Na) pudieron mantener la estabilidad de la estructura de las partículas de LNP antes y después de la aspersión.

Al mismo tiempo, se seleccionaron los disolventes de reconstitución mencionados usando la viscosidad de la solución y el tamaño de las partículas tras la aspersión como indicadores de evaluación. Los resultados se muestran en la Tabla 23 a continuación:

Tabla 23. Selección del componente del disolvente de reconstitución: espesante (morfología y patrón de aspersión)

| Fórmula del disolvente de reconstitución | Viscosidad (mPa·s) | Área de aspersión (mm <sup>2</sup> ) | Índice de elipticidad | Dmáx (mm) | Dmin (mm) |
|------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| WFI                                      | 1.42               | 2553.2                               | 1.205                 | 62.64     | 52.00     |
| 0.24 % Xc                                | 1.98               | 2628.5                               | 1.135                 | 60.24     | 53.07     |
| 0.5 % PVPK90                             | 2.02               | 1832.4                               | 1.453                 | 71.82     | 49.43     |
| 0.1 % HA                                 | 1.37               | 2231.2                               | 1.217                 | 67.44     | 55.41     |
| 0.5 % CMC-Na                             | 1.64               | 2472.2                               | 1.189                 | 63.04     | 53.02     |
| 0.2 % CTS                                | 2.21               | 1923.9                               | 1.365                 | 72.08     | 52.81     |

5 De los resultados anteriores se desprende que, en comparación con la reconstitución y aspersión con agua para inyección, la solución tras la reconstitución y aspersión con un 0.5 % de PVPK90 y un 0.2 % de CTS presentaba una mayor viscosidad, un área de aspersión más reducida y un mayor índice de elipticidad. Esto indicaba que la solución era más viscosa tras la reconstitución con un 0.5 % de PVPK90 y un 0.2 % de CTS, lo que dificultaba obtener una mejor morfología de aspersión (área de aspersión y relación de elipticidad). No se observaron diferencias significativas en los efectos de aspersión de los demás disolventes de reconstitución (0.24 % de Xc, 0.1 % de HA, 0.2 % de CTS) en comparación con el agua para preparaciones inyectables (WFI).

#### 15 **Ejemplo 9. Determinación de los componentes del disolvente de reconstitución**

Los componentes del disolvente de reconstitución deben considerarse de forma exhaustiva en función de la viscosidad de la solución asperjada, la estabilidad de la estructura de las LNP, la morfología y el patrón de aspersión, etc. La formulación de los componentes del disolvente de reconstitución se llevó a cabo de acuerdo con la Tabla 24 que figura a continuación. A continuación, se usó un dispositivo desechable de administración nasal para realizar la aspersión y se recogieron las muestras asperjadas. Se determinaron la viscosidad, el tamaño de partícula, el PDI, el contenido total de ARNm y la eficiencia de encapsulación tras la aspersión, y se usaron como indicadores de evaluación para seleccionar los componentes del disolvente de reconstitución. Los resultados de las pruebas se muestran en la Tabla 25 a continuación.

25

Tabla 24. Diseño experimental para la selección de los componentes del disolvente de

## reconstitución

| N.º de lote | Componente del disolvente de reconstitución: dispersante | Componente del disolvente de reconstitución: espesante | Indicador de evaluación                                                                     |
|-------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1           | WFI                                                      | WFI                                                    | Viscosidad, tamaño de partícula, PDI, contenido total de ARNm y eficiencia de encapsulación |
| 2           | 1 % de PEG-400                                           | 1 % de PVP-K90                                         |                                                                                             |
| 3           | 0.2 % de PF68                                            | 1 % de PVP-K90                                         |                                                                                             |
| 4           | 1 % PEG-400                                              | 0.5 % PVP-K90                                          |                                                                                             |
| 5           | 0.2 % de PF68                                            | 0.5 % de PVP-K90                                       |                                                                                             |
| 6           | 1 % PEG-400                                              | 0.25 % PVP-K90                                         |                                                                                             |
| 7           | 0.2 % PF68                                               | 0.25 % PVP-K90                                         |                                                                                             |

