



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 812**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01918339 .1**
96 Fecha de presentación : **02.03.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1259265**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2002**

54 Título: **Formulaciones de ácido nucleico para su liberación génica.**

30 Prioridad: **03.03.2000 US 187236 P**
16.01.2001 US 261751 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.09.2011

73 Titular/es: **GENETRONICS, Inc.**
11199-A Sorrento Valley Road
San Diego, California 92121-334, US

72 Inventor/es: **Fewell, Jason, G.;**
MacLaughlin, Fiona;
Smith, Louis, C.;
Nicol, Francois y
Rolland, Alain

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 812 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de ácido nucleico para su liberación génica

Introducción

5 Esta invención se refiere a nuevas composiciones para la introducción de una molécula de ácido nucleico en una célula, incluyendo por medio de un método de liberación por voltaje de pulsos, para la expresión de una proteína, un péptido, un ARN antisentido, una ribozima, o un polipéptido.

Antecedentes de la Invención

La siguiente información se presenta para ayudar a la comprensión del lector.

10 La terapia génica es un área principal de la investigación en el desarrollo de fármacos. La terapia génica ha sido considerada un mecanismo deseable para corregir las enfermedades determinadas genéticamente resultantes del fracaso en la producción de ciertas proteínas y las enfermedades adquiridas tales como las autoinmunitarias y el cáncer. Un ejemplo de una clase de enfermedades determinadas genéticamente que son consideradas susceptibles de terapia génica es la hemofilia. La hemofilia B, por ejemplo, es un trastorno hemorrágico que resulta de la ausencia de factor de coagulación sanguíneo IX funcional ("F. IX"). La dolencia se clasifica como grave, moderada o
15 leve, dependiendo del nivel de F. IX funcional (Lusher, J. M. (1999) *Thromb Haemost* 82: 572-5751). Aproximadamente 5.200 varones resultan afectados por esta enfermedad en los Estados Unidos siendo aproximadamente el 45% de estos casos de tipo grave. En los casos graves de hemofilia B (<1% de los niveles de F. IX normal) se producen frecuentes eventos de hemorragia que pueden poner en peligro la vida y producen a menudo una destrucción debilitante de las articulaciones del paciente. La terapia actual para la hemofilia B es la administración de la proteína F. IX solamente en respuesta a los eventos hemorrágicos. El uso de cualquier derivado de la sangre o de F. IX recombinante ha demostrado que se pueden lograr beneficios clínicos y de calidad de vida
20 tremendos convirtiendo los casos de hemofilia B más graves en moderados o leves. En algunos países se administra la proteína F. IX profilácticamente en los casos más graves, a pesar del hecho de que estos tratamientos son extremadamente costosos (Ljung, R. C. (1999) *Thromb Haemost* 82 525 - 530). El uso profiláctico de F. IX no es frecuente en los Estados Unidos.

La terapia génica podría proporcionar un nuevo enfoque profiláctico para el tratamiento de enfermedades tales como la hemofilia B. Un obstáculo tecnológico para la comercialización de la terapia génica, no obstante, es la necesidad de métodos de liberación génica prácticos, eficaces y seguros. En modelos animales de hemofilia, se han utilizado con éxito vectores basados en virus para administrar el gen del F. IX humano en el hígado o el músculo.
30 (Kay, M. A., et al. (1993) *Science* 262: 117-119; Herzog, R. W., et al. (1999) *Nat Med*: 56-63; Snyder, R. O., et al. (1999) *Nat Med* 5: 64-70; Chao, H., et al. (1999) *Gene Ther* 6: 1695-1704; Lozier, J. N., et al. (1999) *Blood* 94: 3968-3975; Kaufman, R. J. (1999) *Hum Gene Ther* 10: 2091 - 2107). En algunos casos, estos enfoques han conducido a la expresión a largo plazo (> 2 años) de niveles terapéuticos de F. IX en un modelo canino de hemofilia B (Herzog, R. W., et al. (1999) *Nat Med* 5: 56-63). No obstante, se ha informado extensamente sobre las limitaciones de los enfoques basados en virus. Por ejemplo, no es posible la re-administración con estos vectores debido a la respuesta inmunitaria humoral generada contra las proteínas virales. Además de los retos de la fabricación para obtener un suministro de vectores reproducibles adecuados, también existen asuntos de seguridad significativos asociados con los vectores virales, concretamente para aquellos que se dirigen al hígado para la expresión del gen. A pesar de los problemas asociados con la terapia génica viral, muchos han considerado que los virus son más eficaces que los
40 vehículos de liberación no virales.

Un problema de la terapia génica no viral es conseguir la liberación y expresión de suficiente ácido nucleico para producir una expresión fisiológicamente relevante, tangible. Aunque hace varios años se demostró que los plásmidos con ADN en solución salina isotónica (también denominados ADN "desnudo") transfectaban una variedad de células in vivo, la carencia de estabilidad de tales plásmidos no protegidos a la degradación enzimática está
45 asociada con la irreproducibilidad de la absorción que conduce a una expresión altamente variable y a respuestas biológicas en modelos animales. La biodisponibilidad muy baja del plásmido "desnudo" en la mayoría de los tejidos también requiere la administración de dosis elevadas de plásmidos para generar una respuesta farmacológica.

Por lo tanto el campo de la liberación génica no viral se ha dirigido a sistemas de liberación sintéticos más eficaces capaces de aumentar la eficacia de liberación del plásmido, conferir una expresión prolongada y
50 proporcionar formulaciones estables en el almacenamiento como se espera de otras formulaciones farmacéuticas.

Para superar el problema de la degradación de los ácidos nucleicos, por lo general el ADN plasmídico ("ADNp"), e intensificar la eficacia de la transfección de genes, se han desarrollado agentes condensantes catiónicos (tales como polibreno, dendrímeros, quitosana, lípidos y péptidos) para proteger el ADNp condensándolo por medio de la interacción electrostática. (A. P. Rolland, *From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery*, revisado en *Therapeutic drug carrier systems*, 15 (2): 143-198 (1998).) Sin embargo, el uso de partículas
55

5 plasmídicas condensadas para la transfección de un gran número de células musculares *in vivo* no ha resultado satisfactorio comparado directamente con el ADN "desnudo". Wolff, J. A., et al., J. Cell Sci., 103, 1249, 1992. En particular, debido a la fisiología del músculo, el uso de partículas condensadas rígidas que contienen un plásmido para la transfección eficaz de un gran número de células musculares no ha resultado satisfactorio hasta la fecha porque los lípidos catiónicos y los complejos de plásmidos con polilisina no cruzan la lámina externa para conseguir el acceso a las caveolas y los túbulos T. *Id.*

10 Otras estrategias que incluyen la modulación de la carga superficial y el carácter hidrófobo del plásmido mediante la interacción con sistemas no condensantes interactivos, protectores (p. ejemplo, polímeros PINC®) han mostrado ventajas sobre el uso del ADN "desnudo" para la administración directa a tejidos sólidos. [Documento WO 9621470, Patente de los Estados Unidos Núm. 6.040.295].

15 También se han utilizado microesferas biodegradables en la liberación génica que encapsulan el ácido nucleico. Por ejemplo, en el documento WO 0078357, Chen, W. et al, describieron matrices, películas, geles e hidrogeles que incluyen ácido hialurónico (AH) derivatizado con una hidrazida y entrecruzado con un ácido nucleico que forman microesferas de liberación lenta. En el documento WO 9524929, Boekelheide, K. et al., describieron la encapsulación de genes en una matriz preferiblemente en forma de una micropartícula tal como una microesfera, una microcápsula, una película, un implante, o un revestimiento sobre un dispositivo tal como un stent. En el documento US 6048551, Beer, S. et al. describieron un sistema de reparto de genes de liberación controlada utilizando poli(lactida-co-glicólido) (PLGA), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalatoacetato de celulosa, y las series R, L y E de Ludragit de microesferas de polímeros y copolímeros para encapsular el vector del gen. Luo D et al. Pharm Res 1999 Agosto; 16 (8): 1300-8, informaron sobre la caracterización de sistemas para la liberación controlada de ADN procedente de matrices poliméricas implantables (EVAc: poli(etileno-co-acetato de vinilo)) y microesferas inyectables (PLGA y PLA: copolímero de poli(D,L-lactida-co-glicólido) y poli(L-lactida), respectivamente). A pesar de su promesa, las microesferas pueden plantear dificultades de fabricación y pueden restringir adversamente la liberación de ADN *in vivo*, concretamente en tejido muscular.

25 Otra técnica anterior incluye Blood, 96, 803a, Nov. 2000, que describe una polivinilpirrolidona combinada con ácido nucleico, y un poliglutamato combinado con ácido nucleico, y donde junto con la electroporación, se logra una liberación de genes satisfactoria, y Pharmaceutical Development Technology, 5, 2000, 115-22, que describe la hibridación de ácidos nucleicos, y la capacidad de los carbohidratos para proteger los ácidos nucleicos de la degradación en tales condiciones.

30 A pesar de los avances recientes, sigue existiendo la necesidad de composiciones de ácidos nucleicos formuladas adicionales y mejoradas para la liberación de genes.

Compendio de la Invención

35 La invención proporciona una formulación para la liberación de una molécula de ácido nucleico en una célula como se expone en las reivindicaciones 1, 2 y 3. Las formulaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones 4 a 23.

Otras realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones 24 – 58.

En una realización de la invención, el poliaminoácido es poli(ácido glutámico) y una de sus sales. Se ha demostrado en la presente invención que la formulación de poli(ácido glutámico) es particularmente útil al incrementar la transfección *in vivo* asistida por electroporación.

40 Las composiciones de la presente invención que se utilizan para la administración de ácido nucleico, preferiblemente mediante liberación por voltaje de pulsos, permiten el tratamiento de enfermedades, la vacunación, y el tratamiento de trastornos musculares y deficiencias de proteínas en suero.

45 Otra enfermedad tratable se caracteriza por niveles insuficientes de Factor IX activo. La liberación de un ácido nucleico que codifica el Factor IX formulado en poli-glutamato y liberado junto con la electroporación de acuerdo con la presente invención es capaz de proporcionar niveles de nanogramos de Factor IX en la sangre periférica de animales grandes.

50 La enfermedad que se va a tratar puede estar caracterizada por niveles insuficientes de glóbulos rojos que producen anemia. La liberación de un ácido nucleico que codifica eritropoyetina ("EPO") formulado en poli-L-glutamato y liberado junto con electroporación de acuerdo con la presente invención es capaz de proporcionar suficientes niveles de EPO como para dar como resultado un nivel de hematocrito máximo.

Otra enfermedad puede estar caracterizada por una desregulación del sistema inmunitario. La liberación de un ácido nucleico que codifica una citoquina, tal como en un ejemplo, el interferón alfa 2b humano ("hINF α "), formulado en poli-L-glutamato y liberado junto con electroporación de acuerdo con la presente invención es capaz de proporcionar niveles de nanogramos de hINF α en la circulación periférica.

En un método de liberación de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención en un mamífero, más preferiblemente un ser humano, se proporciona una formulación de poliaminoácido aniónico no condensante como se ha definido en la presente memoria a las células del organismo por medio del uso de un dispositivo configurado y dispuesto para ocasionar la liberación de la formulación mediante voltaje de pulsos.

5 En realizaciones preferidas el dispositivo para la liberación es un dispositivo de electroporación que libera la composición de la invención en la célula por medio de voltaje de pulsos y/o libera la composición de la invención sometiendo las células a un campo eléctrico.

10 La presente invención también ofrece un kit. El kit incluye un contenedor para proporcionar una composición de la invención y o bien (i) un dispositivo de voltaje de pulsos para liberar la composición de la invención en células de un organismo, donde el dispositivo de voltaje de pulsos es capaz de combinarse con el contenedor, o bien (ii) instrucciones que explican cómo liberar la composición de la invención con el dispositivo de voltaje de pulsos. De este modo, el "contenedor" puede incluir instrucciones proporcionadas para permitir a un experto en la técnica elaborar las composiciones de la invención. Las instrucciones proporcionarán etapas para elaborar los compuestos utilizados para formular moléculas de ácido nucleico. Adicionalmente, las instrucciones incluirán métodos para someter a ensayo las composiciones de la invención que implican establecer si las moléculas de ácido nucleico resultan dañadas después de la inyección siguiente a la electroporación. El kit también puede incluir una notificación de un uso y unas instrucciones aprobados por la FDA.

15 Asimismo se proporciona un método para elaborar un kit de la invención. El método implica las etapas de combinar un contenedor para proporcionar una composición de la invención o bien con (i) un dispositivo de voltaje de pulsos para liberar la composición de la invención en las células de un organismo, donde el dispositivo de voltaje de pulsos es capaz de combinarse con el contenedor, o bien (ii) instrucciones que explican cómo liberar la composición de la invención con el dispositivo de voltaje de pulsos.

20 Las composiciones de la invención permiten el tratamiento de un mamífero que padece cáncer o una enfermedad infecciosa. Se proporciona una composición de la invención a las células del mamífero por medio del uso de un dispositivo configurado y dispuesto para proporcionar la liberación mediante voltaje de pulsos de una composición de la invención a las células del mamífero, donde la molécula codifica un antígeno canceroso o un antígeno para la enfermedad infecciosa.

25 Las composiciones de la presente invención que se utilizan para administrar ácidos nucleicos, preferiblemente mediante liberación por voltaje de pulsos protegen el ácido nucleico y/o prolongan la biodisponibilidad localizada del ácido nucleico y/o aumentan la expresión cuando se administran a un organismo in vivo, o in vitro en un cultivo celular.

30 Como las composiciones son útiles para la liberación de una molécula de ácido nucleico en las células in vivo, la invención permite la administración en un sitio *in vivo*. En particular, esto incluye composiciones para liberar una molécula de ácido nucleico en un sitio in vivo en un mamífero.

35 Otros objetos, rasgos y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones de la invención actualmente preferidas.

Breve Descripción de los Dibujos

40 La Figura 1 muestra concentraciones en suero de SEAP a los 7 días de la inyección de mezclas de ADNp de SEAP/ADN vacío en el músculo tibial craneal de ratones CD-1 con electroporación. Se administraron diferentes cantidades de ADNp de SEAP y un exceso de ADNp vacío (con respecto al ADNp codificante).

45 La Figura 2 muestra concentraciones en suero de SEAP a los 7 días de la inyección de ADNp de SEAP desnudo o mezclas de ADNp de SEAP/polímero aniónico en el músculo tibial craneal de ratones CD-1 con electroporación y la concentración de ADN de 2,5 microgramos en 50 microlitros (la mitad de esta dosis por pata). La concentración de polímero aniónico en la solución inyectada varía como se indica en el gráfico.

La Figura 3 muestra concentraciones en suero de SEAP a los 7 días de la inyección de ADNp de SEAP desnudo o mezclas de ADNp de SEAP/polímero aniónico en el músculo tibial craneal de ratones CD-1 con electroporación y la cantidad de ADNp de SEAP administrada por animal fue regularmente (a menos que se mencione de otro modo) de 25 microgramos en 50 microlitros (la mitad de esta dosis por pata).

50 La Figura 4 muestra concentraciones en suero de SEAP a los 7 días de la inyección de ADNp de SEAP desnudo o mezclas de ADNp de SEAP/polímero aniónico en el músculo gastrocnemio de ratones CD-1 y electroporación del tejido. La concentración del polímero aniónico en la solución inyectada varía como se indica en el gráfico.

La Figura 5 muestra concentraciones en suero de SEAP a los 7 días como función de la cantidad del ADNp

de SEAP inyectado en diferentes formulaciones como se indica: **A** en el músculo tibial craneal de ratones CD-1; **B** en el músculo gastrocnemio de ratones CD-1 comparando o bien ADNp de SEAP desnudo o bien una mezcla de ADNp de SEAP y poli(ácido L-glutámico) a 6,0 mg/ml.

5 La Figura 6 muestra la expresión de luciferasa después de una inyección intramiocárdica directa de ADN plasmídico formulado en solución salina frente a poli(ácido glutámico).

La Figura 7 muestra concentraciones de hF. IX en suero a los 7 días de la inyección de ADNp desnudo de hF. IX o mezclas de ADNp de hF. IX/poli(ácido L-glutámico) en el músculo tibial de ratones C57BL/6 y electroporación del tejido. La concentración del polímero aniónico en la solución inyectada varía como se indica en el gráfico.

10 La Figura 8 muestra la expresión de hF. IX en el plasma de ratones inmunodeficientes (SCID beige).

La Figura 9 representa la inmunohistología y el tipo de fibra de los miocitos que expresan hF. IX en músculo de ratón SCID.

15 La Figura 10 A representa los niveles de hF. IX en plasma determinados mediante ELISA en perros después de la inyección intramuscular de plásmido aumentado por electroporación en numerosos sitios diferentes. Los valores son las medias \pm ETM con $n = 3$ para cada grupo. La Figura 10B muestra una transferencia western de hF. IX purificado utilizando suero de animal tratado como anticuerpo primario. Calle A, marcador molecular; calle B, suero de control negativo; calle C, control positivo (suero canino con una cantidad añadida de anticuerpos anti-hF. IX de conejo); calle D, suero procedente de un perro hembra del grupo de 6 inyecciones (pico de expresión de hF. IX 35,71 ng/ml); calle E, suero de un perro macho procedente del grupo de 12 inyecciones (pico de expresión de hF. IX 47,9 ng/ml).

20

La Figura 11 representa la duración de la retención del ADN plasmídico con EPO de ratón después de la liberación mediante electroporación utilizando formulaciones con solución salina y poli(ácido L-glutámico).

La Figura 12 representa la expresión de EPO y el hematocrito en ratones después de la liberación del gen de EPO de ratón mediante electroporación utilizando formulaciones con solución salina y poli(ácido L-glutámico).

25 La Figura 13 representa los resultados de la expresión de EPO en ratones después de la liberación del gen de EPO de ratón mediante electroporación utilizando formulaciones con solución salina y poli(ácido glutámico) a lo largo de un marco temporal de tres meses.

30 La Figura 14 representa una comparación de la expresión del gen de hINFA después de la liberación en solución salina frente a poliglutamato. A representa los resultados utilizando una dosis de 50 microgramos de ADN plasmídico mientras B representa los resultados de la administración de una dosis de 5 microgramos de ADN plasmídico.

35 La Figura 15 muestra la capacidad de las formulaciones de poli-L-glutamato y poloxámero para proteger el ADN de la degradación con nucleasa. El panel A representa un ADN en formulación salina; el panel B representa el ADN formulado en Pluronic F68 al 5%; el panel C representa ADN formulado en 6 mg/ml de poli-L-glutamato. Calle A, control negativo del ADN plasmídico sin ADNasa; calle B, control positivo del ADN plasmídico y la ADNasa mezclados 1:1; calle C, ADNasa diluida 1:1; calle D, ADNasa diluida 1:10; calle E, ADNasa diluida 1:100; calle F, ADNasa diluida 1:1.000; calle G, ADNasa diluida 1:10.000.

40 La Figura 16 representa los resultados de la estabilidad biológica a largo plazo del ADN plasmídico que codifica SEAP formulado en 6 mg/ml de poli-L-glutamato en diferentes condiciones de almacenamiento. A, liofilización y almacenamiento a 4°C. durante 105 días; B, congelación de una formulación líquida con almacenamiento a -20°C durante 105 días; C, almacenamiento líquido a 4°C durante 105 días; D, almacenamiento líquido a la temperatura ambiente durante 105 días; E, almacenamiento líquido a 37°C durante 105 días; F, almacenamiento líquido a 50°C durante 8 días; G, formulación líquida sometida a congelación/descongelación; H, ADN de nueva aportación formulado en poli-L-glutamato; I, ADN de nueva aportación sin poli-L-glutamato.

45 La Figura 17 representa el mapa plasmídico para pFN0945, un plásmido de expresión que porta el gen para hF. IX. La secuencia del plásmido completo se describe como SEQ ID NO: 3.

La Figura 18 representa el mapa plasmídico para pFN1645, un plásmido de expresión que porta un gen con codones optimizados para hF. IX. La secuencia del plásmido completo se describe como SEQ ID NO: 4.

50 La Figura 19 representa el mapa plasmídico para pEP1403, un plásmido de expresión que porta el gen de eritropoyetina de ratón. La secuencia del plásmido completo se describe como SEQ ID NO: 2.

La Figura 20 representa el mapa plasmídico para pIF0921, un plásmido de expresión que porta el gen de

interferón alfa humano. La secuencia del plásmido completo se describe como SEQ ID NO: 1.

Descripción Detallada de las Realizaciones Preferidas

5 La liberación y la expresión de secuencias codificadas sobre un vector en células eucarióticas, concretamente *in vivo* en un mamífero, dependen de una variedad de factores incluyendo la eficacia de transfección y la vida útil de la secuencia codificante dentro de la célula transfectada. De este modo, se ha informado sobre numerosos métodos para llevar a cabo dicha liberación.

10 Un medicamento génico no viral está compuesto por tres elementos principales: i) un ácido nucleico que codifica un producto génico (p. ej., una proteína terapéutica), ii) un sistema de expresión basado en plásmidos, y iii) un sistema de liberación génica sintético. Se pretende que estos productos tengan una baja toxicidad debido al uso de componentes sintéticos para la liberación de genes (minimizando por ejemplo los riesgos de inmunogenicidad generalmente asociados con los vectores virales) y plásmido no integrantes para la expresión génica. Puesto que no se ha informado sobre la integración de secuencias plasmídicas en cromosomas del anfitrión *in vivo* hasta la fecha, no deben activar oncogenes ni inactivar genes supresores de tumores. Esta seguridad intrínseca con los sistemas no virales contrasta con los riesgos asociados con el uso de la mayor parte de los vectores virales. Como los sistemas episómicos que residen fuera de los cromosomas, los plásmidos tienen una farmacocinética y perfiles de eliminación definidos, que conducen a una duración finita de la expresión del gen en los tejidos diana.

20 La formulación del ácido nucleico con polímeros aniónicos como se describe más abajo es particularmente deseable debido a que intensifican la transfección y la expresión del ácido nucleico, protegen al ácido nucleico de la degradación, y son completamente biodegradables. Además, debido a que la formulación del ácido nucleico con polímeros aniónicos produce una transfección más eficaz, se pueden utilizar cantidades más bajas de ADN. Por biodegradable, se pretende significar que los polímeros aniónicos pueden ser metabolizados o aclarados por el organismo *in vivo* sin efectos tóxicos o efectos secundarios o con efectos tóxicos o efectos secundarios mínimos. El término "polímeros aniónicos" representa polímeros que tienen una subunidad repetitiva que incluye, por ejemplo, un grupo carboxilo, fosfato o sulfato ionizados que tienen una carga neta negativa a pH neutro. Los ejemplos de los polímeros aniónicos incluyen poli-aminoácidos (tales como poli(ácido glutámico), poli(ácido aspártico) y sus combinaciones), poli(ácidos nucleicos), poli(ácido acrílico), poli(ácido galacturónico), y poli(sulfato de vinilo). En el caso de los ácidos poliméricos, el polímero se utilizará por lo general en forma de sal.

30 Se han realizado esfuerzos para intensificar la liberación de ADN plasmídico en las células mediante medios físicos incluyendo la electroporación, la sonoporación y la presión. La inyección mediante electroporación es una técnica moderna que implica la aplicación de un campo eléctrico pulsado para crear poros transitorios en la membrana celular sin ocasionar un daño permanente en la célula y de ese modo permite la introducción de moléculas exógenas.

35 Esta técnica se ha utilizado ampliamente en laboratorios de investigación para crear hibridomas y se está aplicando ahora en enfoques de transferencia génica para terapia. Ajustando el pulso eléctrico generado por un sistema electroporético, las moléculas de ácido nucleico pueden encontrar su camino a través de pasillos o poros en la célula que se crean durante el procedimiento. En la Patente de los Estados Unidos 5.704.908 se describe un aparato de electroporación para liberar moléculas en las células en una localización seleccionada dentro de una cavidad del organismo de un paciente. Véase también la Patente de los Estados Unidos 5.704.908.

