(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 434 169**

(51) Int. CI.:

A01N 43/04 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2007 E 07873598 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2094086**

(54) Título: **Entrega in vivo de ARN bicatenario a una célula objetivo**

(30) Prioridad:

08.11.2006 US 857501 P
16.03.2007 US 907014 P
17.08.2007 US 956610 P
24.09.2007 US 974695 P
10.10.2007 US 978950 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2013

(73) Titular/es:

VERITAS BIO, LLC (100.0%)
2070 Butler Pike, Suite 500
Plymouth Meeting, PA 19462, US

(72) Inventor/es:

PACHUK, CATHERINE J.

(74) Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

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

Entrega in vivo de ARN bicatenario a una célula objetivo.

Campo de la invención

La invención se relaciona con métodos para la inhibición de polinucleótidos objetivo mediada por ARN en células de mamífero. Estos incluyen ARNip, ARNhc, miARN, ácidos nucleicos antisentidos, y ribozimas que se expresan endógenamente, así como moléculas de ARNip, ARNhc, miARN, ácidos nucleicos antisentidos y ribozima sintéticos que se expresan endógenamente. Los métodos se aplican además para proporcionar ARN funcional que incluye ARNm para indicaciones en terapia génica . Más particularmente, se relaciona con métodos para inhibir la función de un polinucleótido objetivo en una célula de mamífero objetivo *in vivo* que comprende introducir en la primera célula tal como, una célula de la piel, células de tejido muscular, que incluyen células del músculo esquelético o estriado (miocito o mioblasto), o cualquier otra célula competente ARN bicatenario (ARNbc) del mamífero o constructo de expresión del polinucleótido que codifica uno o más agente(s) ARNbc o iARN que incluyen ARNip, ARNhc, miARN u otros ARNbc, de manera que el agente iARN se entrega distalmente a la célula objetivo.

Antecedentes de la invención

La capacidad del ARN bicatenario para silenciar eficazmente la expresión génica, un fenómeno que se conoce ahora comúnmente como interferencia por ARN (iARN), ha sido uno de los mayores hallazgos científicos de la pasada década. Recientemente, los científicos Andrew Fire y Craig Mello fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina 2006 por su trabajo pionero en el campo de iARN. Sin embargo, quedan aún muchos retos para mover el iARN del laboratorio a la clínica. El mayor reto de la inhibición de la expresión génica objetivo mediada por iARN en animales y particularmente en humanos es la entrega eficiente del agente iARN a un número suficiente de células objetivo. Una variedad de mecanismos de entrega se están explorando actualmente en el campo del iARN.

Por ejemplo, una serie de grupos demostraron éxito y entrega eficiente de ARN bicatenario (bc) al hígado de ratón por inyección en la vena de la cola. McCaffrey y otros (Nature Biotechnol. (2003) 21(6): 639-44) reportaron inhibir la producción de intermedios replicativos del virus de la hepatitis B en ratones después de la inyección en la vena de la cola de plásmidos que expresan ARN de horquilla pequeña específicos del HBV (ARNhc). Giladi y otros (Mol. Therapy (2003) 8(5): 769-76) además reportan la inhibición de la replicación de HBV en ratones después de la inyección en la vena de la cola del ARN interferente pequeño específico del HBV (ARNip), y Song y otros (Nature Med. (2003) 9(3): 347-51) reportan la interferencia por ARN de hepatitis fulminante en ratones después de la inyección en la vena de la cola de ARNip específico para el gen fas.

Aunque la inyección en la vena de la cola es adecuada para inhibir en los ratones la expresión génica, no es una técnica clínicamente relevante que se puede usar en los humanos. Sin embargo, diversos grupos han demostrado también la entrega exitosa de agentes terapéuticos del ARNbc sin la inyección en la vena de la cola usando los ARNbc sintéticos con estabilidad mejorada por administración sistémica. Ver Soutschek y otros Nature (2004) 432(7014): 173-8; ver además Morrissey y otros Hepatol. (2005) 41(6): 1349-56. La administración local en el hígado se demostró además inyectando el ARN bicatenario directamente en el sistema circulatorio que rodea el hígado usando la cateterización de la vena renal. Ver Hamar y otros PNAS (2004) 101(41): 14883-8. También otros reportaron una entrega exitosa de ARNbc y particularmente ARNip usando complejos catiónicos o formulaciones liposomales. Ver, *por ejemplo*, Landen y otros Cancer Biol. Ther. (2006) 5(12); ver además Khoury y otros Arthritis Rheumatol. (2006) 54(6): 1867-77.