Tabla 25. Resultados del cribado de los componentes del disolvente de reconstitución

| Fórmula del disolvente de reconstitución |                         | Viscosidad (mPa·s) | Tamaño de partícula (nm) | PDI  | Contenido total de ARNm (µg/ml) | Eficiencia de encapsulación |
|------------------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|------|---------------------------------|-----------------------------|
| Agua para preparaciones inyectables      | Antes de la aspersión   | 1.42               | 95.85                    | 0.21 | 59.64                           | 81.9 %                      |
|                                          | Después de la aspersión |                    | 98.75                    | 0.22 | 57.60                           | 82.4 %                      |
| 1 % PEG-400+<br>1 % PVP-K90              | Antes de la aspersión   | 3.72               | 106.4                    | 0.21 | 77.74                           | 85.1 %                      |
|                                          | Después de la aspersión |                    | 103.6                    | 0.22 | 63.06                           | 76.7                        |
| 0.2 % PF68+<br>1 % de PVP-K90            | Antes de la aspersión   | 3.83               | 106.5                    | 0.22 | 84.42                           | 85.5 %                      |
|                                          | Después de la aspersión |                    | 106.5                    | 0.20 | 72.04                           | 85.5 %                      |

|                                |                         |      |       |      |       |        |
|--------------------------------|-------------------------|------|-------|------|-------|--------|
| 1 % PEG-400+<br>0.5 % PVP-K90  | Antes de la aspersión   | 2.19 | 102.7 | 0.23 | 74.41 | 86.1 % |
|                                | Después de la aspersión |      | 105.6 | 0.24 | 67.01 | 77.2 % |
| 0.2 % PF68+<br>0.5 % PVP-K90   | Antes de la aspersión   | 2.05 | 98.99 | 0.20 | 82.19 | 86.9 % |
|                                | Después de la aspersión |      | 105.9 | 0.23 | 72.36 | 81.1 % |
| 1 % PEG-400+<br>0.25 % PVP-K90 | Antes de la aspersión   | 1.73 | 96.95 | 0.16 | 73.53 | 87.0 % |
|                                | Después de la aspersión |      | 105.7 | 0.23 | 64.34 | 73.5   |
| 0.2 % PF68+<br>0.25 % PVP-K90  | Antes de la aspersión   | 1.78 | 97.4  | 0.16 | 82.48 | 88.9 % |
|                                | Después de la aspersión |      | 105.7 | 0.20 | 73.03 | 80.0 % |

A juzgar por los resultados de las pruebas, el disolvente de reconstitución que contenía un 1 % de PVP-K90 presentó la viscosidad más alta, seguido del que contenía un 0.5 % de PVP-K90. El disolvente de reconstitución que contenía un 0.25 % de PVP-K90 presentó la viscosidad más baja. Desde la perspectiva de los cambios en el tamaño de las partículas, el PDI, el contenido total de ARNm y la eficiencia de encapsulación antes y después de la aspersión, y la comparación con el WFI, la eficiencia de encapsulación y el contenido total de ARNm del disolvente de reconstitución que contenía un 1 % de PEG-400 disminuyeron tras la aspersión en comparación con los valores previos a la aspersión. Por lo tanto, se prefirieron como componentes del disolvente de reconstitución el 0.2 % de PF68 + 1 % de PVP-K90, el 0.2 % de PF68 + 0.5 % de PVP-K90 y el 0.2 % de PF68 + 0.25 % de PVP-K90.