40 El uso de métodos electroporéticos para liberar genes suspendidos en solución salina en arterias de conejo y porcinas como modelos para tratar enfermedades coronarias y vasculares periféricas se ha comentado en el 3rd US-Japan Symposium on Drug Delivery (D. B. Dev, J. J. Giordano y D. L. Brown, Maui, Hawaii, 17-22 de Diciembre, 1995). La capacidad para dirigir y expresar el gen informador lacZ suspendido en solución salina a diferentes profundidades de la región dérmica de ratones sin pelo se ha descrito en el artículo "Depth-Targeted Efficient Gene delivery and Expression in the skin by Pulsed Electric Fields: An approach to Gene Therapy of Skin Aging and Other Diseases" (Zhang et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 220, 633 - 636 (1996)). Se ha inyectado un plásmido de expresión de mamífero para el gen lacZ en solución salina en la arteria carótida interna de ratas cuyos tumores cerebrales habían sido sometidos a electroporación entre dos electrodos. Se informó de que el gen era expresado en las células tumorales tres días después de la inyección del plásmido, y además, se informó de que se había aislado actividad lacZ solamente en los tejidos y células elegidos como diana (Nishi, et al., Cancer Research 56, 1050-1055, 1 de Marzo 1, 1996).

45 Ajustando el pulso eléctrico generado por medio de un sistema electroporético, las moléculas de ácido nucleico pueden encontrar su camino en la célula a través de pasillos o poros que se crean durante el procedimiento.

55 Previamente, el tratamiento de la hemofilia B mediante métodos no virales no había sido posible porque solamente se alcanzaban niveles bajos y variables de expresión génica. Recientemente, se demostró que el uso de la electroporación *in vivo* producía niveles elevados constantes de expresión génica en músculo, hígado, piel,

tumores sólidos y testículo después de la inyección directa de plásmido en estos tejidos (Titomirov, A. V., et al. (1991) *Biochim Biophys Acta* 1088: 131-134; Muramatsu, T., et al. (1997) *Biochem Biophys. Res Commun* 233: 45-49; Suzuki, T., et al. (1998) *FEBS Lett* 425: 436-440; Aihara, H. and Miyazaki, J. (1998) *Nat Biotechnol* 16: 867-870; Mir, L. M., et al. (1998) *C R Acad Sci III* 321: 893-899; Rizzuto, G., et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6417-6422; Goto, T., et al (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 354-359; Somiari, S., et al. (2000) *Mol Ther* 2: 178-187). En ratones, se utilizó la electroporación de ADN plasmídico en solución salina para lograr niveles de hF. IX circulante que fueran un 2% del normal y se mantuvieran durante al menos 2 meses (Bettan, M., et al. (2000) *Mol Ther* 2: 204-210). La presente solicitud describe formulaciones de plásmidos novedosas para la electroporación que hacen realidad cuatro objetivos: (1) niveles terapéuticamente significativos de proteínas *in vivo*, (2) expresión persistente del transgén, (3) re-administración del plásmido formulado para obtener niveles comparables a los niveles iniciales y (4) niveles terapéuticamente significativos en animales grandes.

La liberación de un ADN formulado de acuerdo con la presente invención por medio de la utilización de un dispositivo de liberación por voltaje de pulsos representa un nuevo enfoque para la liberación génica. En particular, la realización preferida que emplea polímeros de aminoácidos aniónicos o poli-aminoácidos fue capaz de aumentar sustancialmente la expresión de los genes introducidos mediante electroporación cuando se compararon con la solución salina. Los poli-aminoácidos tienen la ventaja sobre las formulaciones anteriores de ser completamente biodegradables. La realización preferida también proporciona la ventaja de permitir la absorción de moléculas de ácido nucleico formuladas (esto es, moléculas de ácido nucleico de las composiciones de la invención) por las células y líneas celulares elegidas como diana específicamente, así como la absorción de múltiples líneas celulares según se desee. La inyección de moléculas de ácido nucleico formuladas por medio de métodos de liberación por voltaje de pulsos en las moléculas de ácido nucleico formuladas logra acceder al interior celular más directamente a través de la desestabilización de la pared celular y/o la formación de poros como resultado del procedimiento electroporético. Además, en ciertos casos se pueden elegir como diana múltiples líneas celulares, permitiendo de ese modo el contacto con muchos más tipos de células que en la inyección con aguja convencional. De este modo, la presente invención proporciona una liberación mejorada de moléculas de ácido nucleico y también proporciona un sistema de liberación génica más eficaz que se puede utilizar para generar una respuesta inmunitaria, expresar un gen terapéutico, modular aspectos del ciclo celular o la fisiología celular, o proporcionar un método para lograr otros métodos terapéuticos relacionados con la liberación génica tales como la terapia anti-tumoral.

El término poli(ácido L-glutámico) se utiliza indistintamente en la presente memoria con "poli(ácido L-glutámico), sal de sodio", "poli(L-glutamato) de sodio" y "poli(L-glutamato)". "Poli(L-glutamato)" hace referencia a la sal de sodio del poli(ácido L-glutámico). Aunque se encontró que el estereoisómero L del poli(ácido glutámico) era particularmente útil, el otro estereoisómero o las mezclas racémicas de los isómeros están dentro del alcance de la invención. La presente invención contempla que las otras sales de los polímeros de los aminoácidos aniónicos sean igualmente adecuadas.

El término "polímeros de aminoácidos aniónicos" representa las formas poliméricas de un aminoácido aniónico dado tal como, por ejemplo, poli(ácido glutámico) o poli(ácido aspártico). La presente invención contempla que puedan resultar igualmente adecuados polímeros formados por una mezcla de ácido glutámico y ácido aspártico.

Por "liberación" o "liberar" se entiende el transporte de moléculas de ácido nucleico a las células deseadas o a cualquier célula. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser liberadas en múltiples líneas celulares, incluyendo la diana deseada. La liberación hace que las moléculas de ácido nucleico entren en contacto con la superficie celular, la membrana celular, el endosoma celular, dentro de la membrana, el núcleo o dentro del núcleo, o cualquier otra zona deseada de la célula a partir de la cual se puede producir la transfección dentro de una variedad de líneas celulares que pueden incluir, pero no están limitadas a; células tumorales, células epiteliales, células de Langerhan, células de Langhans, células litorales, queratinocitos, células dendríticas, macrófagos, células Kupffer, células musculares, linfocitos y nódulos linfáticos. Preferiblemente, la composición de la invención es liberada en las células mediante electroporación y el componente de la molécula de ácido nucleico no se rompe significativamente después de la liberación, ni la viabilidad celular resulta significativamente afectada por el procedimiento de liberación por voltaje de pulsos.

Por "ácido nucleico" se quiere significar tanto ARN como ADN incluyendo: ADNc, ADN genómico, ADN plasmídico o ácido nucleico condensado, ácido nucleico formulado con lípidos catiónicos, ácido nucleico formulado con péptidos, polímeros catiónicos, ARN o ARNm. En una realización preferida, el ácido nucleico administrado es un ADN plasmídico que constituye un "vector". El ácido nucleico puede ser, pero no está limitado a, un vector de ADN plasmídico con un promotor eucariótico que expresa una proteína con una acción terapéutica potencial, tal como, por ejemplo; hGH, VEGF, EPO, IGF- I, TPO, Factor IX, IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-12, o similares.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "plásmido" hace referencia a un constructo formado por material genético (esto es, ácidos nucleicos). Este incluye elementos genéticos dispuestos de tal manera se pueda transcribir en células eucarióticas la secuencia codificante insertada. Asimismo, si bien el plásmido incluye una secuencia de un ácido nucleico viral, dicha secuencia viral no ocasiona preferiblemente la incorporación del

plásmido a una partícula viral, y el plásmido es por lo tanto un vector no viral. Preferiblemente, un plásmido es una molécula de ADN circular cerrada. La región intensificadora/promotora de un plásmido de expresión determinará los niveles de expresión. La mayor parte de los sistemas de expresión génica diseñados para elevados niveles de expresión contienen la secuencia del intensificador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV) intacta. No obstante, se ha informado sobre la infrarregulación del promotor de CMV a lo largo del tiempo en tejidos. No se ha observado hipermetilación del promotor de CMV, observada cuando se incorporaba a vectores retrovirales, para plásmidos episómicos *in vivo*. A pesar de todo, el silenciamiento del promotor de CMV podía estar ligado a su sensibilidad a niveles reducidos del factor de transcripción NF- κ B. También se ha demostrado que la actividad del promotor de CMV está atenuada por diferentes citoquinas incluyendo los interferones (α y β), y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). Con el fin de prolongar la expresión *in vivo* y asegurar la especificidad de expresión en los tejidos deseados, se han incorporado a los plásmidos de expresión intensificadores/promotores específicos de tejidos. Se ha demostrado que el promotor de la alfa-actina esquelética de pollo proporciona elevados niveles de expresión (equivalentes a los alcanzados con un constructo dirigido por CMV) durante varias semanas en músculos estriados no aviares.

Se pueden añadir secuencias genéticas adicionales a los plásmidos de expresión para influir en la estabilidad del ARN mensajero (ARNm) y en la eficacia de la traducción. Se sabe que la región no traducida 5' (UTR 5') afecta a la traducción y está localizada entre el sitio de la caperuza y el codón de iniciación. La región UTR 5' debería ser idealmente relativamente corta, desprovista de estructura secundaria firme y codones de inicio aguas arriba, y debe tener un codón de inicio AUG dentro de un contexto local óptimo. La UTR 5' también puede influir en la estabilidad del ARN, el procesamiento del ARN y la transcripción. Con el fin de maximizar la expresión génica asegurando un empalme del ARN eficaz y exacto, se pueden incluir uno o más intrones en los plásmidos de expresión en localizaciones específicas. La posibilidad de un empalme ineficaz y/o inexacto se puede minimizar utilizando intrones sintéticos que tengan un sitio de unión idealizado y secuencias puntuales ramificadas que coincidan con la secuencia consenso. Otra secuencia importante dentro del sistema de expresión de genes es la región no traducida 3' (UTR 3'), una secuencia del ARNm que se extiende desde el codón de parada hasta el sitio de adición de poli(A). La UTR 5' puede influir en la estabilidad del ARNm, la traducción y la localización intracelular. Se ha demostrado que la UTR 3' del α -actina del músculo esquelético estabiliza el ARNm en tejidos musculares conduciendo de este modo a niveles más elevados de expresión en comparación con otras UTR 3'. Esta UTR 3' parece inducir una compartimentalización intracelular diferente de las proteínas producidas, evitando el tráfico eficaz de las proteínas a la ruta secretora y favoreciendo su localización perinuclear.

Uno de los rasgos atractivos de los sistemas de expresión de plásmidos es la posibilidad de expresar múltiples genes a partir de un único constructo. Estos sistemas multivalentes pueden encontrar aplicaciones en la expresión de proteínas heterodiméricas, tales como anticuerpos, o en la producción *in vivo* de múltiples antígenos para generar una respuesta inmunitaria potente para la vacunación génica. En la inmunoterapia del cáncer, la expresión simultánea de moléculas co-estimuladoras con una variedad de citoquinas también puede conducir a respuestas intensificadas.

El término "vector" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una construcción que incluye material genético diseñado para dirigir la transformación de una célula elegida como diana. Un vector contiene material genético múltiple, preferiblemente fragmentos contiguos de ADN o ARN, orientados posicionalmente y secuencialmente con otros elementos necesarios de manera que el ácido nucleico pueda ser transcrito y cuando sea necesario traducido en las células transfectadas. El "vector" preferiblemente es una molécula de ácido nucleico que incorpora secuencias que codifican uno o varios productos terapéuticos así como diferentes elementos reguladores para la transcripción, la traducción, la estabilidad del transcrito, la replicación, y otras funciones conocidas en la técnica. El vector permite preferiblemente la producción de un producto codificado por una secuencia de ácido nucleico contenida en el vector. Por ejemplo, la expresión de una proteína concreta del factor del crecimiento codificada por un gen concreto. Un "vector de ADN" es un vector cuya forma nativa es una molécula de ADN. Un "vector viral" es un vector cuya forma nativa es como el material genómico de una partícula viral.

El término "transfección" según se utiliza en la presente memoria hace referencia al procedimiento de introducción de ADN (p. ej., vector de expresión de ADN formulado) en una célula, permitiendo de ese modo la transformación celular. Después de la entrada en la célula, el ADN transfectado puede: (1) recombinarse con el del anfitrión; (2) replicar independientemente como plásmido o fago atemperado; o (3) mantenerse como episoma sin replicación antes de su eliminación.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "transformación" hace referencia a cambios transitorios o permanentes en las características (fenotipo expresado) de una célula inducidos por la absorción de un vector por esa célula. El material genético es introducido en una célula en una forma en la que expresa un producto génico específico o altera la expresión o el efecto de productos génicos endógenos. La transformación de la célula puede estar asociada con la producción de una variedad de productos génicos incluyendo proteínas y ARN. Estos productos pueden funcionar como elementos estructurales intracelulares o extracelulares, ligandos, hormonas, neurotransmisores, factores reguladores del crecimiento, enzimas, quimiotaxinas, proteínas del suero, receptores,

portadores para compuestos de bajo peso molecular, fármacos, inmunomoduladores, oncogenes, citoquinas, supresores de tumores, toxinas, antígenos tumorales, antígenos, inhibidores antisentido, inhibidores de la formación de la triple hélice, ribozimas, o en forma de un ligando que reconoce determinantes estructurales específicos sobre estructuras celulares con el fin de modificar su actividad. Esta lista es sólo un ejemplo y no se pretende que sea limitante.

Un "producto génico" representa los productos codificados por el vector.

Los ejemplos de productos génicos incluyen moldes de ARNm para la traducción, ribozimas, ARN antisentido, proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, fosfoproteínas y polipéptidos. La secuencia de ácido nucleico que codifica el producto génico puede asociarse con un ligando de redireccionamiento para llevar a cabo una liberación dirigida.

"Absorción" representa la translocación del vector desde compartimentos extracelulares a intracelulares. Esto puede implicar procedimientos mediados por receptores, fusión con membranas celulares, endocitosis, potocitosis, pinocitosis u otros mecanismos de translocación. El vector puede ser absorbido tal cual o como parte de un complejo.

Administración, según se utiliza en la presente memoria hace referencia a la ruta de introducción de las composiciones de la invención en el cuerpo de células u organismos. La administración incluye el uso de métodos electroporéticos como los proporcionados por un dispositivo de voltaje de pulsos hacia las zonas elegidas como diana del organismo de mamíferos tales como las células musculares y las células linfáticas en regiones tales como los nódulos linfáticos. La administración también incluye la administración intradérmica, intra-tumoral y subcutánea.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición es una cantidad que es suficiente para ocasionar un alivio o mejora al menos temporal de un síntoma o indicio de una enfermedad o afección. De este modo, la cantidad también es suficiente para ocasionar un efecto farmacológico. No es necesario que la cantidad de la composición ocasione una mejora permanente o una mejora de todos los síntomas o indicios.

El término "dispositivo de voltaje de pulsos", o "dispositivo de inyección con voltaje de pulsos" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un aparato que es capaz de ocasionar u ocasiona la absorción de moléculas de ácido nucleico en las células de un organismo emitiendo un pulso localizado de electricidad en las células, haciendo de ese modo que la membrana celular se desestabilice y se produzca la formación de pasillos o poros en la membrana celular. Se entiende que los dispositivos convencionales de este tipo están calibrados para permitir a un experto en la técnica la selección y/o el ajuste de la amplitud del voltaje y/o la duración del voltaje de pulsos deseados y por lo tanto se espera que los futuros dispositivos que realicen esta función también sean calibrados de la misma manera. El tipo de dispositivo de inyección no se considera un aspecto limitante de la presente invención. La importancia principal de un dispositivo de voltaje de pulsos es, de hecho, la capacidad del dispositivo para facilitar el reparto de las composiciones de la invención en las células de un organismo. El dispositivo de inyección por voltaje de pulsos puede incluir, por ejemplo, un aparato electroporético como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5.439.440, la Patente de los Estados Unidos 5.704.908 o la Patente de los Estados Unidos 5.702.384 o como se publica en los documentos PCT WO 96/12520, PCT WO 96/12006, PCT WO 95/19805, y PCT WO 97/07826.

El término "aparato" según se utiliza en la presente memoria hace referencia al conjunto de componentes que después de su combinación permiten el reparto de las composiciones de la invención en las células de un organismo mediante métodos de reparto por voltaje de pulsos. El aparato de la invención puede ser una combinación de una o varias jeringas, diferentes combinaciones de electrodos, dispositivos que sean útiles para la selección de la diana mediante métodos tales como fibras ópticas y vídeocontrol, y un generador para producir pulsos de voltaje que pueden ser calibrados para diferentes amplitudes, duración y ciclos de voltaje. La jeringa puede tener una variedad de tamaños y puede ser seleccionada para inyectar las composiciones de la invención a diferentes profundidades de reparto tales como la piel de un organismo, tal como un mamífero, o a través de la piel.

El término "organismo" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a su uso común por los expertos normales en la técnica. El organismo puede incluir microorganismos, tales como levaduras o bacterias, plantas, aves, reptiles, peces o mamíferos. El organismo puede ser un animal de compañía o un animal doméstico. Preferiblemente el organismo es un mamífero y es por lo tanto cualquier organismo de sangre caliente. Más preferiblemente el mamífero es un ser humano.

El término "animal de compañía" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a aquellos animales tratados tradicionalmente como "mascotas" tales como por ejemplo, perros, gatos, caballos, aves, reptiles, ratones, conejos, hámsters, y similares. El término "animal doméstico" utilizado en la presente memoria hace referencia a aquellos animales considerados tradicionalmente domésticos, entre los que están incluidos los considerados "animales de compañía" junto con animales tales como, cerdos, pollos, patos, vacas, cabras, corderos, y similares.

5 Por "prolongar la biodisponibilidad localizada de un ácido nucleico" se quiere significar que un ácido nucleico cuando es administrado a un organismo en una composición que comprende semejante compuesto estará disponible para su absorción por las células durante un período de tiempo más prolongado que si se administrara en una composición sin dicho compuesto, por ejemplo, cuando se administra en una formulación tal como una solución salina. Este aumento de la disponibilidad del ácido nucleico para las células se podría producir, por ejemplo, debido al aumento de la duración del contacto entre la composición que contiene el ácido nucleico y una célula o debido a la protección del ácido nucleico frente al ataque por las nucleasas. Los compuestos que prolongan la biodisponibilidad localizada de un ácido nucleico son adecuados para la administración interna.

10 Por "adecuado para la administración interna" se quiere significar que los compuestos son adecuados para ser administrados en el tejido de un organismo, por ejemplo en un músculo o en un espacio articular, intradérmicamente o subcutáneamente. Otras formas de administración que se pueden utilizar son tópica, oral, pulmonar, nasal y mucosal; por ejemplo, bucal, vaginal o rectal. Las propiedades que hacen que un compuesto sea adecuado para la administración interna pueden incluir, por ejemplo, la ausencia de un elevado nivel de toxicidad para el organismo en su totalidad.

15 Por "soluciones" se quieren significar polímeros solubles en agua y/o tensioactivos en solución con ácidos nucleicos.

Formulaciones poliméricas para la liberación de plásmidos en el músculo

20 La presente invención proporciona formulaciones poliméricas que tratan los problemas asociados con la inyección de ácidos nucleicos suspendidos en solución salina. Los plásmidos no formulados (moléculas de ácido nucleico desnudas) suspendidos en solución salina tienen una escasa biodisponibilidad en el músculo debido a la rápida degradación del plásmido por las nucleasas extracelulares. Un posible enfoque para superar la escasa biodisponibilidad consiste en proteger el plásmido de la rápida degradación por las nucleasas, por ejemplo, condensando el plásmido con agentes complejantes catiónicos comúnmente utilizados. Sin embargo, debido a la fisiología del músculo, el uso de plásmidos que contienen partículas condensadas rígidas para una transfección eficaz de un número más grande de células musculares no ha resultado satisfactorio hasta la fecha. Los complejos de plásmidos con lípidos catiónicos y polilisina no atraviesan la lámina externa para lograr el acceso a las caveolas y los túbulos T (Wolff, J. A., et al., 1992, J. Cell. Sci. 103: 1249-1259).

30 De este modo, la invención aumenta la biodisponibilidad del plásmido en el músculo: protegiendo el plásmido de la rápida degradación por las nucleasas extracelulares; dispersando y conservando intacto el plásmido en el músculo y/o tumor; y facilitando la absorción del plásmido por las células del músculo y/o el tumor. Un método específico para lograr esto, que se utiliza preferiblemente junto con la liberación por pulsos, es el uso de los polímeros aniónicos de acuerdo con la presente invención.

Administración

35 Administración, según se utiliza en la presente memoria hace referencia a la ruta de introducción de un plásmido o portador de ADN en el organismo. La administración puede ser directamente en un tejido diana o una liberación dirigida al tejido diana después de la administración sistémica. En particular, la presente invención, si bien no se refiere específicamente a esto per se, se puede utilizar para tratar afecciones por medio de la administración de la formulación al organismo con el fin de establecer la expresión controlada de cualquier secuencia de ácido nucleico específica dentro de los tejidos a ciertos niveles que son útiles para la terapia génica.

40 Los métodos preferidos para la administración del vector (plásmido) y el uso de formulaciones para la liberación se han descrito más arriba. Las realizaciones preferidas son mediante liberación por voltaje de pulsos en células combinada con inyección con aguja o sin aguja, o por medio de voltaje de pulsos de aplicación directa donde los electrodos del dispositivo de electroporación se presionan directamente contra el tejido o las paredes elegidos como diana, tales como por ejemplo células epidérmicas, y el vector se aplica tópicamente antes o después de la aplicación del pulso y se libera a través y/o hacia las células.

50 La ruta de administración de cualquier constructo vector seleccionado dependerá del uso concreto para los vectores de expresión. En general, una formulación específica para cada constructo vector utilizado se centrará en la liberación del vector con respecto al tejido concreto elegido como diana, los parámetros de la liberación del voltaje, seguido de la demostración de eficacia. Los estudios de liberación incluirán la absorción para evaluar la absorción celular de los vectores y la expresión del ADN de elección. Tales análisis también determinarán la localización del ADN diana después de la absorción, y establecerán los requerimientos para el mantenimiento de las concentraciones en estado estacionario de la proteína expresada. Después se pueden someter a ensayo la eficacia y la citotoxicidad. La toxicidad no solo incluirá la viabilidad celular sino también la función celular.

55 Las células musculares tienen la única capacidad de absorber ADN procedente del espacio extracelular después de una simple inyección de partículas de ADN en forma de una solución, suspensión, o coloide en el

músculo. La expresión del ADN mediante este método puede ser mantenida durante varios meses.

El método de liberación seleccionado debe dar como resultado la expresión del producto génico codificado dentro de la casete de ácido nucleico a niveles que ejerzan un efecto biológico apropiado. La tasa de expresión dependerá de la enfermedad, la farmacocinética del vector y del producto génico, y la ruta de administración, pero debe estar en el intervalo de 0,001 - 100 mg/kg de peso corporal/día, y preferiblemente de 0,01 - 10 mg/kg de peso corporal/día. Este nivel es fácilmente determinable mediante métodos convencionales. Podría ser más o menos dependiendo de la dosificación óptima. La duración del tratamiento se prolongará mientras se mantengan los síntomas de la enfermedad, posiblemente de manera continua. El número de dosis dependerá de la enfermedad, el vehículo de liberación, y los datos de eficacia de las pruebas clínicas.

10 Variables de la inyección de ADN

El nivel de liberación y expresión génica o la intensidad de una respuesta inmunitaria lograda por medio de la presente invención se pueden optimizar alterando las siguientes variables. Las variables son: la formulación (composición, topología del plásmido), la técnica y el protocolo de la inyección (zona de la inyección, duración y amplitud del voltaje, separación del electrodo, número de pulsos emitido, tipo de disposición de la aguja, células pulsadas antes de la inyección, o células pulsadas después de la inyección, estado del músculo, estado del tumor), y, pre-tratamiento del músculo con agentes miotóxicos. La respuesta inmunitaria se puede medir mediante, pero no está limitada a, la cantidad de anticuerpos producidos para una proteína codificada y expresada por molécula de ácido nucleico inyectada.