Además de la inyección en el sistema circulatorio y medios a base de lípidos para la entrega de ARN bicatenario, diversos grupos han reportado el uso de vectores retrovirales y adenovirales para la introducción de ARNbc en mamíferos. Por ejemplo, Van den Haute y otros (Human Gene Therapy (2003) 14: 1799-1807) reportaron la entrega del vector lentiviral de horquilla pequeña (ARNhc) contra la GFP reportera mejorada (EGFP) que mostraron reducir la expresión génica de la EGFP en el cerebro de ratón hasta seis meses después de la transducción. McCaffrey y otros (Resumen núm. 039, Keystone Symposia on siRNAs and miRNAs, Abril 14-19, 2004) reportaron la infusión intravenosa de adenovirus recombinantes que expresan ARNhc específicos del HBV en ratones infectados con HBV como una posible aproximación contra la infección por el virus de la hepatitis en animales.

De este modo, aunque algunos éxitos se han demostrado usando la entrega localizada, o mediante el uso de la administración sistémica del ARNbc estabilizado o complejo, existe todavía una gran necesidad de mecanismos de entrega de iARN *in vivo* que no requieren de formulaciones especializadas o procedimientos de entrega invasivos. Además, los presentes inventores demostraron que la entrega de ARNbc endógeno a base de ADN es especialmente ventajosa en que permite evitar la respuesta de interferón/PKR al proporcionar un suministro prolongado de ARNbc expresados, ver US 2004/0152117. En consecuencia, existe una necesidad en particular de mecanismos de entrega específicos de vectores de expresión de iARN a base de ADN que no requieren el uso de virus.

La interferencia por ARN se descubrió primero en el nemátodo *C. elegans*por los premios Nobel laureados Andrew Fire

y Craig Mello y sus colegas, ver patente de los Estados Unidos 6,506,559. En la patente US '559, Fire y Mello *y otros* reportan la inhibición mediada por ARNbc mostró una sorprendente capacidad para cruzar los límites celulares. Esta observación ya se describió como un fenómeno que es particular de los nemátodos o invertebrados, y generalmente los modos correspondientes de dicho tráfico de iARN en organismos vertebrados se han diseminado.

Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente, sin embargo, que la entrega de constructos de expresión que codifican ARN bicatenarios por vía intramuscular, subcutánea e intradérmica resulta en la inhibición específica de la expresión génica *in vivo* en el hígado y potencialmente otros órganos y tejidos de los organismos de mamíferos. Sin deseos de estar limitado por ninguna teoría, los inventores postulan que la entrega de ARNbc al hígado del músculo o la piel, por ejemplo, puede estar mediado por vesículas extracelulares (exovesículas) que contienen las moléculas de ARN expresadas tales como ARNbc, antisentido, miARN, o ARNm o moléculas de ARN inyectadas/introducidas tales como ARNip, ARNhc, etc. que brotan de la superficie de las células del músculo transfectadas. La extrusión de dichas exovesículas se ha mostrado por diversos tipos de células incluyendo el músculo.

Existe evidencia en la técnica de que ciertas lectinas se exportan de las células del músculo y mioblastos a través de evaginaciones de la membrana celular que se estrangulan para formar vesículas extracelulares llamadas exovesículas. Dichas lectinas que incluyen, las beta galectinas se conocen por estar en la superficie de las exovesículas extrudidas. Ver Cooper y Barondes, Evidence of export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. J. Cell Sci. (1990) 110: 1681-91; ver además Harrison y Wilson, The 14 kDa beta-galactoside binding lectin in myoblast and myotube cultures: localization by confocal microscopy, J. Cell Sci. (1992) 101(Pt. 3): 635-46. Las vesículas extracelulares se han observado además en la periferia de los fibroblastos, que están presentes en grandes cantidades en la capa dérmica de la piel. Ver Mehul y Hughes, 1997, Plasma membrane targeting, vesicular budding, and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion, J. Cell Sci. 110: 1169-78. Existe además evidencia que las lectinas y ciertas glicoproteínas pueden aclararse a partir de la circulación por receptores específicos en la superficie de las células del hígado. Ver, *por ejemplo*, Park y otros, The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha 2,6GalNAc. PNAS (2005) 102(47): 17125-9; ver además Nagaoka y otros. Los receptores de galectina se conocen para expresarse en la superficie de los hepatocitos. Además, los receptores de betagalectina han demostrado que se expresan de una manera polarizada en el lateral sinusoidal de los hepatocitos, "A quantitative analysis of lectin binding to adult rat hepatocytes cell surfaces", In Vitro Cellular and Developmental Biology (1988) 24: 401-412; "Participation of a galectin-dependent mechanism in the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein." Thromb Res (2003) 108: 257-262. Prud'homme y otros describen la electroporación del ARN en las células del músculo en "Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases." Current Gene Therapy, vol. 6 núm. 2: 243-273.