#### **Ejemplo 10. Determinación de los componentes del disolvente de reconstitución: expresión de HGF**

Además, es necesario introducir la morfología y el patrón de aspersión, así como la actividad biológica del componente principal (LNP) de la solución tras la aspersión, como indicadores clave para seguir seleccionando y evaluando los componentes del disolvente de reconstitución. Los

componentes del disolvente de reconstitución son los siguientes:

- 1) 1 % de PVP-K90 + 1 % de PEG-400
- 2) 1 % de PVP-K90 + 0.2 % de PF68
- 3) 0.5 % de PVP-K90 + 1 % de PEG-400
- 4) 0.5 % de PVP-K90 + 0.2 % de PF68
- 5) 0.25 % de PVP-K90 + 1 % de PEG-400
- 6) 0.25 % de PVP-K90 + 0.2 % de PF68
- 7) 0.2 % de PF68
- 8) 1.5 % de PK90
- 9) 1 % de PEG-400
- 10) 0.1 % de HEC
- 11) 0.25 % de PVA
- 12) 0.2 % de PF127
- 13) WFI

Cada disolvente de reconstitución se formuló según las formulaciones anteriores, se filtró, se llenó, se taponó y se precintó para su uso posterior. Se usó un dispositivo de administración nasal desechable para transferir cada uno de los disolventes de reconstitución anteriores con el fin de reconstituir el polvo liofilizado y, a continuación, realizar la aspersión; se recogieron las muestras tras la aspersión. Se determinaron la viscosidad, la osmolalidad, el tamaño de partícula, el PDI, la eficiencia de encapsulación, el contenido total de ARNm y el patrón de aspersión de las muestras tras la aspersión. Al mismo tiempo, se analizaron las muestras recolecciones para determinar su expresión de HGF en células HEK293 (CCTCC). Los resultados se muestran en la Tabla 26 a continuación.

Tabla 26. Selección de los componentes del disolvente de reconstitución (actividad biológica)

| Fórmula del disolvente de reconstitución | Viscosidad (mPa·s) | Osmolalidad (mOsm) (LNP) | Tamaño de las partículas asperjadas (distancia de separación de aire de 3 cm, D50, $\mu\text{m}$ ) | Área de aspersión ( $\text{mm}^2$ ) | Expresión de HGF (ng/mL) |
|------------------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| 1                                        | 3.72               | 347                      | 177.3                                                                                              | 86.4                                | 117.2                    |
| 2                                        | 3.83               | 334                      | 193.3                                                                                              | 72.2                                | 201.5                    |

|    |      |     |       |        |       |
|----|------|-----|-------|--------|-------|
| 3  | 2.19 | 354 | 68.84 | 549.3  | 259.9 |
| 4  | 2.05 | 312 | 60.70 | 500.3  | 308.1 |
| 5  | 1.73 | 346 | 148.2 | 83.8   | 287.3 |
| 6  | 1.78 | 311 | 39.24 | 756.0  | 278.1 |
| 7  | 1.24 | 321 | 27.08 | 1766.7 | 279.2 |
| 8  | 5.97 | 334 | 337.2 | 13.9   | 378.2 |
| 9  | 1.02 | 348 | 25.13 | 1453.0 | 228.9 |
| 10 | 1.25 | 318 | 26.33 | 1615.3 | 227.7 |
| 11 | 1.16 | 316 | 30.81 | 1255.0 | 320.0 |
| 12 | 1.12 | 324 | 28.43 | 1676.3 | 0.1   |
| 13 | 1.42 | 295 | 24.51 | 1812.7 | 220.2 |

De los resultados de la Tabla 26 se desprende que, tras la reconstitución y aspersión de la fórmula 12 (0.2 % de PF127), la expresión de HGF de la muestra fue prácticamente nula. Esto demostró que este disolvente de reconstitución podría tener un gran efecto destructivo sobre el LNP, provocando que perdiera su actividad biológica tras la reconstitución y la aspersión. Tras la reconstitución y la aspersión, la fórmula 1 (1 % de PVP-K90 + 1 % de PEG-400), la fórmula 2 (1 % de PVP-K90 + 0.2 % de PF68), la fórmula 5 (0.25 % de PVP-K90 + 1 % de PEG-400) y la fórmula 8 (1.5 % de PVP-K90) presentaban un tamaño de partícula de aspersión grande, un área de aspersión pequeña y una alta viscosidad. Los disolventes de reconstitución de las formulaciones restantes mostraron todos un alto nivel de expresión de HGF, una viscosidad moderada, un área de aspersión grande y un tamaño de partícula de aspersión pequeño.