Otras variables de inyección que se pueden utilizar para afectar significativamente a los niveles de proteínas, anticuerpos y/o linfocitos T citotóxicos producidos en respuesta a la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico formulada proporcionada por medio del método de inyección por voltaje de pulsos de la presente invención son el estado del músculo que está siendo inyectado y la técnica de inyección. Los ejemplos de las variables incluyen la estimulación del músculo, la contracción del músculo, el masaje del músculo, el ángulo de liberación, y la manipulación del aparato. El masaje del músculo puede forzar la salida del plásmido fuera del músculo o bien directamente o bien por medio del drenaje linfático. Alterando la profundidad de la penetración y/o el ángulo al cual se coloca el dispositivo de voltaje de pulsos en relación con las fibras del músculo, la presente invención mejora la distribución del plásmido en toda la zona de la inyección que posteriormente aumenta la respuesta de anticuerpos a la proteína que es codificada y expresada por el plásmido.

Terapia basada en ácidos nucleicos

Se puede utilizar la presente invención para liberar las vacunas de ácido nucleico de una manera más eficaz que la que se realiza convencionalmente en la actualidad. Las vacunas de ácido nucleico, o el uso de plásmidos que codifican antígenos o moléculas terapéuticas tales como la Hormona del Crecimiento Humana, se han convertido en un área de investigación y desarrollo minuciosos en la última media década. Se han publicado revisiones exhaustivas sobre las vacunas basadas en ácidos nucleicos (M. A. Liu, et al. (Eds.), 1995, DNA Vaccines: A new era in vaccinology, Vol. 772, Ann. NY. Acad. Sci., New York; Kumar, V., y Sercarz, E., 1996, Nat. Med. 2: 857-859; Ulmer, J. B., et al., (Eds.) Current Opinion in Immunology; 8: 531-536. Vol. 772, Ann. NY. Acad. Sci., New York). La inmunidad protectora en un modelo animal utilizando un plásmido que codifica una proteína viral fue observada por primera vez en 1993 por Ulmer et al. (Ulmer, J. B., et al., 1993, Science 259: 1745-1749). Desde entonces, varios estudios han demostrado una inmunidad protectora para diferentes enfermedades diana y se han iniciado pruebas clínicas en seres humanos.

Se han investigado muchas enfermedades diana. Los ejemplos incluyen antígenos de *Borrelia burgdorferi*, el agente infeccioso portado por la garrapata para la enfermedad de Lyme (Luke et al., J. Infect. Dis. 175: 91-97, 1997), el virus de la inmunodeficiencia humana 1, (Letvin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94: 9378-9383, 1997), el linfoma de células B (Syrengelas et al., Nature Medicine. 2: 1038-41, 1996), el virus Herpes simplex (Bourne et al., J. Infectious dis. 173: 800-807, 1996), el virus de la hepatitis C (Tedeschi et al., Hepatology 25: 459-462, 1997), el virus de la rabia (Xiang et al., virology, 209: 569-579, 1995), *Mycobacterium tuberculosis* (Lowrie in Genetic Vaccines and Immunotherapeutic Strategies CA Thibeault, ed. Intl Bus Comm, Inc., Southborough, MA 01772 págs. 87-122, 1996), y *Plasmodium falciparum* (Hoffman et al., Vaccine 15: 842-845, 1997). Adicionalmente, el tratamiento basado en ácidos nucleicos para la reducción de la inmunogenicidad, el crecimiento, y la proliferación de las células tumorales es indicativo de la terapia génica para enfermedades tales como el cáncer de cerebro tumorigénico (Fakhrai et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 2909-2914, 1996).

Un objetivo importante de la terapia génica es la afectación de la absorción de los ácidos nucleicos por las células, ocasionando de ese modo una respuesta inmunitaria a la proteína codificada por el ácido nucleico inyectado. Las vacunas basadas en ácidos nucleicos son una estrategia de vacunación alternativa atractiva a las vacunas de subunidades, las vacunas de proteínas virales purificadas, o las vacunas de vectores virales. Cada uno de los enfoques tradicionales tiene limitaciones que son superadas si el antígeno o los antígenos son expresados directamente en las células del organismo. Además, estas vacunas tradicionales son solamente protectoras de una

manera específica de la cepa. De este modo, es muy difícil, incluso imposible utilizar los enfoques de vacunas tradicionales para obtener una inmunidad de larga duración a virus que tienen varios tipos de sueros o virus que son propensos a mutaciones.

Las vacunas basadas en ácidos nucleicos ofrecen el potencial de producir inmunidad de larga duración frente a epítomos virales que están altamente conservados, tales como las nucleoproteínas de los virus. La inyección de plásmidos que codifican proteínas específicas por medio de la presente invención produce un aumento de las respuestas inmunitarias, medidas mediante la producción de anticuerpos. De este modo, la presente invención facilita, pero no incluye nuevos métodos para proporcionar vacunas de ácidos nucleicos mediante la liberación de una molécula de ácido nucleico formulada con un dispositivo de voltaje de pulsos como se describe en la presente memoria.

La eficacia de las vacunas de ácidos nucleicos puede, en general, ser intensificada mediante al menos uno de los tres métodos siguientes: (1) el uso de sistemas de liberación para incrementar la estabilidad y la distribución del plásmido dentro del músculo, (2) la expresión (o liberación) de moléculas para estimular la presentación/transferencia de antígenos, o (3) el uso de coadyuvantes que pueden modular la respuesta inmunitaria.

Enfermedades y Afecciones para la Liberación Intramuscular de Plásmidos

La presente invención descrita en la presente memoria se puede utilizar para la liberación y expresión de muchas secuencias codificantes diferentes. Las secuencias codificantes se pueden utilizar para aliviar los efectos de errores innatos del metabolismo, deficiencias genéticas de ciertas proteínas necesarias, desequilibrios metabólicos y reguladores adquiridos y regulación celular alterada tal como el cáncer. La composición que contiene la secuencia codificante se administra preferiblemente mediante liberación por voltaje de pulsos y puede requerir, según sea necesario, la exposición del tejido que se vaya a tratar por métodos quirúrgicos según determine un profesional certificado.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración de la invención, con tal que pertenezcan al sujeto abarcado dentro del alcance de las reivindicaciones.

Preparación de las Formulaciones

Se elaboraron las formulaciones tomando alícuotas de volúmenes apropiados de soluciones de partida estériles de agua, plásmido, polímero, tampón y/o NaCl 5M para obtener un plásmido final en solución salina isotónica. La concentración total de plásmido de todas las formulaciones se midió mediante absorción UV a 260 nm. La presión osmótica de las formulaciones seleccionadas se midió utilizando un Osmómetro para Micro-Muestras Fiske Uno-Diez (Fiske Associates; Norwood, MA). Se midió el porcentaje de plásmido superenrollado utilizando la electroforesis en gel de agarosa al 1% seguida de formación de imágenes mediante fluorescencia.

Los plásmidos se formularon en Tris 5-10 mM, pH 7,5 o solución salina (NaCl 150 mM) o se mezclaron con un polímero en solución salina isotónica. El plásmido utilizado para la inyección se formuló con diferentes polímeros en una solución salina isotónica. Por lo general, la concentración de plásmido fue de 1-2 mg/ml en solución salina, o se formuló con polivinilpirrolidona (PVP, 5%) o 6 mg/ml de poli-L-glutamato (Sigma, St Louis, MO) en solución salina.

Los polímeros aniónicos incluyeron poli(ácido L-glutámico) (p-L-Glu), sal de sodio, de diferentes pesos moleculares (grado de polimerización (GP) o 9 (Sigma P1943), grado de polimerización de 10 (Sigma P1818), 2-15 kDa (Sigma P4636), 15-50 kDa (Sigma P4761) y 50-100 kDa (Sigma P4886)), poli(ácido D-glutámico (p-D-Glu) de 15-50 (Sigma P4033) y 50-00 kDa (Sigma 4637), poli(ácido L-aspártico) (p-L-Asp), sal de sodio, de 2-15 (Sigma P5387) y 15-50 kDa (Sigma P6762) y poli(ácido acrílico) (pAA), sal de sodio, de 5 y 60 kDa. Los poliaminoácidos se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO), mientras el poli(ácido acrílico) se adquirió de Fluka (Suiza).

Las formulaciones de ADN/polímero aniónico se prepararon preferiblemente tomando alícuotas de volúmenes apropiados de soluciones de partida estériles de plásmido, polímero aniónico y NaCl 5M para obtener concentraciones de plásmido y polímero aniónico finales seleccionadas. El polímero aniónico se añadió a la solución de ADN antes de añadir la sal para el ajuste de la tonicidad. De este modo, se preparan preferiblemente formulaciones de poli-L-glutamato combinando una solución de partida acuosa de poli-L-glutamato de sodio (sal de sodio de poli(ácido L-glutámico) con una solución de partida de ADN plasmídico purificado en solución salina o Tris hasta 10 mM, pH 7,5. Después se combinan el poli(ácido L-glutámico) y el ADN, se ajusta a una concentración final de NaCl 150 mM mediante la adición de una solución de partida de NaCl 5M.

Se midió la osmolalidad de cada formulación utilizando un Osmómetro para Micro-Muestras Fiske Uno-Diez (Fiske Associate, Norwood MA). Las formulaciones también se caracterizaron midiendo la densidad óptima a 260 y 280 nm, y determinando la conformación del plásmido sobre un gel de agarosa al 1%.

Ensayo de Estabilidad para el Plásmido En la Formulación

Para el análisis de estabilidad del ADNp en la formulación, se cargaron 50 ng del ADNp formulado con 5 microlitros de colorante marcador en gel de agarosa al 1% tampón tris-acetato-EDTA (TAE) al 1% y se hizo circular el gel a 100 voltios durante 1-2 horas. Después el gen se tiñó con SYBR Green II (Molecular Probes, Inc.) durante 20 minutos. El gel teñido se lavó con agua y se determinó el % de ADN superenrollado y circular abierto utilizando Fluorinate (Molecular Dynamics Co., Sunnyvale, CA).

Protocolo de Elisa

Se recubrieron placas de análisis de alta afinidad con antígeno diluido en PBS (50 microlitros/pocillo) y se pusieron a 4°C durante la noche. Después de dejar que la placa o las placas regresaran a la temperatura ambiente, todos los pocillos se bloquearon con 200 microlitros/pocillo de BSA al 4%/solución de NGS al 4% elaborada en 1X PBS/Tween 20 durante 1 hr a 37°C. Se añadieron muestras de suero (50 microlitros/pocillo a una dilución de partida de 1:100 en BSA al 4%/NGS al 4%/PBS/Tween20, por duplicado) y se incubaron durante 1-2 horas a 37°C. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 y se añadieron 50 microlitros/pocillo de anticuerpo secundario conjugado con HRP, diluido en BSA al 1%, y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se lavaron las placas con PBS/Tween 20 y se añadieron 100 microlitros/pocillo de reactivo soluble en TMB. Se incubaron a la temperatura ambiente durante 10 minutos y se detuvo la reacción añadiendo 50 microlitros/pocillo de H₂SO₄ 0,2 M. Se leyeron las placas a 450 nm.

Plásmidos

Se elaboraron los plásmidos pAP1166 y pFN0945 (SEQ ID NO: 3) que contenían un intensificador-promotor de CMV y un gen informador de fosfatasa alcalina placentaria humana secretada (SEAP) (pAP1166) o la región codificante de hF. IX (pFN0945 SEQ ID NO: 3) y se purificaron en Valentis, Inc. El mapa plasmídico de pFN0945 se muestra en la Figura 17. El plásmido con el factor IX humano (hF. IX) se preparó insertando una secuencia codificante sintética en la cual los codones raros fueron convertidos en los prevalentes y los sitios de empalme crípticos potenciales fueron anulados (Oberon Technologies Inc., Alameda, CA). La secuencia codificante de hF. IX fue insertada en el esqueleto del plásmido Valentis que contenía una UTR 5' de 107 pb, un intrón sintético de 117 pb, la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humana, un origen de replicación de PUC12 y un gen de resistencia a kanamicina. El gen hF. IX estaba dirigido por el intensificador/promotor de CMV. Los plásmidos se hicieron crecer en Escherichia coli DH5α y se purificaron utilizando un método patentado que implicaba métodos de lisis alcalina y cromatográficos (Abruzzese, R. V., et al. (1999) Hum Gene Ther 10: 1499-1507, incorporado a la presente memoria como referencia). Los plásmidos para la fosfatasa alcalina secretada humana (SEAP) y la eritropoyetina humana fueron idénticos al plásmido hF. IX excepto por la región codificante.

Animales Experimentales

Los ratones C57BL/6 macho (19-21 g), los ratones CD-1 macho (29-31 g), los ratones C. B-17/lcrCrl-scid-bgBR (SCID BEIGE) macho (7 semanas de edad) y los ratones C57BL/6 hembra (7-8 semanas) se obtuvieron de Charles River Laboratories y se aclimataron durante un período de 3-7 días en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a 23°C/40 % de HR de acuerdo con las directrices estatales y federales. Se proporcionaron alimento (pienso para roedores Purina) y agua ad libitum. Los animales se alojaron en unidades de enjaulamiento dotadas de filtros hepa (4 ratones por aislante) con lecho esterilizado, alimento y agua. El cambio de jaula y todas las manipulaciones con los ratones SCID se realizaron en una cubierta de flujo laminar. Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal (IP) con una combinación de anestesia (Cetamina, Xilazina y Acepromazina) a una dosis de 1,8-2,0 mL/kg (ratones). Los perros Beagle (Harlan, Indianapolis, IN) se mantuvieron en Stillmeadow, Inc. (Sugarland, TX) de acuerdo con las directrices del Institutional Animal Care and Use Committee.

Infecciones Animales

Después de la anestesia, se afeitaron los miembros traseros y se frotaron con betadine seguido de etanol del 70%. Se inyectaron 10 microlitros de la formulación con 10 microgramos del plásmido formulado utilizando una jeringa para insulina de 0,3 ml con una aguja de 0,5, calibre 28 (Becton Dickinson, Granklin Lake, NJ). Los volúmenes inyectados en los ratones fueron 25 microlitros y 50 microlitros en el tibial craneal y el gastrocnemio, respectivamente. Cuando se indicó, siete días después de la inyección de la formulación, los animales se sacrificaron mediante asfixia con CO₂ y se recogieron los músculos tibiales anteriores, se sumergieron rápidamente en nitrógeno líquido, y se liofilizaron durante la noche. Los músculos secados se utilizaron o se almacenaron a -80°C para la determinación adicional de la actividad del gen informador.

Dispositivo y Regímenes de Dosificación

Se administró el plásmido formulado a la dosis requerida a los roedores mediante inyección longitudinal en ambos músculos tibiales craneales o gastrocnemios (administración bilateral). Manteniendo la pata inferior completa entre los electrodos del calibrador, se puede obtener una buena "electrotransfección". Aproximadamente dos minutos después de la inyección, se aplicó un campo eléctrico en forma de 2 pulsos de onda cuadrada (uno por

segundo) de 25 milisegundos ("ms") cada uno y se emitieron 375 V/cm por medio de un Electro Square Porator (T820, BTX, San Diego, CA). Los electrodos de pinza consisten en 2 calibradores de placa paralelos de acero inoxidable (1,5 cm²) que se colocan en contacto con la piel de manera que la pata se mantiene en posición semi-extendida a lo largo de la administración del pulso. Se describe la distancia de separación de los electrodos. Por lo general la pata del ratón se colocó entre las dos placas, que se comprimieron entre sí hasta acomodarla con una distancia de separación de 3-4 mm entre las placas. Después se generaron pulsos de 25 ms a un voltaje de 375 V/cm con un T-820 Electro Square Porator (Genetronics, San Diego, CA). Los pulsos se administraron a un ritmo de ~1/segundo.

Los perros se anestesiaron con isoflurano para los procedimientos de inyección y electroporación. Se utilizó un electrodo en serie de 6 agujas (Genetronics, San Diego, CA) (Jaroszeski, M. J., et al. (1997) *Biochim Biophys Acta* 1334: 15-18). El régimen de electroporación fue de 6 pulsos de 60 ms de duración a un voltaje de 200 V/cm. La polaridad del pulso se revirtió después de cada pulso bajo el control de un Auto Switcher (Genetronics, San Diego, CA). Después del procedimiento de electroporación se tatuó la piel por encima del músculo inyectado para identificar el lugar de la inyección para un análisis posterior. También se inyectaron partículas de carbono en algunos de los músculos después de la electroporación como marcador del sitio de la inyección para análisis histológicos.

En una realización, el enfoque de la liberación de genes utiliza un régimen de electroporación con un voltaje bajo (375 V/cm), un pulso largo (25 ms) en ratones, en contraste con otros protocolos que utilizan parámetros de voltaje elevado (1.800 V/cm) y pulso corto (100 µs) (Vicat, J. M., et al (2000) *Hum Gene Ther* 11: 909-916).

Análisis del Suero

Se recogieron muestras de sangre en los momentos puntuales apropiados después de la administración del plásmido. Los ratones se anestesiaron IP con Cetamina (60 mg/kg) (Phoenix Scientifics, Inc., St Louis, MO). Se aplicó en el ojo una solución oftálmica de hidrocloreto de proparacaína (Solvay Animal Health Inc., Mendota Heights, MN). La sangre se recogió en tubos separadores de suero Microtainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y se dejó que se coagulara durante 15-30 minutos antes de centrifugar a 7.000 rpm durante 5 minutos. Se determinaron los niveles en suero de SEAP utilizando un análisis de quimioluminiscencia (Tropix, Bedford, MA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Para los análisis de F. IX, se obtuvieron muestras de sangre procedente del plexo retroorbital de los ratones. Se recogieron aproximadamente 250 microlitros de sangre en tubos Microtainer con EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La sangre se centrifugó a ~5.000 g durante 5 minutos. Las muestras de plasma se congelaron a -80°C y se almacenaron hasta que se utilizaron para su análisis. Se determinaron los niveles en plasma de hF. IX utilizando el kit Asserachrom IX: Ag human F. IX ELISA (Diagnostica Stago, Francia). Se utilizó F. IX humano purificado (Sigma, St. Louis, MO) para generar una curva patrón. Para los perros, se recogió la sangre de la vena yugular de animales conscientes en tubos para plasma con EDTA. Se obtuvo el plasma de referencia para los ELISA a partir de cada animal antes del tratamiento. Se determinaron los niveles en suero de eritropoyetina utilizando un kit de ELISA disponible en el mercado de R&D Systems (Minneapolis, MN).

Análisis de Transferencia Western

Se cargó hF. IX purificado (Sigma, St. Louis, MO) en tampón de la muestra (Tris 0,5 M, SDS al 1,5%, (β-mercaptoetanol al 4%, glicerol al 10%, azul bromofenol al 0,03%) en gel de poliacrilamida con Tris-glicina al 10% (Novex, San Diego, CA). Después de la electroforesis, la proteína fue transferida a una membrana de nitrocelulosa (Novex, San Diego, CA). Después las membranas se incubaron primero en plasma canino (1:50) de animales tratados o de perros normales (control negativo). Para el control positivo se incubó la membrana en plasma canino normal con una cantidad añadida de anticuerpo anti-hF. IX de conejo (1:1.000 final). El segundo anticuerpo fue o anticuerpo anti-canino de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, St. Louis, MO) o anticuerpo anti-conejo de oveja conjugado con HRP (Sigma, St. Louis, MO). Las bandas de las transferencias se visualizaron utilizando un kit de sustrato de peroxidasa (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

Creatina Quinasa (CK)

Se congeló suero recogido de perros y se envió sobre hielo seco por medio de un servicio de mensajería nocturno a IDEXX Veterinary Services (West Sacramento, CA) para el análisis de los niveles de CK mediante la metodología convencional.

Análisis Histológico y Tipaje de Fibras

Para la inmunohistoquímica de hF. IX en tejido de ratón se utilizó un método modificado de Herzog et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94 (11), 5804-5809. En resumen, se fijaron criosecciones de tejido de 10 micrometros en paraformaldehído al 3% durante 15 minutos, se enjuagaron en PBS, se trataron con metanol durante 10 minutos, se lavaron tres veces en PBS y después se bloquearon en suero de cabra normal al 20%. Las secciones se incubaron con posterioridad durante 1 hora con un anti-hF. IX de conejo purificado por afinidad (Dako Corp.,

Carpinteria, CA.) que estaba diluido 1:6.000 en PBS/BSA al 1%. Las secciones se enjuagaron con PBS y se incubaron con anti-IgG de conejo de cabra biotinilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA.) diluida 1:400 en PBS durante 30 minutos. Las secciones se enjuagaron y se visualizó la tinción de hF. IX utilizando el reactivo Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA.) a una dilución de 1:80 durante 30 minutos seguido de una incubación de 5 minutos en una solución de DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA.). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (VWR, Houston, TX). Todas las etapas de incubación fueron a la temperatura ambiente.

Para el subtipaje de la fibra de ATPasa, se incubaron 10 micrometros de criosecciones de tejido muscular (secciones seriadas de las utilizadas para la tinción del hF. IX) durante 5 minutos en tampón de acetato de barbital, pH 4,6, se transfirieron a solución de ATPasa, pH 9,4, durante 20 minutos, se lavaron tres veces en cloruro de calcio al 1%, se lavaron durante 5 minutos en cloruro de cobalto al 2%, se lavaron diez veces en solución de lavado de barbital sódico 0,01 M, y se enjuagaron en agua destilada durante 5 minutos. Para visualizar la actividad ATPasa, se sumergieron las secciones en sulfuro de amonio al 1,5% durante 20 segundos, se enjuagaron en agua destilada, se deshidrataron en etanol, y se cubrieron con un cubre. A pH 4,6, las fibras de tipo I se tiñen de color pardo oscuro, las fibras de tipo IIA se tiñen de color pardo muy claro y las fibras de tipo IIB son intermedias.

Para los perros, se recogieron muestras de músculo y se colocaron inmediatamente en formalina tamponada neutra al 10% durante la noche a la temperatura ambiente. El tejido se deshidrató utilizando alcohol y después se embebió en parafina. Se cortaron secciones y se tiñeron con hematoxilina de Mayer y eosina (Sigma, St. Louis, MO).

Toda la microscopía se realizó con un microscopio Olympus BX-40 (Olympus America, Melville, NY) equipado con una cámara de vídeo en color DXC- 960MD (Sony Corp., Japón).

EJEMPLO I: Determinación de la Formulación y los Parámetros de Liberación Utilizando Genes Informadores

La formulación del ADN con polímeros aniónicos aumenta la expresión del gen mediada por electroporación después de una inyección intra-muscular. Un ejemplo de un polímero aniónico es un exceso de ADN no codificante, que puede incrementar la expresión del transgén. El protocolo que se utilizó regularmente para transfectar las miofibras de ratones CD-1 o C57BL/6 consistió en una inyección de una solución de ADN seguida, dos minutos más tarde, de la electroporación del músculo inyectado con un electrodo de pinza. Se inyectó simultáneamente una masa constante (0,75 microgramos, 2,5 microgramos o 15 microgramos) de un ADN plasmídico que codificaba el gen de SEAP (fosfatasa alcalina secretada placentaria humana) con diferentes cantidades de un plásmido vacío en el músculo tibial craneal de los ratones CD-1. Plásmido vacío significa que el plásmido no porta las secuencias codificantes para SEAP, ni preferiblemente, ningún otro gen.

La Figura 1 muestra las concentraciones en suero de SEAP a los 7 días de la inyección de las mezclas de ADNp de SEAP/ADN vacío en el músculo tibial craneal de los ratones CD-1 y la electroporación del tejido. Se administraron diferentes cantidades de ADNp de SEAP (0,15 microgramos, 0,75 microgramos, 2,5 microgramos, 6,25 microgramos y 15 microgramos) y un exceso de ADNp vacío (con respecto al ADNp codificante) en 50 microlitros por animal (la mitad de esta dosis por pata). Para cada dosis de ADNp de SEAP sometida a ensayo, la concentración de SEAP en el suero en el pico de expresión (7 días después de la inyección/electroporación) aumento sustancialmente cuando se administró simultáneamente un exceso de 2 veces de ADNp vacío con el ADNp codificante. Por ejemplo, la expresión de SEAP en estas condiciones con 2,5 microgramos de ADNp de SEAP fue similar a la obtenida con 6,25 microgramos de ADNp de SEAP sin ningún plásmido vacío. Cuando la cantidad de ADNp de SEAP administrada fue de 2,5 o 15 microgramos, el aumento adicional del vector vacío (6,30 y 120 veces) dio como resultado un continuo descenso de la expresión de SEAP. A la inversa, para la cantidad más pequeña de ADNp codificante (0,75 microgramos), la expresión de SEAP se mantuvo cuando se inyectó simultáneamente un exceso de 6 veces de ADN vacío.