Así, los presentes inventores proponen que el contenido citosólico incluyendo los ARN, por ejemplo, ARNm, ARNip/ARNhc/miARN expresado, así como ARNip/ARNhc/miARN inyectado/introducido, o incluso ADN transfectado presente posiblemente en el citosol se puede empaquetar dentro de estas exovesículas y se pueden transportar a sitios distales tal como el hígado. Otros mecanismos de transferencia no se excluyeron. Sea cual sea el mecanismo, al conocimiento de los presentes inventores, nadie ha reconocido o propuesto la administración intramuscular, intradérmica o subcutánea de ARNbc y ARNbc particularmente expresado in vivo en organismos mamíferos como un mecanismo terapéutico de entrega de ácido nucleico para las enfermedades hepáticas así como enfermedades que afectan otros órganos y tejidos distales.

Resumen de la invención

En consecuencia, la invención proporciona un ácido nucleico o vector de expresión para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que involucra el hígado o para el tratamiento o prevención de una afección que involucra el hígado mediante la entrega de un ácido nucleico o vector de expresión a una célula del hígado en un animal en donde la entrega comprende transfectar al menos una célula de la piel o del músculo en dicho animal con el ácido nucleico o vector de expresión, en donde dicha transfección resulta en que dicho ácido nucleico o vector de expresión se entrega a al menos una célula en el hígado. La invención proporciona además el uso de un ácido nucleico o vector de expresión en la fabricación de un medicamento para entregar un ácido nucleico o vector de expresión a una célula del hígado en un animal en donde la entrega comprende transfectar al menos una célula de la piel o del músculo en dicho animal con el ácido nucleico o vector de expresión, en donde dicha transfección resulta en que dicho ácido nucleico o vector de expresión se entrega a al menos una célula en el hígado.

Las referencias a los métodos de la invención abarcan su uso en los métodos. Correspondientemente, las referencias a los métodos de la invención son referencias a los usos en los métodos descritos.

La presente invención abarca métodos para entregar ácidos nucleicos, que incluyen moléculas de ARN bicatenario y/o constructos de expresión de polinucleótidos que codifican moléculas de ARN, por ejemplo, ARNm, antisentido, ribozima o ARNbc que incluyen agentes iARN tales como ARNip, ARNhc, o miARN, a una célula del hígado in vitro o ex vivo mediante la entrega de un ácido nucleico a o expresando un ácido nucleico en una célula que es competente para dirigirla a la célula distal. La célula puede utilizarse después para la producción en cultivo celular de exovesículas que

contienen ARN, o para trasplante autólogo o heterólogo en un organismo mamífero receptor. La célula puede ser una célula madre, pero excluyendo las células madre embrionarias humanas. En una modalidad, entre otros, la invención incluye métodos para entregar al menos un ARN bicatenario (ARNbc) a una célula objetivo del hígado en un animal que comprende transfectar una primera célula en el animal distinta de dicha célula objetivo con un ácido nucleico que codifica dicho ARNbc, en donde dicha transfección resulta en que el ARNbc se entrega a la célula objetivo. El ácido nucleico que codifica el ARNbc se puede cotransfectar con un ácido nucleico que expresa un ligando de transmembrana o superficie específico de dicha célula objetivo, ya sea en un vector simple o a través de constructos de ácido nucleicos separados.