Esta evolución no monótona de la expresión de SEAP a medida que la cantidad de ADN vacío previamente mezclado con el ADNp de SEAP aumenta, refleja la interacción de dos fenómenos. Primero, la adición del ADNp vacío intensifica la expresión del gen debida a la saturación de un mecanismo de degradación del ADN o a la saturación de un proceso que desactiva el ADN (p. ej, unión a entidades catiónicas tales como cationes divalentes o histonas, en el fluido intersticial y en los núcleos de los miocitos, respectivamente). Este efecto puede dar como resultado un aumento de la absorción intracelular (o intranuclear) o un procesamiento más eficaz del ADNp de SEAP en el núcleo. Segundo, el vector vacío compite con el ADN codificante de SEAP en algunas de las etapas que conducen a la transcripción del transgén, lo que da como resultado una disminución de la expresión de SEAP. Estas etapas incluyen la distribución del ADN en el fluido intersticial antes de la electroporación, la entrada intracelular a través de los electroporos, el tráfico hacia los núcleos, la entrada en los núcleos y la unión a los factores de transcripción.

De este modo, los polinucleótidos que tienen secuencias no codificantes o preferiblemente secuencias al azar pueden funcionar protegiendo de la degradación *in vivo* el plásmido que porta un gen que se pretende expresar en un animal.

Además de la utilización de polinucleótidos o plásmidos vacíos para aumentar la expresión del transgén y protegerlo frente a la degradación, también se pueden utilizar otros polímeros aniónicos. Estos polímeros aniónicos pueden incluir poli-aminoácidos (tales como poli(ácido L-glutámico), poli(ácidos D-glutámicos), poli(ácido L-aspartico), poli-D-aspartico, y sus combinaciones) o poli(ácidos orgánicos) (tales como poli(ácido acrílico) que muestran efectos beneficiosos similares a los del plásmido vacío, pero que no compiten con el ADNp de SEAP en los procedimientos descritos más arriba.

Se encontró que algunos polímeros aniónicos eran considerablemente más potentes que el ADN no codificante para incrementar la expresión del transgén. Se mezclaron polímeros aniónicos con diversos orígenes, pesos moleculares, conformaciones y densidades de carga a diferentes concentraciones con el ADNp de SEAP (0,05 mg/ml) antes de su inyección en el músculo tibial craneal de ratones CD-1. Siete días después del procedimiento de inyección/electroporación (en el pico de expresión), se determinaron las concentraciones en suero de SEAP (Fig. 2). A la dosis baja de ADN sometida a ensayo (1,25 microgramos por tibial), algunos de los polímeros aniónicos seleccionados aumentaron considerablemente la expresión de SEAP. Los niveles más altos de SEAP se obtuvieron con el poli(ácido acrílico) (pAA) de 60 kDa a 3,0 mg/ml y el poli(ácido L-glutámico) de 2-15 kDa a 6,0 mg/ml. La administración simultánea de estos polímeros aniónicos con el ADNp de SEAP aumentó la expresión en 10 y 8 veces, respectivamente (Fig. 2).

Con el fin de caracterizar adicionalmente el efecto beneficioso proporcionado por los polímeros aniónicos, se llevó a cabo el mismo tipo de experimento que se ha mencionado más arriba, pero a una concentración de ADN 10 veces superior de 0,5 mg/ml. La Figura 2 muestra las concentraciones en suero de SEAP a los 7 días de la inyección del ADNp de SEAP desnudo o de mezclas de ADNp de SEAP/polímero aniónico en el músculo tibial craneal de ratones CD-1 y la electroporación del tejido. La cantidad de ADNp de SEAP administrada por animal fue de 2,5 microgramos en 50 microlitros (la mitad de esta dosis por pata). La concentración del polímero aniónico en la solución inyectada varió según se indica en la gráfica. La Figura 3 muestra lo mismo que la Fig. 2, excepto que la cantidad de ADNp de SEAP administrada por animal fue regularmente (a menos que se mencione de otro modo) de 25 microgramos en 50 microlitros (la mitad de esta dosis por pata). La concentración del polímero aniónico (o monómero aniónico cuando sea aplicable) en la solución inyectada varió como se indica en la gráfica.

A esta elevada concentración de ADN, el intervalo de mejoras en la expresión de SEAP resultantes de la adición de un polímero aniónico fue menor que el observado previamente (Fig. 2, 3). En particular, los poli(ácidos acrílicos), muy eficaces a una dosis de ADN baja, fueron casi inactivos. No obstante, los polipéptidos todavía aumentaron sustancialmente la expresión de SEAP (hasta 2 veces con el poli(ácido glutámico) de 2-15 kDa a 6,0 mg/ml). Este resultado fue concretamente notable dado que la expresión de SEAP estaba alcanzando una meseta a esta concentración de ADN. En efecto, cuando el ADN se administró "desnudo", la expresión de SEAP aumentó solamente un 50% y un 15% después de un incremento en la concentración de ADN de 3 veces (desde 0,5 mg/ml a 1,5 mg/ml) y 10 veces (hasta 5,0 mg/ml), respectivamente (Fig. 3).

El hecho de que el monómero de ácido glutámico fuera incapaz de aumentar la expresión, en contraste con el polímero de 2-15 kDa (Fig. 3), demostró que es necesaria una macromolécula para proporcionar el efecto que conduce a expresiones más elevadas. Cuando los resultados de los dos experimentos separados presentados parcialmente en la Fig. 2 y la Fig. 3 se reunieron en la gráfica compuesta (Fig. 5A), la evolución de la expresión de SEAP como una función de la concentración de ADN se pudo comparar para la inyección de ADN desnudo y los dos tratamientos con ADN/polímeros aniónicos (esto es poli(ácido L-glutámico) de 2-15 kDa a 6,0 mg/ml y ADN/poli(ácido acrílico) de 60 kDa (pAA) a 3,0 mg/ml). Después de añadir un polímero aniónico a la solución de ADN aparecieron claramente dos tendencias. En el caso del poli(ácido acrílico) de 60 kDa, el incremento en la expresión de SEAP (en comparación con el ADN desnudo) es elevado pero restringido a concentraciones de ADN bajas e intermedias. En el caso del poli(ácido L-glutámico) de 2-15 kDa, los niveles de expresión son ligeramente más bajos en este intervalo de concentraciones de ADN, pero el efecto beneficioso todavía es sustancial a elevadas concentraciones de ADN.

El procedimiento de inyección/electroporación se llevó a cabo en el músculo gastrocnemio de ratones CD-1, en lugar de en el tibial craneal, para determinar si el incremento en la expresión proporcionado por algunos polímeros aniónicos es específico del músculo utilizado para la expresión. Los polímeros aniónicos seleccionados fueron aquellos que produjeron los niveles de expresión más elevados en los estudios descritos más arriba, esto es, los poli(ácidos L-glutámicos) de 2-15 kDa y 50-100 kDa así como el poli(ácido acrílico) de 60 kDa. Se sometieron a ensayo dos concentraciones de ADN en este estudio, esto es, 0,3 mg/ml (15 microgramos inyectados por gastrocnemio) y 1 mg/ml. La Figura 4 muestra las concentraciones en suero de SEAP a los 7 días de la inyección del ADNp de SEAP o las mezclas de ADNp de SEAP/polímero aniónico en el músculo gastrocnemio de ratones CD-1 y electroporación del tejido. La cantidad de ADNp de SEAP administrada por animal fue de 30 microgramos, 100 microgramos o 300 microgramos en 100 microlitros (la mitad de esta dosis por pata). La concentración del polímero aniónico en la solución inyectada varió según se indica en la gráfica.

Los tres polímeros produjeron un incremento sustancial en la expresión a la dosis baja de ADN (Fig. 4). A la inversa de lo observado cuando las inyecciones se realizaron en el músculo tibial craneal, el poli(ácido acrílico) de

60 kDa fue muy eficaz a su concentración más baja de 0,6 mg/ml y fue menos potente que los poli(ácidos L-glutámicos) utilizados a 6,0 o 12,0 mg/ml. En las mejores condiciones sometidas a ensayo (poli(ácido L-glutámico) de 50-100 kDa a 6,0 mg/ml), la expresión de SEAP se incrementó 8 veces por encima de la obtenida con el ADN desnudo. A la concentración de ADN superior, se acentuaron las tendencias descritas más arriba. El poli(ácido acrílico) de 60 kDa no era inactivo ni inhibidor a concentraciones elevadas, mientras los poli(ácidos L-glutámicos) todavía producían un incremento de 2 a 3 veces en la expresión. De nuevo, este resultado fue concretamente notable, dado que los niveles de expresión alcanzados con el tratamiento con ADN desnudo solamente aumentaron un 10% cuando la concentración de ADN se elevó a 3,0 mg/ml en lugar de 1,0 mg/ml.

La Figura 5A muestra las concentraciones en suero de SEAP el día 7 como función de la cantidad de ADNp de SEAP inyectada en el músculo tibial craneal de ratones CD-1. Las soluciones administradas dos minutos antes de la electroporación consistieron en ADNp de SEAP desnudo o una mezcla de ADNp de SEAP y un poli(ácido acrílico) de 60 kDa a 3,0 mg/ml o una mezcla de ADNp de SEAP y un poli(ácido L-glutámico) de 2-15 kDa a 6,0 mg/ml. La Figura 5B muestra las concentraciones en suero de SEAP el día 7 como una función de la cantidad de ADNp de SEAP inyectada en el músculo gastrocnemio de ratones CD-1. Las soluciones administradas dos minutos antes de la electroporación consistieron en ADNp de SEAP desnudo o una mezcla de ADNp de SEAP y un poli(ácido L-glutámico) a 6,0 mg/ml. Cuando se traza la concentración en suero de SEAP a los 7 días de la inyección como una función de la cantidad de ADN inyectada por animal como en la Figura 5B, el efecto beneficioso de los poli(ácidos L-glutámicos) (a 6,0 mg/ml) sobre la expresión aparece claramente.

EJEMPLO II: Determinación de la Expresión del Gen Informador Utilizando Poli(Ácido L-Glutámico) sin Electroporación

Con el fin de determinar la capacidad del poli(glutamato de sodio) para incrementar la expresión de los genes codificados en el ADN plasmídico sin electroporación, se comparó el ADN plasmídico formulado en solución salina con una formulación en poli(glutamato de sodio) para determinar la expresión después de una inyección intramiocárdica en ratones.

El ADN plasmídico que codificaba la luciferasa (pLC0888) se formuló en solución salina o poli(L-glutamato de sodio) al 6% (Sigma P4636) a concentraciones de plásmido de 1 y 3 mg/mL. Se utilizaron un total de veinte ratones macho CD-1 (29-31 g). Se inyectó en el miocardio directamente después de la exposición quirúrgica. Se inyectaron 10 microlitros de la formulación (utilizando una jeringa de insulina de 3/10 cc) en el ápex del corazón (esto es, en el ventrículo izquierdo). El corazón se recolocó y se suturó el tórax. Siete días después de la inyección, los corazones se separaron y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C hasta que se necesitaron para su análisis. Para el análisis, el músculo del corazón se homogeneizó en un "Bead-Beater" durante 2 minutos antes de la adición de 1 mililitro de 0,5X tampón de Lisis. El tejido se homogeneizó en un "Bead-Beater" durante 5 minutos y se centrifugó durante 10 mins a 13.000 rpm. Los sobrenadantes se analizaron para determinar la actividad luciferasa. Los resultados de la expresión de la luciferasa a los 7 días de la inyección se muestran en la Figura 6. Cada barra representa n = 5. Como se muestra en la Figura 6, el ADN plasmídico formulado con poli(L-glutamato) aumentó la expresión del gen varias veces por encima de la solución salina.

EJEMPLO III: Expresión de Genes Terapéuticos para la Expresión del Factor IX Utilizando Formulaciones de Polímeros

Además de los genes informadores, también se realizaron experimentos utilizando poli(ácidos L-glutámicos) para incrementar la expresión de un gen terapéutico, esto es que codifica el factor de coagulación IX. La potencia de estos polímeros aniónicos se sometió a ensayo con pFN0945 (SEQ ID NO: 3 y Figura 17) a concentraciones de ADN (0,5 mg/ml y 1,0 mg/ml) para las cuales la expresión de hF. IX había alcanzado una meseta. La Figura G muestra las concentraciones en suero de hF. IX el día 7 después de la inyección de ADNp de hF. IX desnudo o mezclas de ADNp de hF. IX/poli(ácido L-glutámico) en el músculo tibial de ratones C57BL/6 y electroporación del tejido. La cantidad de ADNp de hF. IX administrada por animal fue de 25 pg (0,5 mg/ml) o de 50 microgramos (1,0 mg/ml) en 100 microlitros (la mitad de esta dosis por pata). La concentración del polímero aniónico en la solución inyectada varió como se indica en la gráfica. Los poli(ácidos L-glutámicos) seleccionados diferían por su peso molecular, oscilando entre 0,5-1,5 kDa (con un grado de polimerización (GP) de 9) a 15-50 kDa. Todos los poli(ácidos L-glutámicos) sometidos a ensayo fueron capaces de incrementar la expresión de hF. IX sustancialmente, especialmente a 6,0 mg/ml, solamente con pequeñas diferencias en la potencia entre polímeros. El nivel de hF. IX más alto obtenido después de la inyección en el músculo tibial de ratones C57BL/6 y electroporación del tejido fue de 280 ng/ml, consistiendo un tratamiento en ADN a 0,5 mg/ml y el poli(ácido L-glutámico) de 2-15 kDa a 6,0 mg/ml. En comparación, el tratamiento con ADN desnudo solamente dio como resultado niveles de hF. IX en torno a 160 ng/ml.

Persistencia de la Expresión procedente del ADN Plasmídico

Para determinar si la expresión de hF. IX podía persistir en el plasma durante un tiempo prolongado en ausencia de respuesta inmunitaria, se sometió a ensayo el plásmido formulado con PVP (5%) en ratones SCID

beige inmunodeficientes. La Figura 8 muestra la expresión de hF. IX en plasma de ratones (SCID beige) inmunodeficientes. Se inyectó inicialmente el plásmido (1 mg/ml) formulado con PVP al 5% (25 microlitros en cada músculo tibial y 50 microlitros en cada músculo gastrocnemio) en los ratones. De acuerdo con los patrones de expresión en ratones inmunocompetentes, los niveles de hF. IX alcanzaron un pico 7 días después de la inyección a ~120 ng/ml (Figura 8). Después de una caída del 35% en los niveles de hF. IX más o menos a los 14 días de la inyección, la expresión permaneció bastante estable hasta 90 días después de la inyección pero cayeron hasta ~20% de los valores pico el día 125.

El día 153, se volvió a inyectar el plásmido a los animales y se realizó la electroporación en los mismos músculos que se habían utilizado en el primer tratamiento. Para la segunda inyección el día 153 (indicado por la flecha), los animales se separaron en dos grupos. A un grupo se le inyectó el plásmido formulado con PVP al 5% (n = 7) y al otro grupo se le inyectó el plásmido formulado con 6 mg/ml de poli(L-glutamato) (n = 8). Para las segundas inyecciones se emplearon los mismos sitios de inyección y dosis de plásmido que se habían utilizado para las primeras inyecciones. En ambos grupos de ratones SCID, la re-administración del plásmido condujo a una elevación significativa de los niveles de hF. IX en plasma. El grupo al que se había inyectado el plásmido formulado con poli(L-glutamato) tuvo una expresión significativamente mayor que el grupo al que se había inyectado PVP. Esta diferencia en los niveles de expresión entre los grupos después de la segunda administración se mantuvo a lo largo de toda la duración del experimento. La cinética de la expresión de hF. IX en ambos grupos fue similar a la observada después de la primera administración puesto que hubo una caída significativa desde el pico de expresión (obtenido ~7 días después de la re-inyección) en las dos primeras semanas.

Las gráficas del inserto de la Figura 8 también muestran en efecto de 6 mg/ml de poli(L-glutamato) sobre la expresión de hF. IX y hEPO en comparación con la solución salina. Para estos experimentos, se inyectó en el tibial de los ratones el plásmido que codificaba hF. IX (50 microgramos) o la eritropoyetina humana (75 microgramos) seguido de electroporación. Se recogieron las muestras de plasma o suero 7 días después del tratamiento para su análisis. Todos los valores se representan como ETM. Se utilizó un test de la t de Student para comparar las medias y en la Figura 8, * = P < 0,05. Los plásmidos formulados con poli(L-glutamato) (6 mg/ml) condujeron a un aumento de 1,5 veces a 5,9 veces en la expresión en comparación con el plásmido en solución salina con electroporación y dependía del gen insertado (Figura 8, inserto).

En los ratones SCID, 10 meses después de la inyección inicial con PVP seguida de re-inyección con una formulación de poli(L-glutamato), se recogieron los músculos tibial y gastrocnemio para la inmunotinción de hF. IX y el tipaje de las fibras musculares. La Figura 9 muestra la inmunohistología y el tipo de fibras de los miocitos que expresaban hF. IX en músculos de ratones SCID. Se recogieron secciones representativas de músculo gastrocnemio de ratón SCID procedente de tejido que se había recogido ~300 días después de la inyección inicial. La Figura 9A muestra la inmunolocalización de hF. IX donde los miocitos positivos están teñidos de oscuro (aumento original 100X). La Figura 9B muestra la tinción de ATPasa (pH 4,6) de una sección seriada del panel A. Se distinguen las fibras de tipo I (oscuras) y las fibras de tipo II (claras) (aumento original 100X). Una muestra representativa de fibras complementarias está marcada en ambos paneles indicando que las fibras tanto de tipo I como de tipo II están expresando hF. IX. Tanto los músculos tibiales como gastrocnemios mostraron una amplia distribución de fibras que expresaban hF. IX. En el gastrocnemio, se encontró expresión tanto en las fibras de tipo I como de tipo II en proporciones aproximadamente iguales aunque el número absoluto de fibras de tipo I teñidas fue mucho menor que el de fibras de tipo II (Figura 9). En los tibiales de ratón hubo pocas, si las hubo, fibras de tipo I y de este modo la expresión se observó principalmente en las fibras de tipo II. De este modo, la expresión a largo plazo de hF. IX, alcanzada en ratones inmunocomprometidos (SCID beige), indica que los plásmidos son estables y transcripcionalmente activos en el músculo durante un período de tiempo prolongado.

Aplicabilidad a Animales Grandes

La aplicabilidad del procedimiento de liberación de genes a animales grandes es una etapa requisito previa necesaria para el desarrollo de una terapia génica clínicamente útil en potencia. La Figura 10A representa los resultados de los niveles de hF. IX en plasma en perros después de la inyección intramuscular de plásmido aumentado por electroporación. Se inyectaron 1,6 o 2,8 mg/kg de plásmido en seis perros adultos (beagle 9-13 kg) utilizando un protocolo de múltiples sitios seguido de electroporación con electrodos en serie de 6 agujas. El ADN se formuló con poli(L-glutamato) (6 mg/ml) para estos estudios. Los perros se dividieron en dos grupos. En un grupo se administró intramuscularmente una dosis total de 18 mg dividida en 6 sitios, una en cada bíceps femoral, tibial semimembranoso y craneal de ambas patas posteriores. En el segundo grupo, se administraron intramuscularmente 36 mg de plásmido en 12 sitios, en cada uno de los músculos bíceps femoral, semimembranoso, semitendinoso, vasto lateral, tibial craneal y la cabeza larga del tríceps braquial de los miembros anteriores y posteriores. Se administró un volumen total de 2,0 ml en cada sitio. En cada sitio se inyectaron 2,0 ml de plásmido (1,5 mg/ml) formulado con 6,0 mg/ml de poli(L-glutamato) seguido de electroporación con un electrodo en serie de 6 agujas. Los grupos con 6 y 12 sitios de inyección tuvieron 18 mg y 36 mg de plásmido inyectado por animal, respectivamente. La Figura 10A muestra los resultados en los que el plasma se recogió y se analizó por medio de ELISA. Los valores son las medias ± ETM con n = 3 para cada grupo.

Los valores medios de los grupos con 6 y 12 sitios de inyección presentaron picos a 36,1 ng/ml (día 22) y 27,2 ng/ml (día 14), respectivamente (Figura 10A). Los valores para los dos grupos divergieron el día 22 debido a un incremento inesperado en la expresión media del grupo de animales que habían sido inyectados en 12 sitios. Sin embargo, los niveles de expresión de este grupo el día 22 no son significativamente mayores que el día 14. A pesar de esta anomalía, hacia el día 28 los niveles de expresión de ambos grupos no fueron distinguibles de los niveles de fondo.

Respuesta Inmunitaria a la Proteína Expresada

La Figura 10B muestra una transferencia western de hF. IX purificado utilizando suero de animal tratado como anticuerpo primario. La calle A representa el marcador de peso molecular; la calle B representa el control negativo (esto es, suero de animales no tratados); la calle C representa el control positivo (esto es, suero canino con una cantidad de anticuerpos anti-hF. IX de conejo añadidos); la calle D representa la inmunorreacción a hF. IX por el suero de un perro hembra procedente del grupo de 6 inyecciones (pico de expresión de hF. IX 35,71 ng/ml); la calle E representa la inmunorreacción a hF. IX por el suero procedente de un perro macho procedente del grupo de 12 inyecciones (pico de expresión de hF. IX 47,9 ng/ml). De este modo, el análisis mediante transferencia Western indicó que el plasma de los perros contenía material que presentaba reacción cruzada con el hF. IX purificado que concuerda con una respuesta inmunitaria a la proteína humana (Figura 10B).

Además, el análisis del suero también reveló un incremento transitorio en los niveles de creatinina quinasa (CK) que presentó picos dos días después del tratamiento, y volvió a niveles normales 7 días después del tratamiento indicando que un cierto trauma muscular está asociado con el procedimiento de liberación génica utilizando electrodos en serie de 6 agujas invasivos. Esta respuesta es claramente dependiente de la dosis en los animales a los que se ha administrado una dosis superior (12 sitios de inyección) que tienen niveles pico de CK el día 3 superiores a los de los animales procedentes del grupo con 6 sitios de inyección. Un examen histológico de los diferentes músculos inyectados reveló cierta lesión muscular aproximadamente 1 mes después del tratamiento. En la mayor parte de los casos, no se observaron cambios histológicos o estuvieron restringidos a pequeños puntos concretos, en los cuales hubo indicación de pérdida de miocitos e infiltración de monocitos. En raras ocasiones, el sitio de la inyección se caracterizó por zonas de tejido necrótico y pérdida de monocitos asociada. Este tipo de lesión también se observó en ratones en los primeros momentos después del tratamiento (2 semanas) cuando se utilizaron electrodos calibradores, pero los músculos recuperaron la histología normal con el tiempo (datos no mostrados). No hubo indicación de que un tipo muscular concreto fuera más susceptible de lesión tisular que otro.

La Expresión Depende de la Dosis

Para establecer que la expresión de hF. IX en músculo canino era dependiente de la dosis, se utilizaron el bíceps femoral y el tibial craneal de los miembros posteriores izquierdo y derecho de perros de 11 semanas de edad para el protocolo de liberación génica. El plásmido formulado se inyectó en 4 sitios en cada perro (tibial craneal izquierdo y derecho, bíceps femoral izquierdo y derecho). La concentración de plásmido fue de 3,0 mg/ml. Los volúmenes inyectados (en cada sitio) fueron 0,12 ml, 0,36 ml, 0,60 ml y 1,2 ml para cada grupo. Se recogió el suero 7 días después del tratamiento para su análisis (niveles pico). Para normalizar las variaciones en el peso del animal, se representan los niveles de hF. IX absoluto (determinado estimando el volumen en sangre a 7% del peso de los perros). Los valores son las medias \pm ETM con $n = 3$ para cada grupo. Los valores en las medias \pm ETM por animal con $n = 4$ para cada grupo. Los niveles de hF. IX en plasma aumentaron con las cantidades crecientes de plásmido desde 0,8 mg/kg hasta 2,3 mg/kg. A dosis elevadas de plásmido (5,3 mg/kg) los niveles de expresión media fueron inferiores a los obtenidos a la dosis de 2,3 mg/kg pero la diferencia no fue significativa.

Utilizando el plásmido inyectado en el músculo esquelético seguido inmediatamente de electroporación, los autores de la presente invención lograron niveles terapéuticamente significativos de expresión de hF. IX en el plasma de ratones y perros.

Secuencia de hF. IX Optimizada

Los experimentos anteriores se realizaron con el plásmido pFN0945 (SEQ ID NO: 3 y Figura 17), que tiene la secuencia de ácido nucleico humana natural que codificaba hF. IX. Para las aplicaciones de terapia génica en seres humanos, también se puede utilizar pFN0945, pero se puede preferir una secuencia de codones optimizados para hF. IX cuando se desea una expresión superior debido a la traducción superior de un ARNm de codones optimizados. Un ejemplo de una secuencia de codones optimizados para hF. IX es el plásmido pFN1645, que se describe como SEQ ID NO: 4 y se muestra en la Figura 18.

EJEMPLO IV: Expresión de Genes Terapéuticos

También se acometieron experimentos para determinar la capacidad del poli(L-glutamato) para incrementar la expresión de un gen de eritropoyetina ("EPO") no viral. Utilizando el análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRc), el plásmido formulado en Poli(L-Glutamato) dio como resultado al menos un

incremento logarítmico de los niveles de ADN de mEPO en comparación con los animales que recibieron una formulación de solución salina/ADN.

Expresión de EPO Utilizando Formulaciones Poliméricas

5 Se insertó la secuencia codificante de mEPO en el esqueleto del plásmido Valentis que contenía una UTR
5' de 107 pb, un intrón sintético de 117 pb, la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humana, un
origen de replicación de PUC12 y un gen de resistencia a kanamicina como se ha mencionado antes. El gen de
mEPO estaba dirigido por el intensificador/promotor de CMV. La secuencia completa del plásmido resultante
pEP1403 que contenía el gen de mEPO se describe en la secuencia enumerada como SEQ ID NO: 2 y el mapa
10 plasmídico se muestra en la Figura 19. Los plásmidos se hicieron crecer en *Escherichia coli* DH5 α y se purificaron
utilizando un método patentado que implicaba lisis alcalina y métodos cromatográficos (Abruzzese, R. V., et al.
(1999) *Hum Gene Ther* 10: 1499-1507).

15 Los animales recibieron CMV-mEPO formulado o bien en poli(L-glutamato) de 15-50 kDa o bien en solución
salina. Las formulaciones plasmídicas se inyectaron intramuscularmente en cada pata, 25 microlitros en cada tibial,
50 microlitros en cada gastrocnemio seguido de electroporación 2 min después de la inyección (375 V/cm (113 V/0,3
cm), 2 pulsos, longitud del pulso 25 mseg. A intervalos de tiempo definidos, se recogió la sangre mediante métodos
retro-orbitales y se determinaron los niveles de hematocrito o se analizó el suero para determinar los niveles de
EPO.

20 En los momentos indicados, se extrajo ADN de músculo total y se cuantificaron los niveles mediante PCRc
como sigue: Se determinaron las cantidades de ADN plasmídico en músculos de ratón llevando a cabo una PCR
cuantitativa en tiempo real TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) sobre muestras de ADN aisladas como se
ha descrito previamente (Mahato, R. I. et al. *Hum. Gene Ther.* 9, 2083-2099 (1998)). Los cebadores utilizados en la
PCR fueron un cebador directo, que ceba en la región no traducida 5', y un cebador inverso, que ceba en la región
25 codificante de EPO de ratón. La secuencia de la sonda estaba localizada dentro del gen de EPO. Se utilizó el ADN
del plásmido CMV-mEPO purificado para generar una curva patrón para el análisis de PCR. Como se muestra en la
Figura 11, la formulación en poli(L-glutamato) da como resultado un incremento de varias veces la cantidad de ADN
plasmídico que puede ser detectada en los tejidos después de la electroporación.

30 Para la determinación de la expresión de mEPO, se liberaron 75 mg de pEP1403 (SEQ. ID. NO. 2) en 150
ml en ratones C57BL/6, 25 microlitros por tibial, 50 microlitros por gastrocnemio. El plásmido se formuló en solución
salina o en 6 mg/mL de poli(L-glutamato). Las Figuras 12 y 13 representan la expresión de mEPO y la Figura 12
también representa el nivel de hematocrito en ratones después de la liberación del gen de EPO de ratón por medio
de electroporación utilizando formulaciones en solución salina y poli(L-glutamato).

35 Como se muestra en las Figuras 12 y 13, la liberación en una formulación de poli-glutamato produce niveles
considerablemente superiores de proteína expresada que cuando el ADN plasmídico es liberado en solución salina.
Debido a que se requiere una cantidad muy pequeña de eritropoyetina para dar un incremento máximo en el
hematocrito, los niveles de hematocrito inducidos mostrados en la Figura 12 no difieren entre las formulaciones de
solución salina y poliglutamato. Sin embargo, debido a que el poliglutamato produce una transfección más eficaz, se
espera que se puedan administrar cantidades más pequeñas ADN utilizando formulaciones de poliglutamato.

EJEMPLO V: Expresión de Genes Terapéuticos

Expresión de Interferón Alfa Utilizando Formulaciones Poliméricas

40 Se insertó la secuencia codificante de hINF α 2b en el esqueleto del plásmido Valentis que contenía una
UTR 5' de 107 pb, un intrón sintético de 117 pb, la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humana,
un origen de replicación de PUC12 y un gen de resistencia a kanamicina. El gen de hINF α estaba dirigido por el
intensificador/promotor de CMV. La secuencia completa del plásmido resultante pIF0921 que contenía el gen de
hINF- α se describe en la secuencia enumerada como SEQ ID NO: 1 y el mapa plasmídico se muestra en la Figura
45 20. Los plásmidos se hicieron crecer en *Escherichia coli* DH5 α y se purificaron utilizando un método patentado que
implicaba lisis alcalina y métodos cromatográficos (Abruzzese, R. V., et al. (1999) *Hum Gene Ther* 10: 1499-1507).

50 Para el análisis de la expresión, se inyectaron 25 microlitros de formulaciones de plásmido o bien en poli-
glutamato o bien en solución salina que tenían concentraciones de ADN variables (1,0 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0.01
mg/ml) en cada tibial, se sometieron a electroporación ambas patas con electrodos calibradores a 375 V/cm, 2
pulsos, 25 ms cada pulso. Para el análisis, se recogió el suero por medio de sangrías retro-orbitales (días 4, 7, 14 y
30). Se utilizó un ELISA disponible en el mercado (Endogen) para determinar los niveles de INF- α . Como se muestra
en las Figuras 14A y B, se obtuvo un aumento significativo de la expresión de hINF- α en ratones CD-1 utilizando el
plásmido formulado con 6 mg/ml de poli-L-glutamato a dosis de ADN de 5 y 50 microgramos.

EJEMPLO VI: Protección Frente a Nucleasas del ADN Plasmídico formulado en Poli-L-Glutamato

Se acometieron experimentos para determinar la capacidad del poli-L-glutamato y de Pluronic F68 para proteger el ADN plasmídico de la digestión con nucleasa. Se obtuvo ADNasa I de Gibco/BRL (núm. 18068-015). La sal de sodio del poli(ácido L-glutámico), 2-15 kDa se obtuvo de Sigma. El Pluronic F68 se obtuvo de Spectrum. Se prepararon soluciones de partida de Polímero/ADN 2x (Pluronic F68 = 200 microgramos/ml de ADN plasmídico en F68 al 10%; Poli-L-glutamato = 200 microgramos/ml de ADN plasmídico en 12 mg/ml de poli(L-glutamato de sodio). Se prepararon diluciones de ADNasa de 1:10 a 1:10.000 en 1x tampón de ADNasa. Las mezclas de reacción finales incluyeron 25 microlitros de la formulación, 15 microlitros de agua, 5 microlitros de 10x tampón de ADNasa y 5 microlitros de ADNasa que se añadieron en el orden enumerado. Las mezclas de reacción se incubaron durante 15 minutos a 37°C y se terminó con la adición de EDTA antes de la electroforesis en gel.

Los resultados del análisis de protección frente a la ADNasa se muestran en la Figura 15. El Panel A representa un ADN en formulación de solución salina; el Panel B representa ADN formulado en Pluronic F68 al 5%; el Panel C representa ADN formulado en 6 mg/ml de poli-L-glutamato. La calle A representa el control negativo (esto es, ADN plasmídico sin ADNasa); la calle B representa el control positivo (esto es, ADN plasmídico y ADNasa mezclados 1:1); las calles C-G representan las condiciones experimentales en las que el ADN formulado con solución salina (Panel A), F68 (Panel B), o poli-glutamato (Panel C) se mezcló con ADNasa diluida 1:1 (calle C); 1:10 (calle D); 1:100 (calle E); 1:1.000 (calle F); y 1:10.000 (calle G). En solución salina, la ADNasa a 1:100 es capaz de anular la banda inferior del plásmido superenrollado además de la degradación del ADN resultante de frotis de diferentes pesos moleculares sobre el gel. Por el contrario, tanto el poli-L-glutamato como el Pluronic F68 fueron capaces de conferir protección frente a la degradación con ADNasa a una dilución 1:100.

EJEMPLO VII: Estabilidad Biológica a Largo Plazo del ADN formulado en Poli-L-Glutamato

También se acometieron experimentos para evaluar la estabilidad de formulaciones líquidas de poli-L-Glutamato (15-50 kDa)/ADN.

Animales:

Se obtuvieron 108 ratones CD-1 (29-31 g) de Charles Rivers Labs. Los animales se alojaron en microaislantes (10 ratones por aislante) en el vivario de Laboratory Animal Resource (LAR) y se mantuvieron en un ciclo de día/noche de 12/12 h, temperatura ambiente 23°C (72°F), y una humedad del 40%. Se suministraron alimento (pienso para roedores de Purina) y agua ad libitum. La combinación de la anestesia consistente en una mezcla de Cetamina (74,0 mg/ml), Xilazina (3,7 mg/ml), y Acepromazina (0,73 mg/ml) se administró IP a una dosis de 1,8-2,0 ml/kg.

Grupos de Tratamiento y Rutas de Administración:

Los animales se dividieron al azar en grupos de tratamiento con 6 (tibial) o 5 (gastrocnemio) ratones/grupo. Para los grupos de los tibiales, se inyectaron 25 microlitros de las formulaciones descritas más abajo en cada músculo tibial, esto es, 50 microlitros de volumen total por ratón. Para los grupos de los gastrocnemios, se inyectaron 50 microlitros de las formulaciones descritas más abajo en cada músculo gastrocnemio, esto es, 100 microlitros de volumen total por ratón.

Formulaciones

Se prepararon formulaciones en NaCl 150 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7,5. Se utilizó el plásmido codificante de SEAP pAP1166. 157 a 1 mg/ml. El plásmido y el poli-L-Glutamato (15-50 kDa) se formularon como sigue.

Formulación	ADNp conc. (mg/ml)	sal	Poli-L-Glu	Tampón
A	1,0	150 mM	6,0 mg/ml	Tris 5 mM/pH 7,5
B	0	150 mM	6,0 mg/ml	Tris 5 mM/pH 7,5

Para las formulaciones líquidas, se mezclaron A (0,5 ml) y B (1,5 ml) de las mismas condiciones de almacenamiento (o se rehidrataron con agua y se mezclaron para las muestras liofilizadas) justo antes de su uso para el ensayo in-vivo (en los músculos gastrocnemio y tibial de los ratones CD-1) y el análisis QC. La concentración final de ADN de la mezcla fue de 0,25 mg/ml. Cada pareja A_n/B_n se sometió a ensayo el día 8, 21, 60 y 105. Como control, se sometió a ensayo una muestra de nueva aportación de 0,5 ml de A y 1,5 ml de B en cada momento. Como control de ADN desnudo de nueva aportación, se sometió a ensayo una muestra de 0,5 ml de A (A sin incluir poli-L-Glutamato) y 1,5 ml de B (B sin incluir poli-L-Glutamato) en cada momento.

Las condiciones de liofilización/almacenamiento para las cuales se muestran los resultados en la Figura 16 fueron las siguientes:

Grupo	Condiciones Físicas de almacenamiento	Temperatura
A	Liofilización (almacenamiento N.A. para la muestra sometida a ensayo justo después de completarse el ciclo de liofilización)	+4°C
B	Líquido	-20°C
C	Líquido	+4°C
D	Líquido	+25°C
E	Líquido	+37°C
F	Líquido	+50°C
G	Líquido/almacenamiento con ciclo de congelación/descongelación/congelación el día 2, 4 (y 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52 y 59 si fuera aplicable)	-20°C
H	ADN/pGlu de nueva aportación	
I	ADN desnudo de nueva aportación	

5 La Figura 16 representa los resultados del momento final de 105 días e indica la actividad biológica del ADN en diferentes condiciones de almacenamiento. Como se indica en la Figura 16, el ADN plasmídico a 1 mg/ml formulado en poli-L-glutamato a 6 mg/ml es estable a lo largo de tres meses en solución líquida a la temperatura ambiente. El poli-L-glutamato también protegió al ADN de la degradación durante la congelación-descongelación y la liofilización.

Resultará fácilmente evidente para el experto en la técnica que se pueden realizar diversas sustituciones y modificaciones de la invención descrita en la presente memoria, sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

10

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Valentis, Inc.
<120> FORMULACIONES DE ÁCIDO NUCLEICO PARA SU LIBERACIÓN GÉNICA Y MÉTODOS DE USO
- 5 <130> 216/125
<140> TODAVÍA NO ASIGNADO
<141> ADJUNTO
<150> US 60/187.236 Y US 60/261.751
<151> 2000-03-03 y 2001-01-16
- 10 <160> 4
<170> Microsoft Word
<210> 1
<211> 3589
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
<220> CDS
<222> (768) – (1334)
<223> Plásmido de expresión pIF0921 que codifica el interferón alfa humano (768) – (1334).
<400> 1

1 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggetgaccg cccaacgacc cccgcccatt
61 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca
121 atgggtggag tatttacggt aaactgccc a ttggcagta catcaagtgt atcatatgcc
181 aagtaogccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta
241 catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac
301 catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg
361 atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg
421 ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggog gtaggcgtgt
481 acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg
541 ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccgogggccg
601 ggaacggtgc attggaacgc ggattccccg tgtaattaa caggttaagt tcttctctct
661 gtttctctcc cctgetattc tgetcaacct tcctatcaga aactgcagta tctgtatttt
721 tgctagcagt aataactaac gttctttttt tctcttcaca ggccaccatg gccttgacct
781 ttgctttact ggtggccctc ctggtgctca gctgcaagtc aagctgctct gtgggctgtg
841 atctgectca aaccacacgc ctgggtagca ggaggacctt gatgctcctg gcacagatga
901 ggagaatctc tctttctcc tgcttgaaga acagacatga ctttggattt cccagggagg

961 agtttgca cagttccaa aaggctgaaa ccatccctgt cctccatgag atgatccagc
 1021 agatcttcaa tctcttcagc acaaaggact catctgctgc ttgggatgag accctectag
 1081 acaaattcta cactgaactc taccagcagc tgaatgacct ggaagcctgt gtgatacagg
 1141 ggggtgggggt gacagagact ccctgatga aggaggactc cattctggct gtgaggaaat
 1201 acttccaaag aatcactctc tatctgaaag agaagaaata cagcccttgt gcctgggagg
 1261 ttgtcagagc agaaatcatg agatcttttt ctttgtcaac aaacttgcaa gaaagttaa
 1321 gaagtaagga atgaatctag aaaagccgaa ttctgcagga attgggtggc atccctgtga
 1381 cccctcccca gtgcctctcc tggccctgga agttgccact ccagtgccca ccagccttgt
 1441 cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc tgactagggtg tcctctata atattatggg
 1501 gtggaggggg gtggtatgga gcaaggggca agttgggaag acaacctgta gggctcaggg
 1561 gggggcccgg taccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatttcgagc ttggcgtaat
 1621 catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac
 1681 gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaag agtgagctaa ctcacattaa
 1741 ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat
 1801 gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctctcc gcttctcgc
 1861 tcaactgactc gctgcgctcg gtcggtcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg
 1921 cggtaatac gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag
 1981 gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggtcc
 2041 gccccctga cgagcatcac aaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgacag
 2101 gactataaag ataccaggcg tttccctcg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga
 2161 ccctgcccgt taccggatac ctgtccgct ttctccctc gggaagcgtg gcgctttctc
 2221 atagctcacg ctgtaggtat ctcaagtcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg
 2281 tgcaogaacc ccccgttcag ccgaccgct gcgccttatc cggtaaactat cgtcttgagt
 2341 ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca
 2401 gagcgaggta tgtaggcgtt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca
 2461 ctagaaggac agtatttgggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag
 2521 ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca
 2581 agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc tttctacgg
 2641 ggtctgacgc tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tgcgaatcgg
 2701 gagcggcgat accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttcgcccga agctcttcag
 2761 caatatcacg ggtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgcacacccc agccggccac
 2821 agtcgatgaa tccagaaaag cggccatttt ccaccatgat attcggcaag caggcatcgc
 2881 catgcgtcac gacgagatcc tcgcccgcgg gcatgcgcgc cttgagcctg gcgaacagtt
 2941 cggctggcgc gagcccctga tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca agaccggctt
 3001 ccatccgagt acgtgctcgc tcgatcgat gtttcgcttg gtggtcgaat gggcaggtag
 3061 ccggatcaag cgtatgcagc cgcgcattg catcagccat gatggatact ttctcggcag
 3121 gagcaagggt agatgacagg agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc agccagtc
 3181 tccccgcttc agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc gtggccagcc
 3241 acgatagccg cgctgcctcg tcctgcagtt cattcagggc accggacagg tcggtcttga
 3301 caaaaagaac cgggcgcccc tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca gagcagccga
 3361 ttgtctgttg tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc ggagaacctg

3421 cgtgcaatcc atcttgttca atcatgcgaa acgatacctca tctgtctctc tgatcagatc
 3481 ttgatccctt gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg
 3541 gcttcccaac cttaccagag ggcgaaattcg agcttgcattg cctgcaggt

<210> 2

<211> 3609

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220> CDS

<222> (801) – (1379)

<223> Plásmido de expresión pEP1403 que codifica la eritropoyetina de ratón (801) – (1379)

<400> 2

1 aattcgagct tgcattgctg caggtcggtt cataacttac ggtaaattggc cgcctggct
 61 gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc
 121 caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg
 181 cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaa
 241 ggcccgccctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttccctact tggcagtaca
 301 tctacgtatt agtcatcgtc attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac atcaatgggc
 361 gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga
 421 gtttggtttg gcacccaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat
 481 tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggg gggagggtcta tataagcaga gctcgtttag
 541 tgaaccgtca gatcgccctg agacgccatc cacgctggtt tgacctccat agaagacacc
 601 gggaccgatc cagcctccgc ggccgggaac ggtgcattgg aacgcggatt ccccggtgta
 661 attaacaggt aagtgtcttc ctctggtttc cttcccctgc tattctgctc aaccttcta
 721 tcagaaactg cagtatctgt atttttgcta gcagtaatac taacggttct tttttctct
 781 tcacaggcca ccaagcttcc atgggggtgc ccgaacgccc caccctgctg ctgctgctct
 841 ccctgctgct gattcctctg ggccctccag tcctctgtgc tccccacgc ctcatctgct
 901 acagtccggg gctggagagg tacatcctgg aggccaaagga ggcagaaaat gtcacgatgg
 961 gttgtgcaga aggtcccaga ctgagtgaaa atattacagt cccagatacc aaagtcaact
 1021 tctatgcttg gaaaagaatg gaggtggaag aacaggccat cgaagtgtgg caaggcctgt
 1081 ccctgctcag cgaagccatc ctgcaggccc aggccctgct ggccaattcc tcccagccac
 1141 cagagaccct gcagctgcat atcgacaaag ccatcagtgg tctgcccagc ctcaattccc
 1201 tgctgcccgg gctgggagct cagaaggaac tgatgtcccc tccagatacc accccacctg
 1261 ctccactccg cacactcaca gtggatactt tctgcaagct cttccgggtc tacgccaaat
 1321 tcctccgggg gaaactgaag ctgtacacgg gagaggtctg caggagaggg gacaggtgag
 1381 tctagaaaag ccgaattctg caggaattgg gtggcatccc tgtgacctc cccagtgcc
 1441 tctcctggcc ctggaagttg ccaactccagt gccaccagc cttgtcctaa taaaattaag
 1501 ttgcatcatt ttgtctgact aggtgtcctt ctataatatt atgggggtgga ggggggtggt

1561 atggagcaag gggcaagttg ggaagacaac ctgtagggct cgaggggggg cccggtacca
1621 gcttttgttc ctttagtga gggttaattt cgagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt
1681 ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa
1741 agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac
1801 tgcccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg
1861 cggggagagg cggtttgctg attgggctgt cttccgcttc ctgctcact gactcgtgc
1921 gctcggctgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat
1981 ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca
2041 ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc
2101 atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc
2161 aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg
2221 gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgtt ttctcatagc tcacgctgta
2281 ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg
2341 ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac
2401 acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag
2461 gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat
2521 ttggtatctg cgtctgtctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat
2581 ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc
2641 gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcaga
2701 agaactcgtc aagaaggcga tagaaggcga tgcgctgcga atcgggagcg gcgataccgt
2761 aaagcacgag gaagcggta gccattcgc cgccaagctc ttcagcaata tcacgggtag
2821 ccaacgctat gtctgatag cggtcgcca caccagccg gccacagctg atgaatccag
2881 aaaagcggcc attttccacc atgatattcg gcaagcaggc atcgccatgc gtcacgacga
2941 gatcctcgcg gtcgggcatg cgcgccttga gcctggcgaa cagttcggct ggcgagagcc
3001 cctgatgctc ttcgtccaga tcatcctgat cgacaagacc ggcttccatc cgagtacgtg
3061 ctgctcgat gcgatgtttc gcttgggtgg cgaatgggca ggtagccgga tcaagcgtat
3121 gcagccgccc cattgcatca gccatgatgg atactttctc ggcaggagca aggtgagatg
3181 acaggagatc ctgccccggc acttcgccc atagcagcca gtcccttccc gcttcagtga
3241 caacgtcgag cacagctgcg caaggaacgc ccgctcgtggc cagccacgat agccgcgctg
3301 cctcgtcctg cagttcattc agggcaccgg acaggtcggg cttgacaaaa agaaccgggc
3361 gccctcgcg tgacagccgg aacacggcgg catcagagca gccgattgtc tgttgtgccc
3421 agtcatagcc gaatagcctc tccacccaag cggccggaga acctgctgct aatccatctt
3481 gttcaatcat gcgaaacgat cctcatcctg tctcttgatc agatcttgat cccctgcgcc
3541 atcagatcct tggcggcaag aaagccatcc agtttacttt gcagggcttc ccaacctac
3601 cagagggcg

<210> 3

<211> 4496

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220> CDS

<222> (782) – (2167)

5 <223> Plásmido de expresión pFN0945 que tiene la secuencia natural que codifica el factor de coagulación IX humano