Los métodos de la presente invención se pueden usar para entregar cualquier ácido nucleico que es capaz de ser entregado de la célula transfectada a la célula objetivo distal. En algunas modalidades, el ácido nucleico es un constructo de expresión del polinucleótido, *por ejemplo,* un ADN de plásmido o vector viral, que codifica una molécula efectora de ARN, *por ejemplo,* una molécula de iARN que comprende una región de ARNbc homóloga y complementaria a un gen objetivo en dicho órgano o tejido distal (por ejemplo, para mediar la interferencia por ARN o iARN), u otro ARN biológicamente activo. Moléculas adecuadas de ARNbc o iARN expresadas incluyen ARNhc, ARNip y miARN y se encuentran típicamente aproximadamente entre 34 a aproximadamente 500 bases de longitud e incluyen regiones bicatenarias o parcialmente bicatenarias de aproximadamente al menos 15 pares de base, típicamente 19 a 29 pares de base; tamaños de ARNm típicamente en el intervalo de aproximadamente 700 nts a aproximadamente 15,000 nts de longitud.

En una parte, de otras, la presente descripción describe los métodos para entregar los ácidos nucleicos a los órganos y tejidos distales a través de la administración intramuscular y transfección *in vivo* de las células del músculo con al menos un tipo de ácido nucleico. Por ejemplo, la descripción divulga un método para entregar al menos un ARN bicatenario (ARNbc) a un órgano o tejido objetivo en un animal que comprende transfectar las células del músculo esquelético en dicho animal con un ácido nucleico que codifica dicho ARNbc, en donde dicha transfección resulta en que dicho ARNbc se entrega a dicho tejido u órgano objetivo. Cuando se transfectan células del músculo esquelético, el órgano o tejido objetivo es un órgano o tejido o célula diferente al músculo esquelético. En algunas partes, una célula de músculo esquelético se transfecta con un constructo de expresión que codifica una molécula de ARNbc, la molécula de ARNbc se expresa en la célula del músculo esquelético, y la molécula de ARNbc se entrega a una célula objetivo que no es una célula de músculo esquelético.

En otra parte, entre otros, la presente descripción describe los métodos para administrar ácidos nucleicos a los órganos y tejidos distales a través de la administración intradérmica o subcutánea y la transfección *in vivo* de células de la piel incluyendo fibroblastos con al menos un tipo de ácido nucleico. Por ejemplo, la invención incluye un método para entregar al menos un ARN bicatenario (ARNbc) a un órgano o tejido objetivo en un animal, que comprende transfectar las células de la piel de dicho animal con un ácido nucleico que codifica dicho ARNbc, en donde dicha transfección resulta en dicho ARNbc que se entrega a dicho tejido u órgano objetivo. Cuando las células de la piel se transfectan, el órgano o tejido objetivo es un órgano o tejido o célula diferente de la piel. En algunas modalidades, una célula de la piel se transfecta con un constructo de expresión que codifica una molécula de ARNbc, la molécula de ARNbc se entrega a una célula objetivo que no es una célula de la piel.

Mientras que algunas modalidades abarcan transfectar con un ácido nucleico que codifica un ARNbc las células del músculo esquelético, o células de la piel en un animal, se abarcan además los métodos en donde el ARNbc se transfecta directamente en las células del músculo, o células de la piel. Estas moléculas de ARNbc incluyen moléculas de ARNip, ARNhc y o miARN sintéticas y transcritas exógenamente preparadas, incluyendo ARN químicamente modificados. Por ejemplo, la descripción incluye un método para entregar al menos un ARNbc al órgano o tejido objetivo de un animal, que comprende transfectar células del músculo esquelético, células de la piel, u otras células competentes específicas en dicho animal con dicho ARNbc, en donde dicha transfección resulta de que se entrega dicho ARNbc a dicho otro órgano o tejido objetivo. Las moléculas adecuadas de ARNbc incluyen los ARNhc, ARNip y miARN y están típicamente entre aproximadamente 34 y aproximadamente 500 nucleótidos, preferentemente comprenden al menos 15 a 29 pares de bases en la conformación bicatenaria, incluyendo en algunas solicitudes ciertos desajustes como los miARN . Los métodos de la invención se pueden realizar para no inducir una respuesta de interferón/PKR, por ejemplo usando moléculas de ARNbc más cortas entre 19 a 29 pares de bases, o usando otros métodos conocidos en la técnica ver publicación de los Estados Unidos 2004/0152117. Los ARN se pueden modificar químicamente como conocido en la técnica para aumentar la estabilidad y disminuir la toxicidad y efectos no específicos.