<400> 3

1 ggctcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccacg acccccgccc
 61 attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg
 121 tcaatgggtg gagtatttac ggtaaaactgc ccaacttgga gtacatcaag tgtatcatat
 181 gccaaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaattgg cccgcctggc attatgccca
 241 gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat
 301 taccatcatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc
 361 acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgttt ggcacaaaa
 421 tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca ttgacgcaa tgggaggtag
 481 gcgtgtacgg tgggaggctc atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgctg
 541 gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg
 601 cggccgggaa cgggtgcattg gaacgcggat tccccgtgtt aattaacagg taagtgtctt
 661 cctcctgttt ccttcccctg ctattctgct caaccttctt atcagaaact gcagtatctg
 721 tatttttgct agcagtaata ctaacggttc tttttttctc ttcacaggcc aactggatc
 781 catgcagcgc gtgaacatga tcatggcaga atcaccaggc ctcacacca tctgcctttt
 841 aggatatcta ctcagtctg aatgtacagt ttttcttgat catgaaaacg ccaacaaaat
 901 tctgaatcgg ccaaagggtt ataattcagg taaattggaa gagtttgttc aagggaacct
 961 tgagagagaa tgtatggaag aaaagtgtag ttttgaagaa gcacgagaag tttttgaaaa
 1021 cactgaaaga acaactgaat tttggaagca gtatgttgat ggagatcagt gtgagtccaa
 1081 tccatgttta aatggcggca gttgcaagga tgacattaat tcctatgaat gttggtgtcc
 1141 ctttggattt gaaggaaaga actgtgaatt agatgtaaca tgtaacatta agaatggcag
 1201 atgcgagcag ttttgtaaaa atagtgtctga taacaagggtg gtttgctcct gtactgaggg
 1261 atatcgactt gcagaaaacc agaagtctctg tgaaccagca gtgccatttc catgtggaag
 1321 agtttctggt tcacaaaactt ctaagctcac ccgtgctgag actgtttttc ctgatgtgga
 1381 ctatgtaaat tctactgaag ctgaaacctt tttggataac atcactcaaa gcacccaatc
 1441 atttaatgac ttcactcggg ttgttggtgg agaagatgcc aaaccaggtc aattcccttg
 1501 gcaggttggt ttgaatggta aagttgatgc attctgtgga ggctctatcg ttaatgaaaa
 1561 atggattgta actgctgccc actgtgttga aactggtgtt aaaattacag ttgtcgcagg
 1621 tgaacataat attgaggaga cagaacatac agagcaaaaag cgaaatgtga ttcgaattat
 1681 tcctcaccac aactacaatg cagctattaa taagtacaac catgacattg cccttctgga
 1741 actggacgaa cccttagtgc taaacagcta cgttacacct atttgcattg ctgacaagga
 1801 atacacgaac atcttctca aatttggatc tggctatgta agtggctggg gaagagtctt
 1861 ccacaaaggg agatcagctt tagttcttca gtaccttaga gttccacttg ttgaccgagc
 1921 cacatgtctt cgatctacaa agttcaccat ctataacaac atgttctgtg ctggcttcca
 1981 tgaaggaggt agagattcat gtcaaggaga tagtggggga ccccatgtta ctgaagtgga
 2041 agggaccagt ttcttaactg gaattattag ctggggtgaa gagtgtgcaa tgaaaggcaa

2101 atatggaata tataccaagg tatcccggta tgtcaactgg attaaggaaa aaacaaagct
 2161 cacttaataa tctagagctc gctgatcagc ctcgactgtg ccttctagtt gccagccatc
 2221 tggtggttgc ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct
 2281 ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg
 2341 ggggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcattgctgg
 2401 ggatgcggtg ggctctatgg cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct cgagcatgca
 2461 agcttcgagg gggggcccgg taccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatttcgagc
 2521 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca
 2581 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa
 2641 ctcacattaa ttgctgttgc ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtctgcccag
 2701 ctgcattaaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc
 2761 gcttcctcgc tcaactgact gctgcgctcg gtcttccggc tgcggcgagc ggtatcagct
 2821 cactcaaagg cggtaatcgc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg
 2881 tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcggttgc ggcgtttttc
 2941 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gagggtggcga
 3001 aaccggacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct
 3061 cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc ggggaagcgtg
 3121 gcgctttctc atagctcacg ctgtaggatc ctcaagtcgg tgtaggctgt tcgctccaag
 3181 ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag ccgaccgct gcgccttacc cggtaaactat
 3241 cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac
 3301 aggattagca gagcgaggta tgtaggcgggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac
 3361 tacggctaca ctagaaggac agtatttgggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc
 3421 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt
 3481 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc
 3541 tttctacggg ggtctgacgc tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc
 3601 tgcaaatcgg gagcggcgat accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttgcgcgcca
 3661 agctcttcag caatatcacg ggtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgccacacc
 3721 agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag cggccatttt ccaccatgat attcggcaag
 3781 caggcatcgc catgcgtcac gacgagatcc tcgcccgtcg gcatgcgcgc cttgagcctg
 3841 gcgaacagtt cggctggcgc gagcccctga tgctcttctg ccagatcacc ctgatcgaca
 3901 agaccggctt ccatccgagt acgtgctcgc tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat
 3961 gggcaggtag ccggatcaag cgtatgcagc cggccgattg catcagccat gatggatact
 4021 ttctcggcag gagcaagggt agatgacagg agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc
 4081 agccagtccc ttcccgttc agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc
 4141 gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg tcttgcagtt cattcagggc accggacagg
 4201 tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca
 4261 gagcagccga ttgtctggtg tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc
 4321 ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca atcatgcgaa acgatcctca tctgtctct
 4381 tgatcagatc ttgatccctc gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt
 4441 actttgcagg gcttccaac cttaccagag ggcaattcag agcttgcattg cctgca

<210> 4

<211> 4276

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220> CDS

<222> (786) – (2171)

<223> Plásmido de expresión pFN1645 que tiene la secuencia de codones optimizados que codifica el factor de coagulación IX humano (786) – (2171)

<400> 4

```

1  ggtcggtaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccacag acccccgccc
61  attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg
121 tcaatgggtg gagtatTTac ggtaaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat
181 gccaaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaattg cccgcctggc attatgccca
241 gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat
301 taccatgcat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact
361 cacggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa
421 atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaca actccgcccc attgacgcaa atgggaggta
481 ggcggtgacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgccct
541 ggagacgcca tccacgctgt tttgacctc atagaagaca cggggaccga tccagcctcc
601 gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga tccccgtgt taattaacag gtaagtgtct
661 tcctcctgtt tccttcccct gctattctgc tcaaccttc tatcagaaac tgcagtatct
721 gtatttttgc tagcagtaat actaacggtt ctttttttct cttcacaggc cacactggat
781 ccacatgca gaggggtgaac atgatcatgg cagaatcccc aggctcctc accatctgcc
841 tgctgggata tctgctcagt gctgaatgta cagtgtttct ggatcatgaa aatgccaaaca
901 aaattctgaa tccggccaaag agatataatt ctggcacaact ggaagagttt gtgcaagggga
961 acctggagag agaatgtatg gaagaaaagt gtagttttga agaagcacgg gaagtgtttg
1021 aaaacactga aagaacaact gaattttggga agcagtatgt ggatggagat caatgcgagt
1081 ccaatccatg tctgaatggg ggcagttgca aggatgacat taattcctat gaatgttggg
1141 gtccctttgg atttgaagga aagaactgtg aactggatgt gacatgtaac attaagaatg
1201 gcagatgtga gcagttttgt aaaaatagtg ctgataacaa ggtggtgtgc tcctgtactg
1261 agggatatcg cctggcagaa aaccagaagt cctgtgaacc agcagtgcca tttccatgtg
1321 gaagagtgtc tgtgtcccaa acttctaagc tcaccggggc tgaggctgtg tttcctgatg
1381 tggactatgt caattctact gaagctgaaa ccattctgga taacatcact caaagcacc
1441 aatcctttaa tgacttcact cgggtggtgg gtggagaaga tgccaaacca ggtcaattcc
1501 catggcaagt ggtcctgaat ggcaaagtgg atgcattctg tggaggctct atcgtcaatg
1561 aaaaatggat tgtgactgct gccactgtg tggaaactgg tgtcaaaatt acagtgggtg
1621 caggcgaaca taatattgag gagacagaac atacagagca aaagcggaat gtgattcgca
1681 ttattcctca ccacaactac aatgcagcta ttaataagta caaccatgac attgccctgc

```

1741 *tggaactgga tgaaccctg gtgctgaaca gctatgtgac acctatattgc attgctgaca*
1801 *aggaatacac caacatcttc ctcaaatttg gatctggcta tgcagcggc tggggaagag*
1861 *tcttccacaa aggagatct gctctggccc tgcagtacct gagagtcca ctgggtggacc*
1921 *gggccacatg tctccgctct acaaagtca ccatctataa caacatgttc tgtgctggat*
1981 *tccatgaagg aggtagagat tcctgtcaag gagatagtgg gggaccccat gtcactgaag*
2041 *tggaagggac cagtttcctg actggaatta ttagctgggg tgaagagtgt gcaatgaaag*
2101 *gcaaatatgg aatctatacc aagggtccc gctatgtcaa ctggattaag gaaaaacaa*
2161 *agctcactta atgactctag aaaagccgaa ttctgcagga attgggtggc atccctgtga*
2221 *ccctcccca gtgcctctcc tggccctgga agttgccact ccagtgccca ccagccttgt*
2281 *cctaataaaa ttaagttgca tcattttgtc tgactagggtg tccttctata atattatggg*
2341 *gtggaggggg gtggtatgga gcaaggggca agttgggaag acaacctgta gggctcgagg*
2401 *gggggcccgg taccagcttt tgttcccttt agtgagggtt aatttgcagc ttggctctcc*
2461 *gcttccctgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgctcggc tgcggcagc ggtatcagct*
2521 *cactcaaaag cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg*
2581 *tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgtgct ggcgtttttc*
2641 *cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga*
2701 *aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct*
2761 *cctgttccga ccctgcccct taccggatac ctgtcccctt ttctcccttc ggggaagcgtg*
2821 *gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag*
2881 *ctgggctgtg tgcacgaacc cccgctcag cccgaccgct ggccttctc cggtactat*
2941 *cgctctgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac*
3001 *aggattagca gagcgggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac*
3061 *tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc*
3121 *ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt*
3181 *tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc*
3241 *ttttctacgg ggtctgacgc tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc*
3301 *tggaatcgg gagcggcgat accgtaaagc acgaggaagc ggtcagcca ttcgcccga*
3361 *agctcttcag caatatcacg gtagccaac gctatgtcct gatagcggtc cgccacacc*
3421 *agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag cggccatttt ccaccatgat attcggaag*
3481 *caggcatcgc catgcgtcac gacgagatcc tcgcccgcgg gcagtcgcgc cttgagcctg*
3541 *gcgaacagtt cggctggcgc gagcccctga tgctctctgt ccagatcctc ctgatcgaca*
3601 *agaccggctt ccatccgagt acgtgctcgc tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat*
3661 *ggcaggtag ccgatcaag cgtatgcagc cgccgattg catcagccat gatggatact*
3721 *ttctcggcag gagcaagggt agatgacagg agatcctgcc ccggcacttc gccaatagc*
3781 *agccagtccc ttcccgttc agtgacaacg tcgagcacag ctgcccgaag aacgcccgtc*
3841 *gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg tcctgcagtt cattcagggc accggacagg*
3901 *tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca*
3961 *gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc*
4021 *ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca atcatgcgaa acgatcctca tcctgtctct*
4081 *tgatcagatc ttgatcccc ggcacatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt*
4141 *actttgcagg gcttcccaac cttaccagag ggcgcccag ctggcaattc cggttcgtt*

4201 gctgtccata aaaccgccca gtctagcaac tgttgggaag ggcggggctg caggaattcg
4261 agcttgcatt cctgca

REIVINDICACIONES

1. Una formulación para la liberación de una molécula de ácido nucleico en una célula, que comprende un ácido nucleico y un polímero aniónico, donde el polímero aniónico es poli(ácido glutámico); y donde el ácido nucleico formulado no está encapsulado y no está condensado.
- 5 2. Una formulación para la liberación de una molécula de ácido nucleico en una célula, que comprende un ácido nucleico y un polímero aniónico, donde el polímero aniónico es poli(ácido aspártico) o una de sus sales; y donde el ácido nucleico formulado no está encapsulado y no está condensado.
3. Una formulación para la liberación de una molécula de ácido nucleico en una célula, que comprende un ácido nucleico y un polímero aniónico, donde el polímero aniónico es un polímero que consiste en ácido glutámico y ácido aspártico o sus sales; y donde el ácido nucleico formulado no está encapsulado y no está condensado.
- 10 4. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, donde
- (a) el poli(ácido glutámico) es poli(ácido L-glutámico) y se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 2.000 a 100.000 Daltons; o
- (b) el poli(ácido glutámico) es poli(ácido D-glutámico) y se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 15.000 a 100.000 Daltons.
- 15 5. Una formulación como se reivindica en las reivindicaciones 1 o 2, donde el poli(ácido glutámico) o el poli(ácido aspártico) se caracterizan por un peso molecular en el intervalo de 15.000 a 50.000 Daltons.
6. Una formulación como se reivindica en las reivindicaciones 1 o 2, donde
- (a) el poli(ácido glutámico) es poli(ácido L-glutámico) y se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 2.000 a 15.000 Daltons; o
- 20 (b) el poli(ácido aspártico) se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 2.000 a 15.000 Daltons.
7. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, donde el poli(ácido glutámico) se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 50.000 a 100.000 Daltons.
- 25 8. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 2, donde el poli(ácido aspártico) se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 50.000 a 100.000 Daltons.
9. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, 2 o 3, donde la formulación es isotónica.
10. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, 2 o 3, donde el polímero aniónico aumenta la liberación del ácido nucleico en la célula in vivo.
- 30 11. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 10, donde el polímero aniónico aumenta la liberación del ácido nucleico en una célula de un tejido muscular in vivo.
12. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 10, donde el polímero aniónico aumenta la liberación del ácido nucleico en múltiples líneas celulares in vivo.
- 35 13. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, 2 o 3, donde el polímero aniónico confiere estabilidad al ácido nucleico durante las condiciones de almacenamiento seleccionadas del grupo que consiste en: almacenamiento en líquido, liofilización y congelación.
14. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, 2 o 3, donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en hormonas, hormona del crecimiento humana, factores de crecimiento, citoquinas, y factores antigénicos.
- 40 15. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 14, donde la proteína es el factor IX.
16. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 14, donde el factor de crecimiento es una eritropoyetina.
17. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 14, donde la citoquina es un interferón alfa o un interferón beta.
- 45 18. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, 2 o 3, que comprende adicionalmente un tampón adecuado para la administración interna.

19. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 18, que comprende el ácido nucleico formulado con poli-L-glutamato a una concentración de aproximadamente 6 mg/ml y NaCl aproximadamente 150 mM.
20. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 19, donde el ácido nucleico está presente en la formulación a aproximadamente 1 mg/ml.
- 5 21. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, 2 o 3, que está liofilizada.
22. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, donde el poli(ácido glutámico) es poli(ácido L-glutámico).
23. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 1, 2 o 3, donde la composición se almacena en un estado liofilizado y se reconstituye antes de su administración.
- 10 24. Una formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, para su uso en la introducción de un ácido nucleico en un tejido de un mamífero.
25. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 24, donde el ácido nucleico es introducido por medio de inyección.
- 15 26. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 24, donde el nivel en sangre de una proteína terapéutica se incrementa en un mamífero; el ácido nucleico es un vector no viral que codifica una proteína terapéutica; la formulación se introduce en el tejido del mamífero in vivo; y el tejido se somete a electroporación, donde el polímero aniónico aumenta la transfección del vector no viral junto con la electroporación del tejido.
27. Una formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, donde dicho tejido es el músculo.
- 20 28. Una formulación como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, donde la formulación es liofilizada, almacenada y después re-hidratada antes de introducir el medicamento en un tejido de mamífero.
29. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 24, donde dicho tejido es un tumor.
30. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 24, donde la introducción del ácido nucleico comprende adicionalmente la etapa de someter a electroporación el tejido.
- 25 31. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 31, donde la electroporación se realiza por medio del uso de un dispositivo configurado y fijado para ocasionar la liberación de voltaje de pulsos de dicho ácido nucleico.
32. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 24, donde dicha introducción del ácido nucleico induce una respuesta inmunitaria.
- 30 33. Una composición para la liberación génica in vivo que comprende una formulación de la reivindicación 1, 2 o 3, donde el ácido nucleico codifica un producto génico.
34. Una composición como se reivindica en la reivindicación 33, donde dicho producto génico comprende una proteína terapéutica.
- 35 35. Una composición como se reivindica en la reivindicación 33, donde dicho producto génico comprende un antígeno.
36. Una composición como se reivindica en la reivindicación 33, donde el ácido nucleico codifica una molécula de eritropoyetina.
37. Una composición como se reivindica en la reivindicación 33, donde el ácido nucleico codifica el Factor IX.
- 40 38. Una composición como se reivindica en la reivindicación 33, donde el ácido nucleico codifica una citoquina.
- 45 39. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 24, para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que padece cáncer o una enfermedad infecciosa y la formulación se proporciona a células de dicho mamífero por medio del uso de un dispositivo configurado y fijado para la liberación por voltaje de pulsos de dicho ácido nucleico a las células del mamífero, donde dicho ácido nucleico codifica un antígeno canceroso o un antígeno para dicha enfermedad infecciosa.

- 5 40. Un kit que comprende un contenedor, cuyo contenedor comprende una formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 y o bien (i) un dispositivo de voltaje de pulsos para liberar dicha composición en las células de un organismo, donde dicho dispositivo de voltaje de pulsos es susceptible de ser combinado con dicho contenedor, o bien (ii) instrucciones que expliquen cómo liberar dicha composición con dicho dispositivo de voltaje de pulsos.
- 10 41. Un método para elaborar un kit de la reivindicación 40, que comprende las etapas de combinar un contenedor que comprende una formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 o bien con (i) un dispositivo de voltaje de pulsos para liberar dicha composición en las células del organismo, donde dicho dispositivo de voltaje de pulsos es susceptible de ser combinado con dicho contenedor, o bien (ii) instrucciones que explican cómo liberar dicha composición con dicho dispositivo de voltaje de pulsos.
42. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 39, donde dicho antígeno canceroso es MAGE I, y dicho cáncer es el melanoma.
- 15 43. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 39, donde dicho antígeno de una enfermedad infecciosa es el antígeno núcleo del HBV, y dicha enfermedad infecciosa es la hepatitis crónica.
- 15 44. Una composición farmacéutica para incrementar el nivel de una proteína terapéutica en sangre que comprende la formulación de la reivindicación 1, 2 o 3, donde el ácido nucleico es un vector no viral que codifica la proteína terapéutica.
45. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 44, donde el polímero aniónico aumenta la transfección junto con la electroporación in vivo.
- 20 46. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 44, donde el poli(ácido glutámico) es un poli-L-glutamato.
47. Una composición farmacéutica como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 44 a 46, donde la proteína terapéutica es un factor de crecimiento o una citoquina.
- 25 48. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 47, donde la proteína terapéutica se selecciona del grupo que consiste en: Factor IX; EPO; e IFN-alfa.
49. Una composición farmacéutica estabilizada como se reivindica en la reivindicación 44, donde el polímero aniónico protege el vector de la degradación biológica inducida por liofilización o congelación.
50. Una composición farmacéutica estabilizada de la reivindicación 49, donde el polímero aniónico es un poli-glutamato.
- 30 51. Una composición farmacéutica para ser administrada a un organismo, que comprende una formulación de la reivindicación 1, 2 o 3, donde el ácido nucleico es un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica hFIX.
- 35 52. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 51, donde el vector comprende adicionalmente una UTR 5' de 107 pb, un intrón sintético de 117 pb, un origen de replicación de PUC12, y un gen de resistencia a kanamicina.
53. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 51, donde el polímero aniónico es poli(ácido glutámico).
54. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 53, donde
- 40 (a) el poli(ácido glutámico) es poli(ácido L-glutámico) y se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 2.000 a 100.000 Daltons; o
- (b) el poli(ácido glutámico) es poli(ácido D-glutámico) y se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 15.000 a 100.000 Daltons.
55. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 53, donde el poli(ácido glutámico) se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 15.000 a 50.000 Daltons.
- 45 56. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 53, donde el poli(ácido glutámico) es poli(ácido L-glutámico) y se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 2.000 a 15.000 Daltons.
57. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 53, donde el poli(ácido glutámico) se caracteriza por un peso molecular en el intervalo de 50.000 a 100.000 Daltons.

58. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 51, donde la formulación es isotónica.