Los solicitantes demostraron además que las moléculas de ARNbc, que incluyen moléculas de ARNbc largas (*por ejemplo*, al menos aproximadamente 60, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600 bp y mayores), pueden expresarse intracelularmente en células de mamífero competentes para la respuesta al estrés (*por ejemplo*, células adultas, diferenciadas o no embrionarias) sin evidencia de su inducción de respuesta al interferón, estrés, o "pánico", ver US 2004/0152117A1. Adicionalmente, los métodos de la invención pueden servir para reducir al mínimo o evitar la inducción de una respuesta al estrés en la célula objetivo a la que el ARNbc se entrega con independencia de la longitud o naturaleza del ARNbc; por ejemplo, los ARNbc entregados a las células distal dentro de "protuberancias" puede evitar la inducción de una respuesta al estrés, a diferencia de los mismos ARNbc que entran a

través de la membrana celular sin la cubierta de la "protuberancia" alrededor. Cualquier molécula puede conjugarse con ARNbc, cotransfectarse o co-expresarse con este, e incluso puede entregarse con este a la célula objetivo.

La presente descripción abarca además los métodos para tratar o prevenir las enfermedades en los órganos o tejidos distales en un animal a través de la administración intramuscular, intradérmica o subcutánea o transfección *in vivo* de otras células competentes específicas, con al menos un ácido nucleico. Por ejemplo, la descripción incluye un método para tratar o prevenir la enfermedad en el órgano o tejido objetivo en un animal, que comprende transfectar las células del músculo esquelético, células de la piel u otras células competentes no-objetivo en dicho animal con un ácido nucleico que codifica un ARNbc correspondiente con un gen objetivo en una célula de dicho órgano o tejido objetivo, en el que dicha transfección dijo ARNbc resultados en ser entregado a dicho tejido u órgano objetivo, y en donde la entrega de dicho ARNbc a dicho tejido u órgano objetivo inhibe o reduce la expresión de dicho gen objetivo en dicho órgano o tejido objetivo tratando o mejorando de ese modo dicha enfermedad. La entrega "intramuscular", "intradérmica", o "subcutánea" como se define en la presente incluye cualquier método que logra la transfección de células dentro del tejido identificado, incluyendo, sin limitarse a la inyección con aguja del propio tejido o entrega en un vaso sanguíneo que abastece el tejido, entrega intravascular en un vaso que tiene permeabilidad mejorada, inyección sin aguja, proyección de pistola de genes o biolística en una célula o tejido, cualquiera de las diversas tecnologías conocidas de inyección/electroporación, parche transdérmico, etc.

La administración puede ser a través de cualquier método o dispositivo que puede lograr la introducción deseada del polinucleótido, *por ejemplo* aguja, jeringa, catéter o cánula de inyección o inyección sin aguja, *por ejemplo,* un dispositivo de inyección sin aguja Bioject, que se puede ajustar para entregar una medicación líquida a diferentes profundidades incluyendo intradérmica, subcutánea, y/o intramuscular. Un parche transdérmico se puede emplear también, así como un inyector biolístico o dispositivo de "pistola de genes" capaz de disparar un vector de expresión plásmido en las células. Cualquiera de los diferentes dispositivos y tecnologías de inyección/electroporación (Inovio/Genetronics, Ichor, VGX etc.) pueden usarse también, como lo pueden los métodos hidrodinámicos intravasculares que utilizan diferentes medios *por ejemplo,*permeabilidad aumentada/presión aumentada, para promover la entrega a las células, incluyendo músculo, *por ejemplo,* los métodos de entrega génica Mirus Pathway IV™ (Mirus, Madison, WI) que utilizan un puño o torniquete para restringir el flujo de sangre y aumentar la presión dentro del vaso para facilitar la entrega intravascular de ácidos nucleicos tales como vectores de expresión de plásmidos a los tejidos perfundidos por el vaso, *por ejemplo,* el músculo de extremidades. Una jeringa, bomba u otro dispositivo adecuado se puede usar para efectuar la entrega rápida intravascular, mientras que el flujo sanguíneo se ocluye transitoriamente, promoviendo de ese modo la transfección de las células del músculo adyacentes.