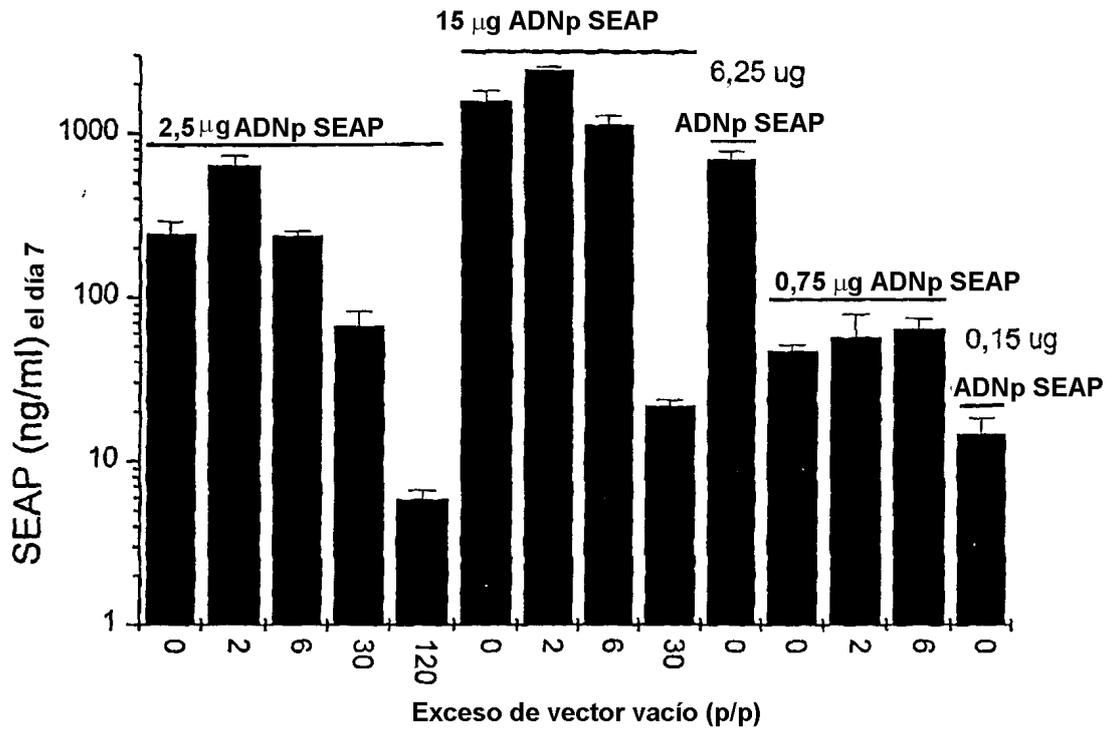


Fig. 1

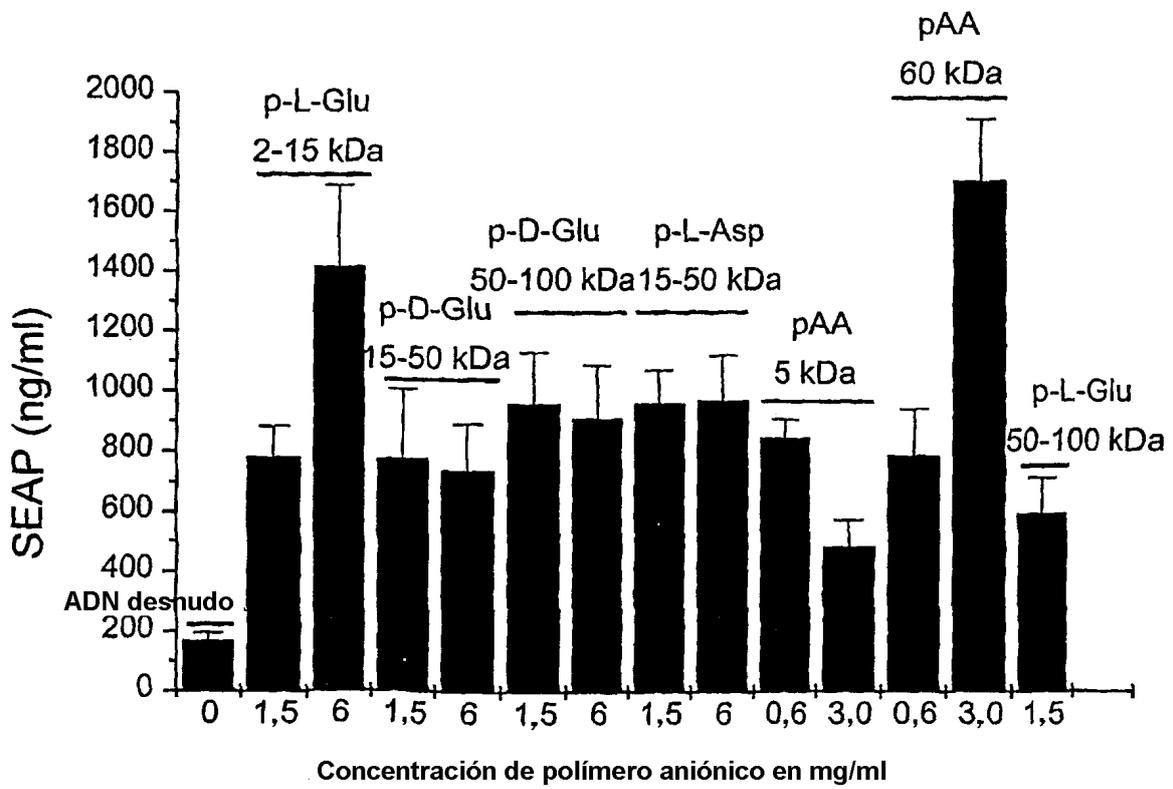
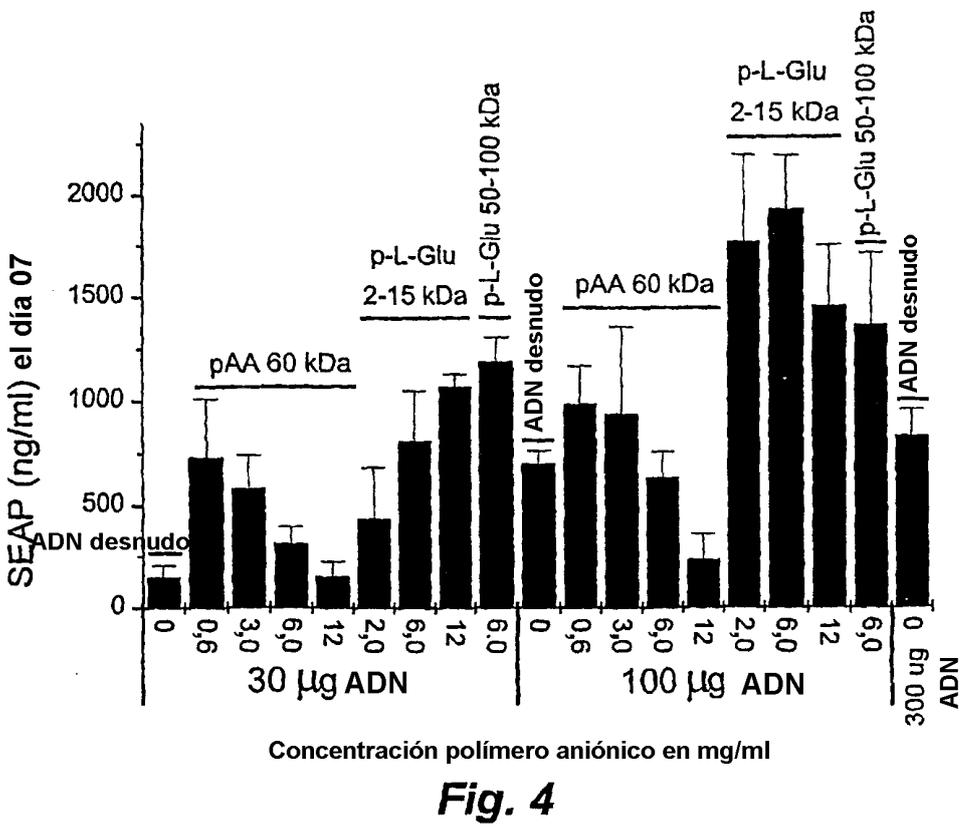
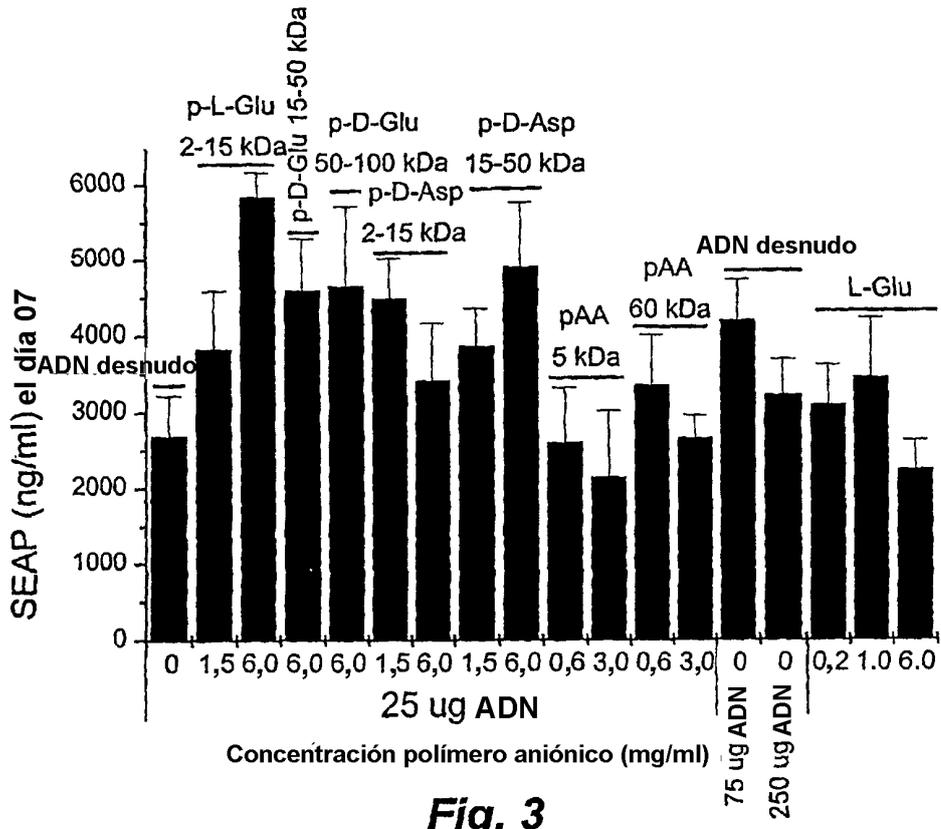


Fig. 2



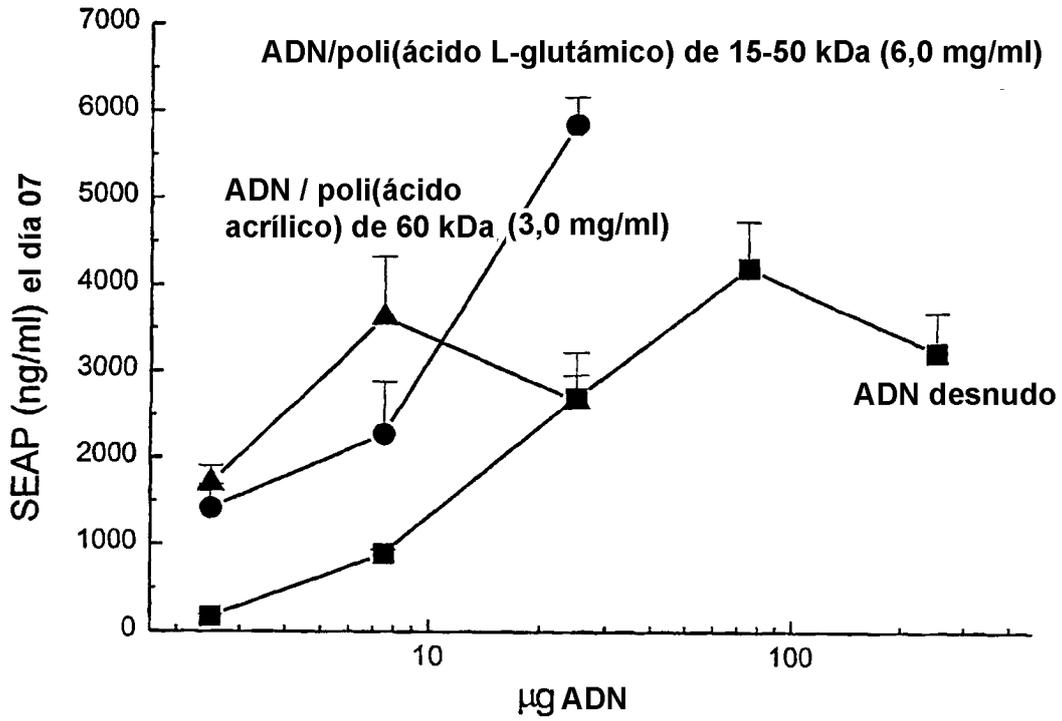


Fig. 5A

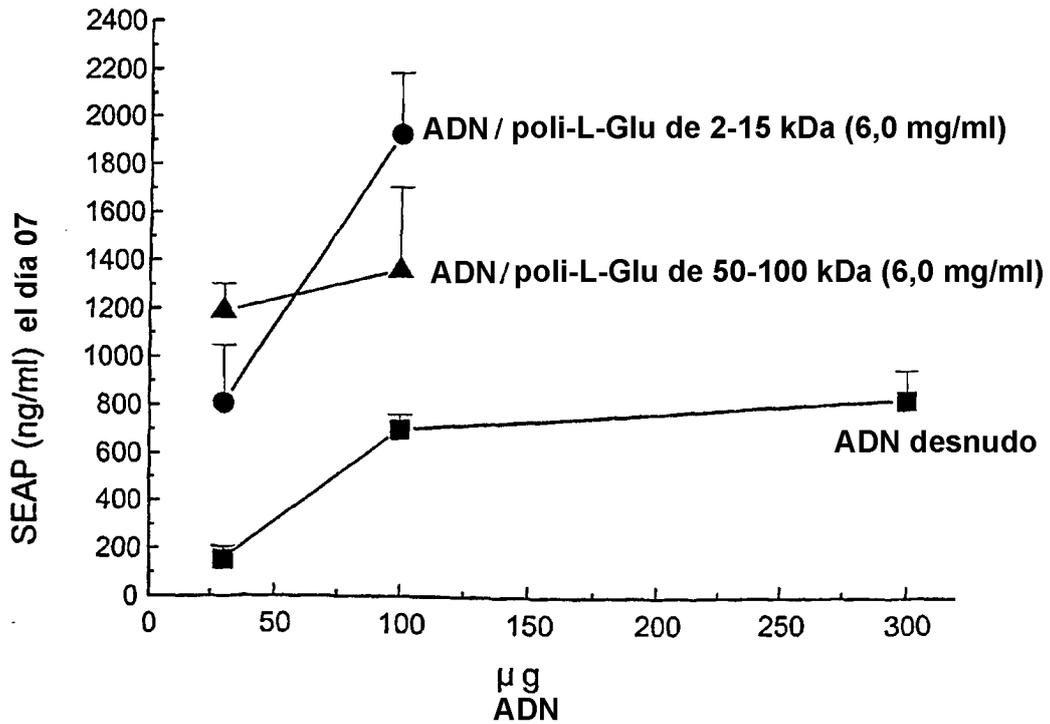


Fig. 5B

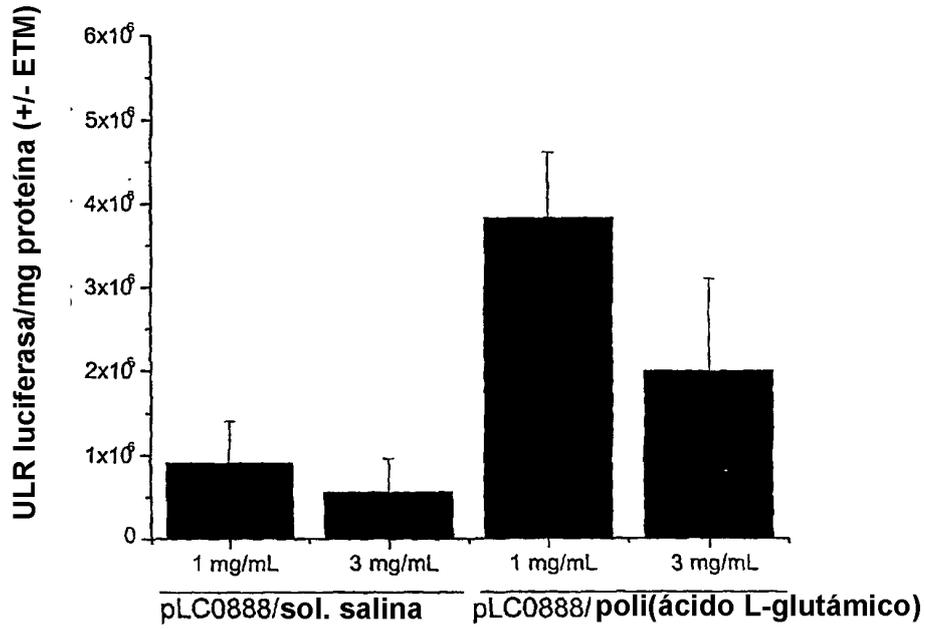


Fig. 6

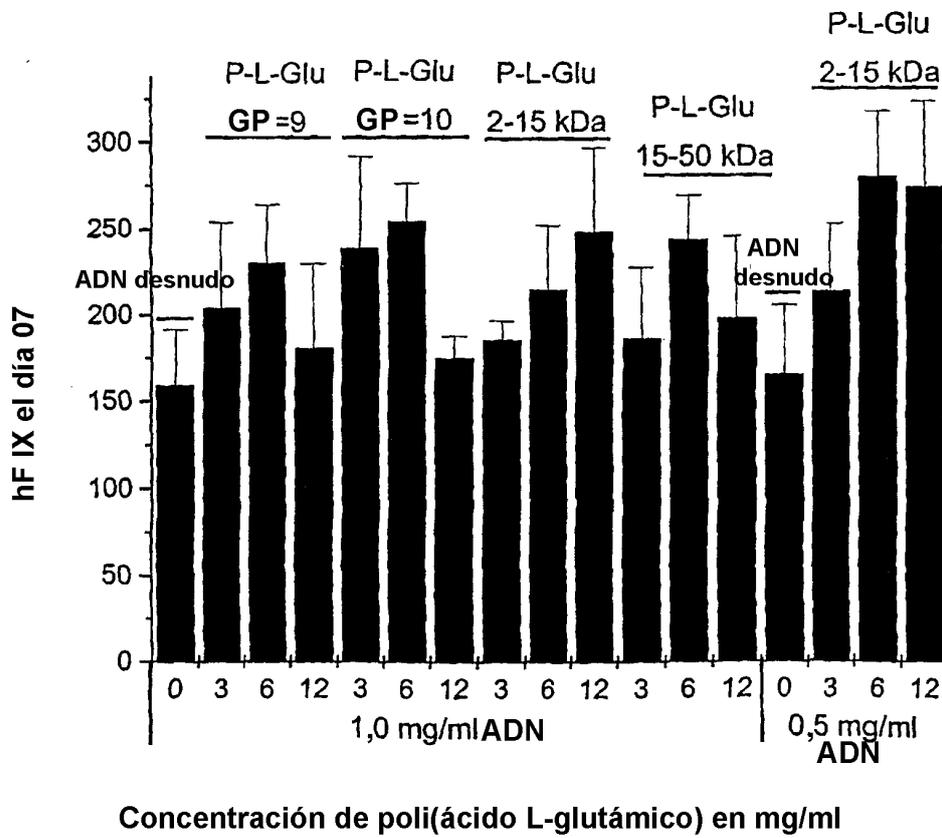


Fig. 7

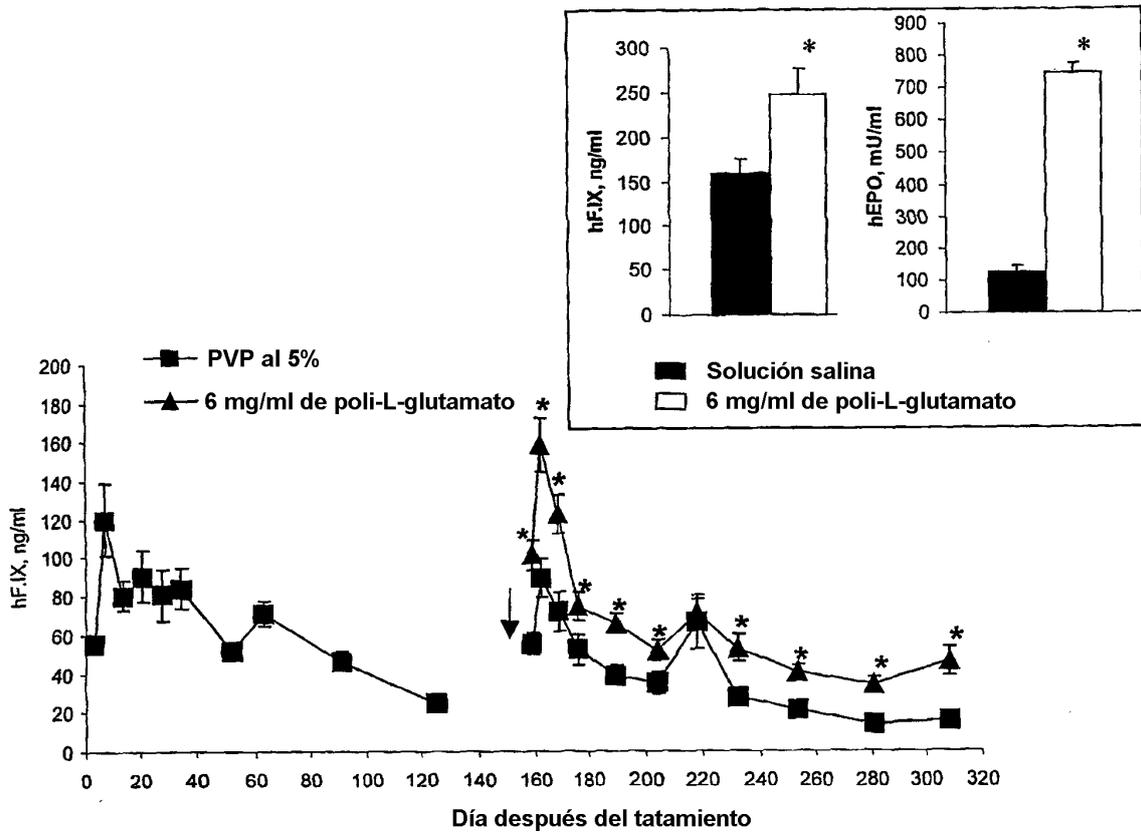


Fig. 8

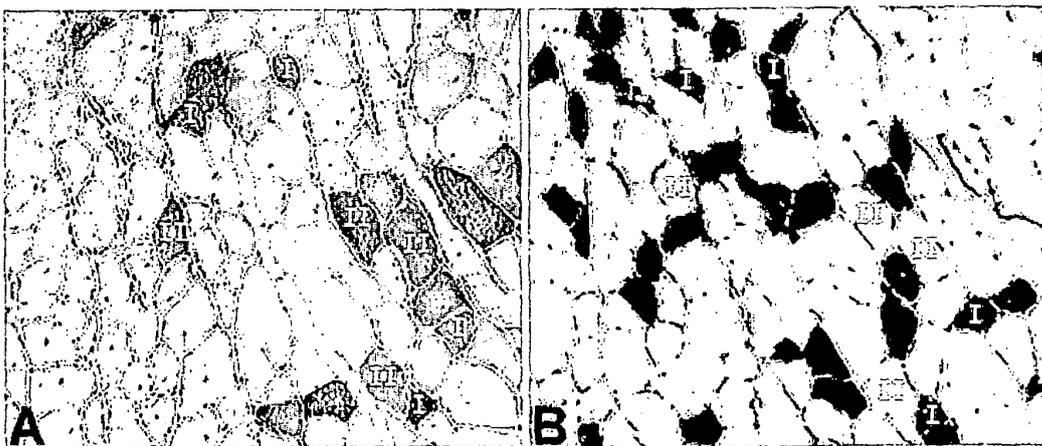


Fig. 9

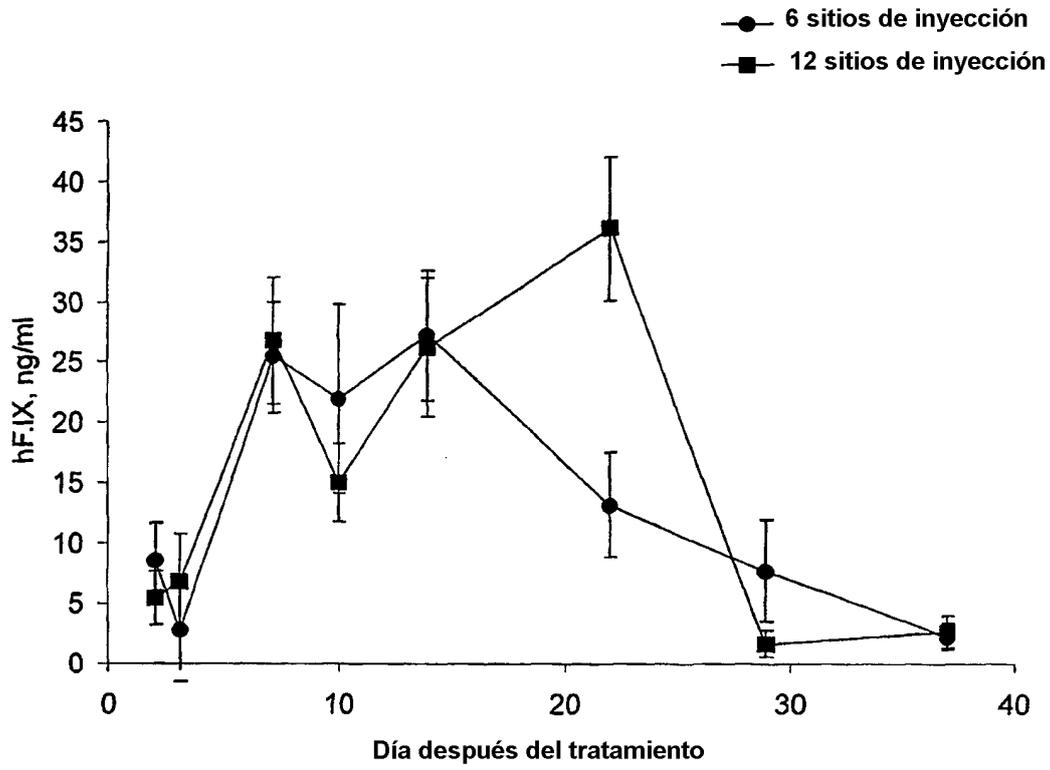


Fig. 10A

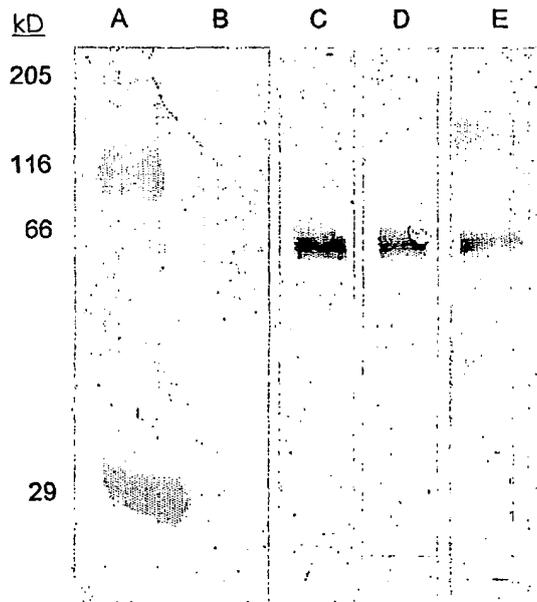


Fig. 10B

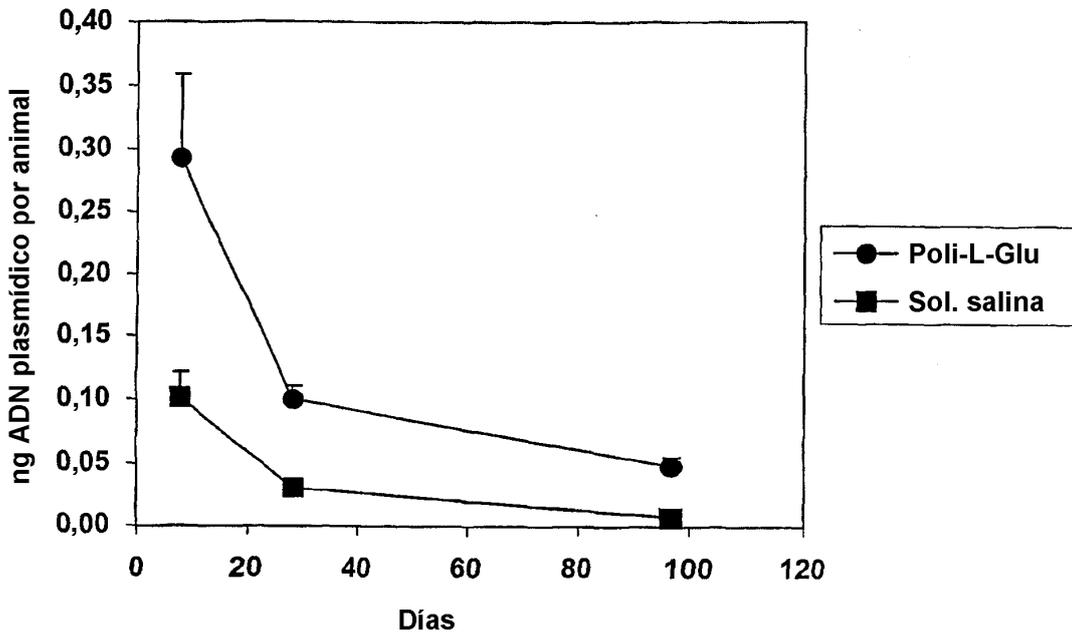


Fig. 11

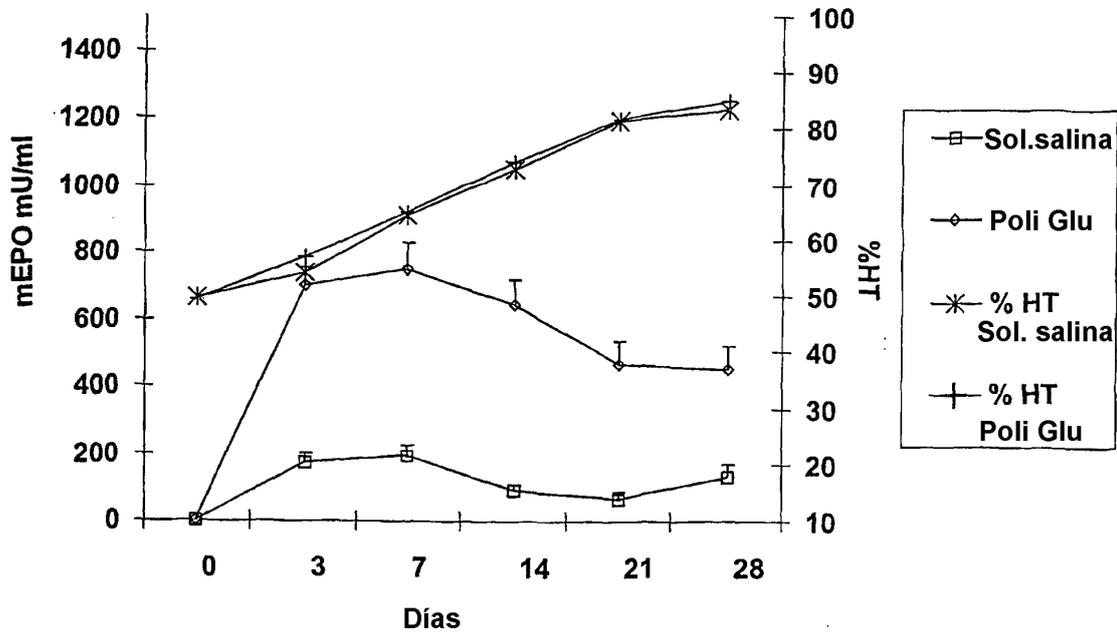


Fig. 12

8/13

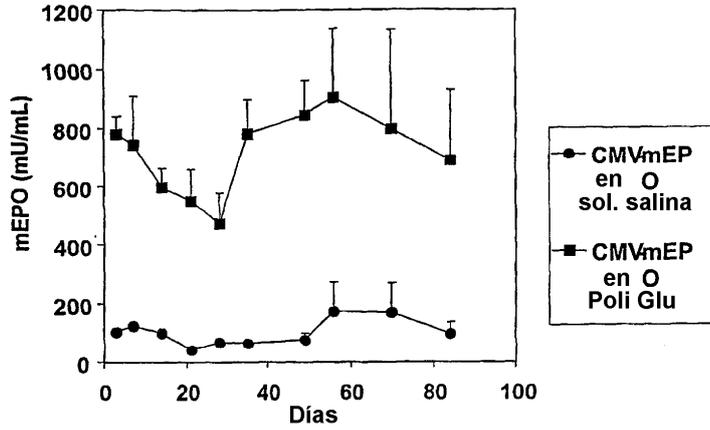


Fig. 13

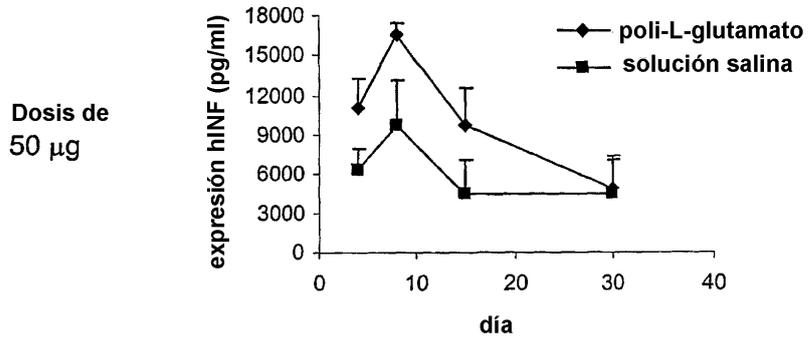


Fig. 14A

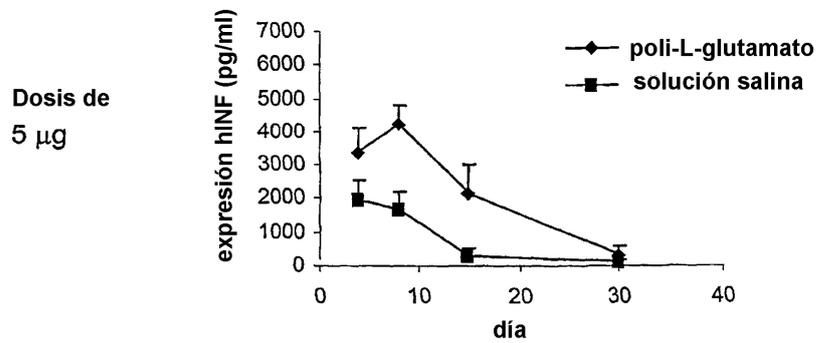
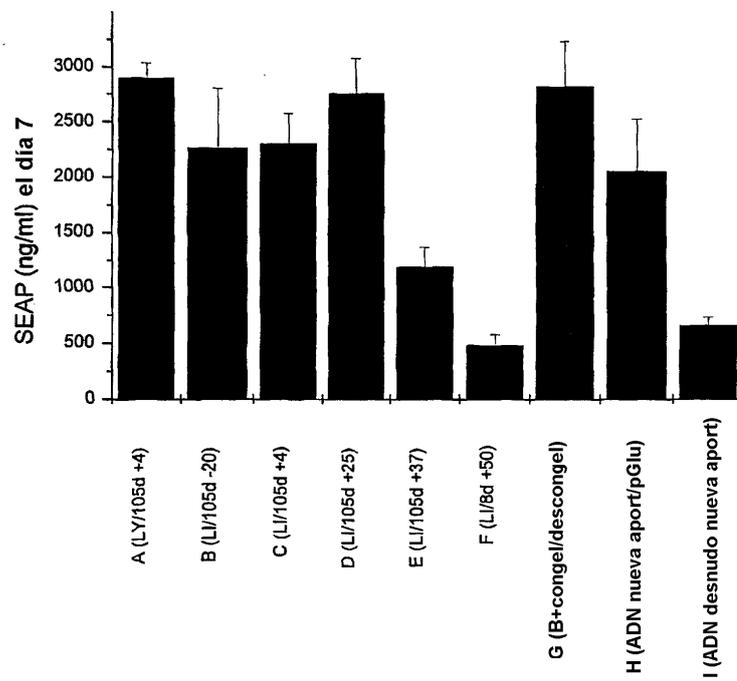


Fig. 14B



Fig. 15



Grupo de Tratamiento

Fig. 16

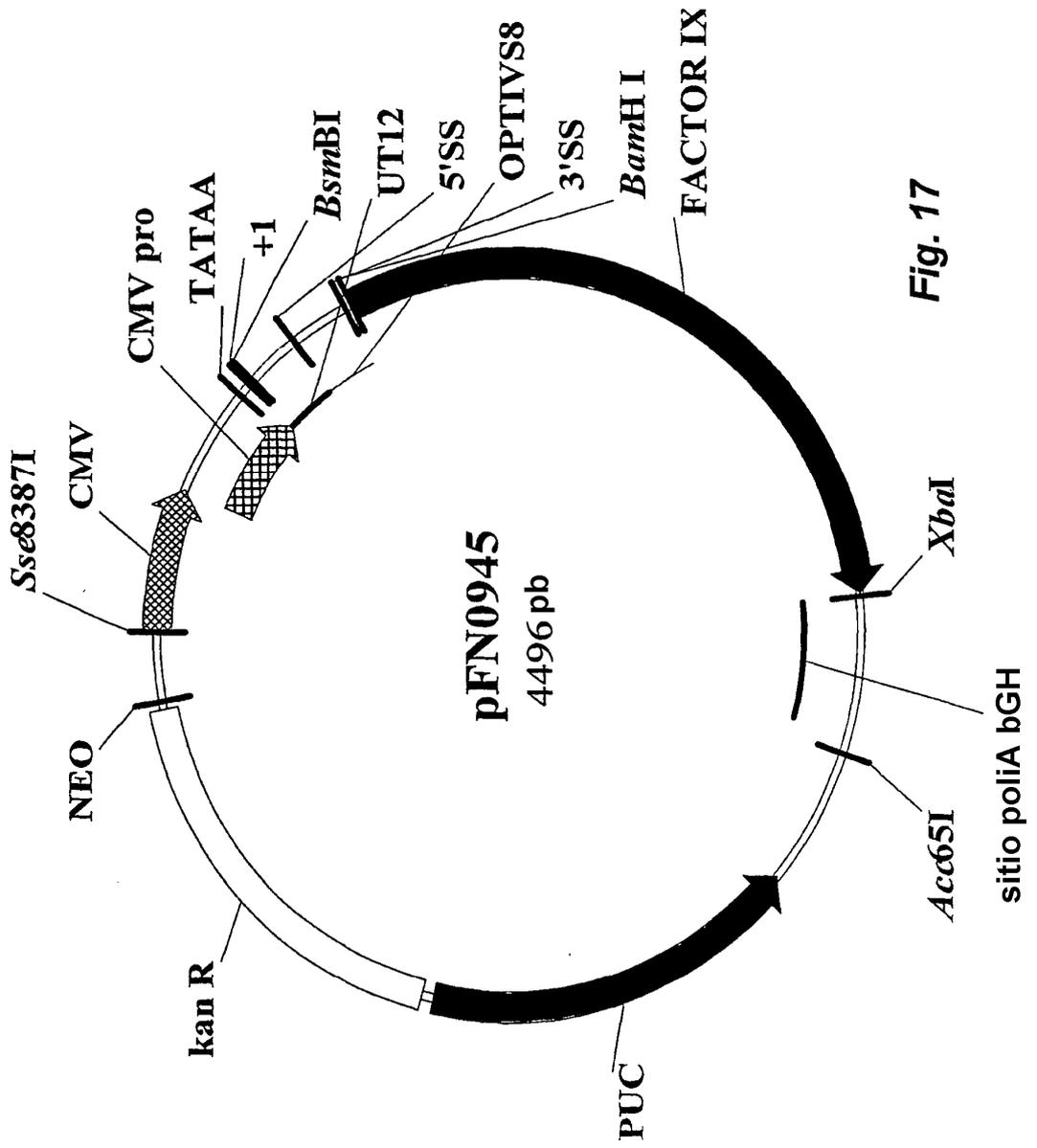


Fig. 17

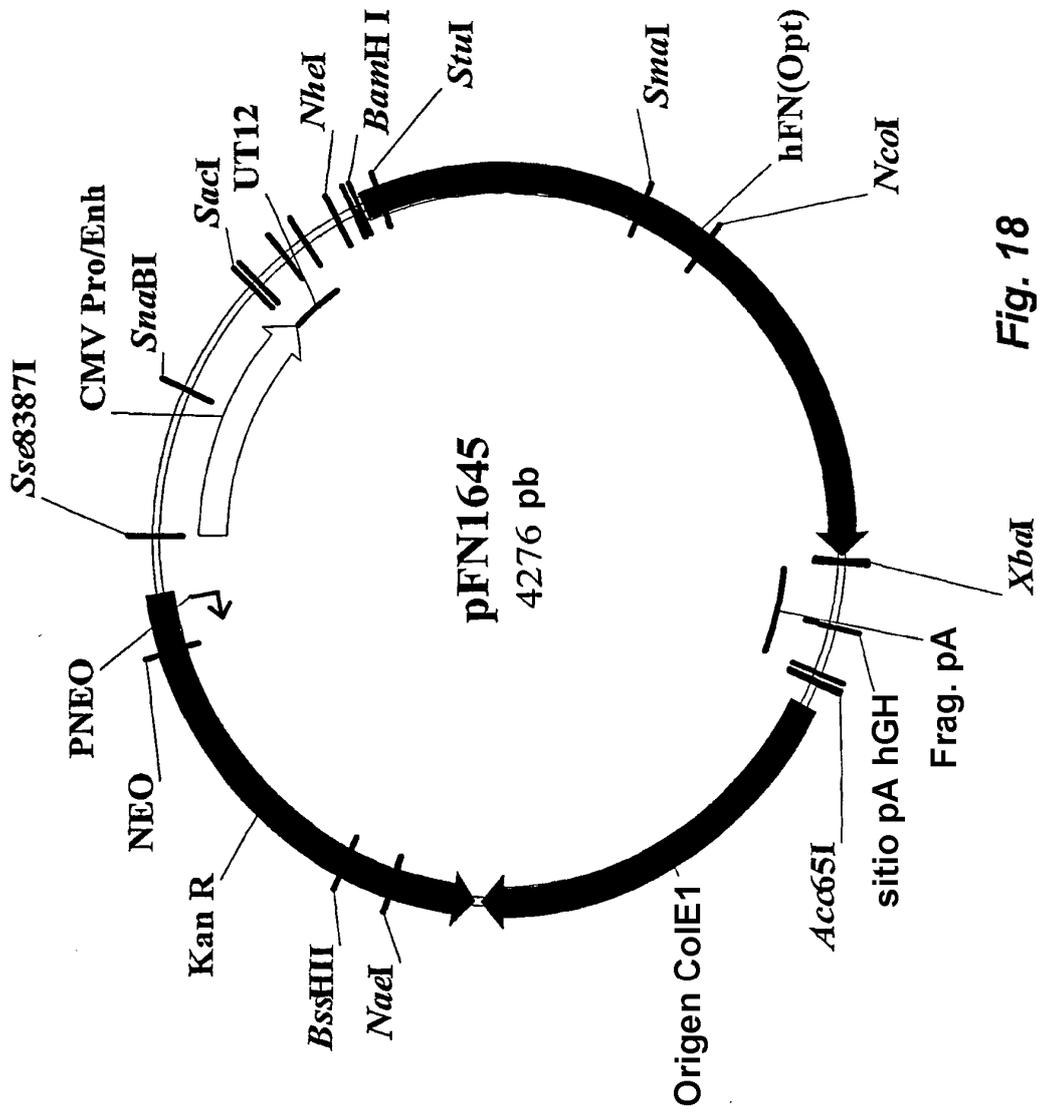


Fig. 18

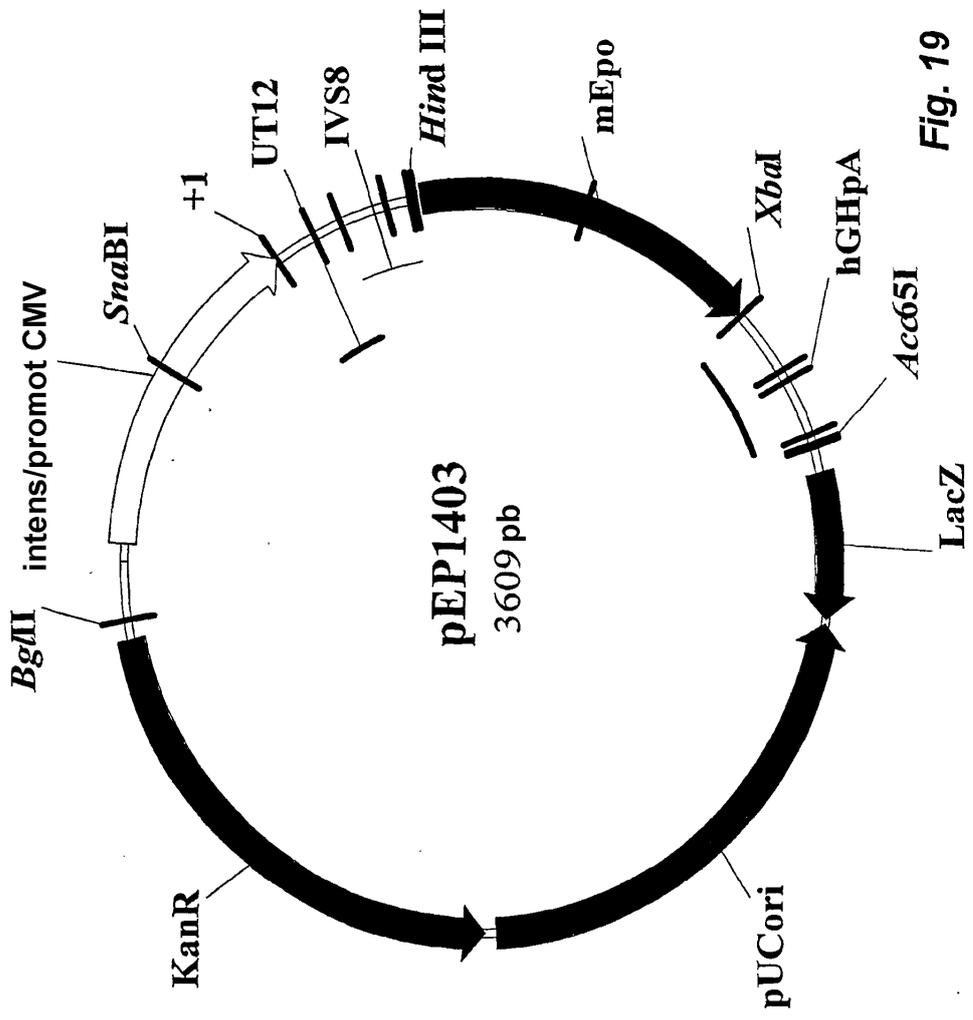


Fig. 19

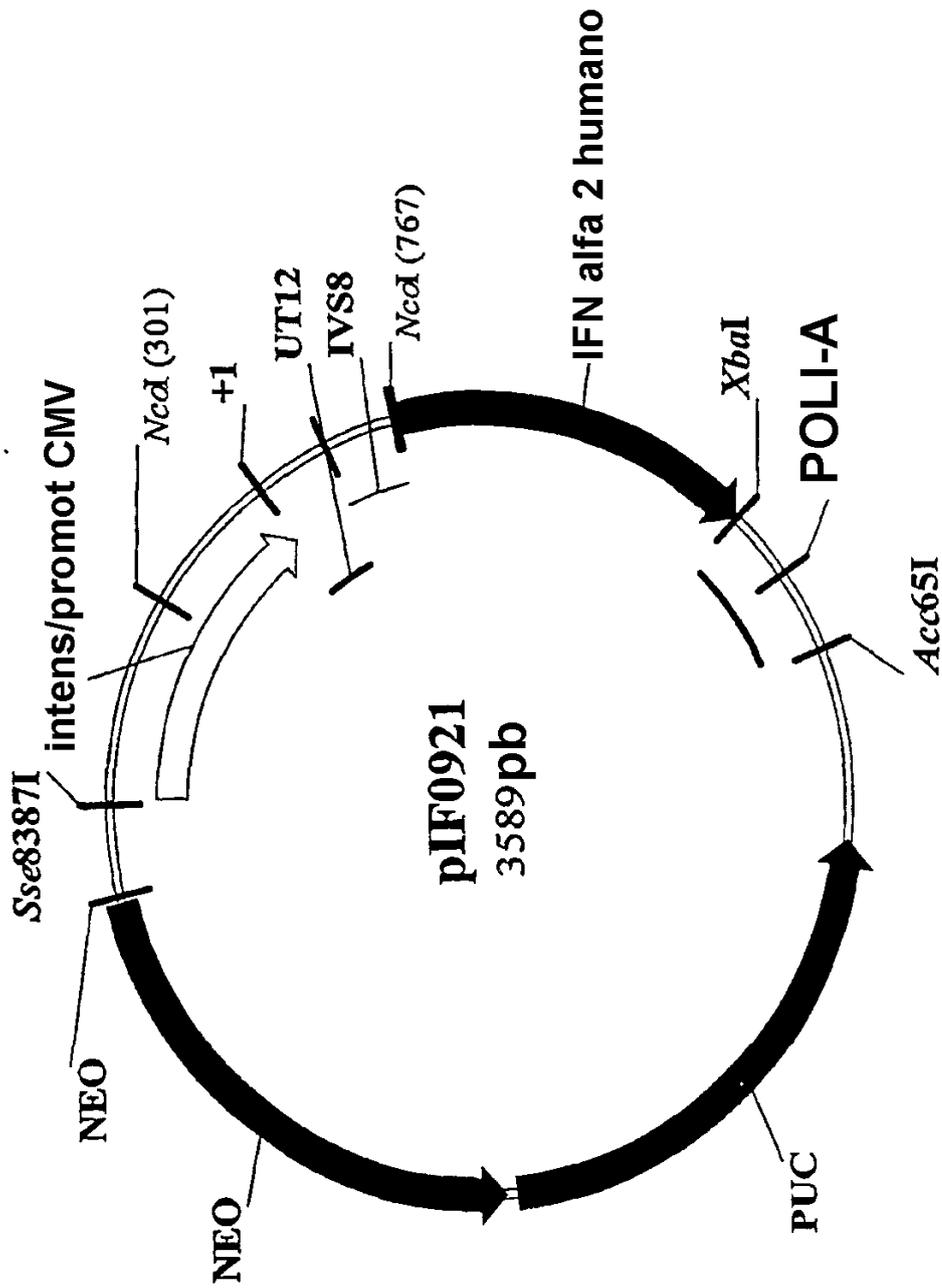


Fig. 20