Los métodos de la presente invención son particularmente adecuados para tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones de o que involucran el hígado incluyendo las enfermedades virales del hígado, cáncer de hígado y las enfermedades genéticas del hígado, o afecciones que se pueden modular direccionando un ARN o gen en el hígado a través de *por ejemplo* interferencia por ARN o antisentido, o terapia génica en donde se sustituye el ARNm funcional. Los ARNm terapéuticos expresados y las proteínas se pueden entregar también a las células objetivo a través de los métodos de la presente descripción. Los métodos son apropiados también para el direccionamiento de genes responsables de ciertas enfermedades o trastornos metabólicos en el hígado tal como niveles altos de colesterol, por ejemplo, incluyendo pero sin limitarse a la apolipoproteína B y pcsk9. Los métodos se pueden usar además para entregar agentes terapéuticos basados en ácido nucleico a otras células y órganos o tejidos, incluyendo las células cancerosas o células infectadas con VIH, por ejemplo, mediante la expresión de receptores u otros ligandos adecuados en la superficie de las células objetivo, y/o mediante la co-expresión de ligandos específicos exovesiculares o de la superficie celular en células competentes específicas transfectadas. Los métodos se pueden usar además profilácticamente, por ejemplo, para entregar los ARNbc u otros agentes terapéuticos basados en ácidos nucleicos a las células objetivo para proteger contra la futura infección o enfermedad.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Gráfico que demuestra la disminución del por ciento en la expresión de HBsAg mediada por el vector NUC050, que expresa cuatro ARNbc de horquilla pequeña dirigidos a HBV (experimento 183-9) en comparación con el vector control (183-10) en ratones NOD^{scid}. Los ratones se administraron ya sea con el plásmido NUC050 (183-9) o plásmido control negativo NUC049 (183-10), formulados con bupivacaína e inyectados vía intramuscular (IM) en día 0. Ambos grupos de ratones recibieron una inyección hidrodinámica (HDI) del plásmido de expresión de HBsAg NUC054 en el día 5. Los niveles séricos de sAg se midieron en diferentes días después de la dosificación. Los valores representan el promedio de sAg como un por ciento del valor de sAg presangrado para cada grupo de animales.

Figura 2. Gráfico que muestra la relación de luciferasa de Renilla:luciérnaga (RLU) en respuesta a la electroporación del músculo de NUC050 contra NUC049 en ratones C57B1/6. Los ratones se administraron ya sea con el plásmido NUC050 o el plásmido control negativo NUC049 a través de inyección intramuscular (IM) simultáneamente con la electroporación (EP) en el día 0. En el día 6, ambos grupos de ratones recibieron una inyección hidrodinámica (HDI) del plásmido reportero doble de la luciferasa NUC060. Los valores representan el promedio de la relación RLU de Renilla/RLU de Luciérnaga para cada grupo de animales. La diferencia de 34.9% es estadísticamente significativa mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para dos muestras ($p<0,05$).

Figura 3. Diagrama de cajas y bigotes de las relaciones de NUC050 contra NUC049 de ratones individuales ND-300. La distribución de los valores de la relación Renilla:Luciérnaga entre los animales individuales de cada grupo respectivo se puede visualizar mediante el diagrama de cajas y bigotes. La porción "caja" representa el intervalo intercuartílico (Q1-Q3). La línea vertical dentro de la caja representa el promedio de la mediana.

Figura 4. Descripción esquemática de los ensayos ARN TaqMan, cuantificación de ARNip en tiempo real basada en TaqMan incluidas dos etapas, tallo-lazo RT y PCR en tiempo real. Los iniciadores de tallo-lazo RT unidos a la porción 3' de moléculas miARN y se transcriben inverso con la transcriptasa inversa. Después, el producto RT se cuantificó usando PCR TaqMan convencional que incluye el iniciador directo específico a miARN, iniciador inverso y las sondas TaqMan marcadas con colorante. El propósito del iniciador directo de cola en 5' es aumentar su temperatura de fusión (Tm) en función de la composición de la secuencia de moléculas de miARN.

Figura 5. Fotos de protuberancias musculares publicadas teñidas inmunológicamente por β-galectina (Fig. 5, paneles B, C y D) en comparación con con un tiempo fotográfico transcurrido por los inventores de la presente de unas protuberancias secretoras de mioblastos (panel A).

Figura 6. Diagrama de cajas y bigotes que muestra la distribución de los valores de la relación Renilla:Luciérnaga entre los animales individuales de cada grupo respectivo se puede visualizar mediante el diagrama de cajas y bigotes. La porción "caja" representa el intervalo intercuartílico (Q1-Q3). La línea vertical dentro de la caja representa el promedio de la mediana.

Figura 7. Gráfico que muestra los valores medios de HBsAg seguida la electroporación intramuscular del plásmido NUC050. Los niveles medios de sAg de los tres grupos de dosis (10ug, 5ug, y 2ug) se representan en el gráfico (A) día +2, (B) día+7, y (C) día+16. La reducción de sAg en el grupo NUC050 es significativa ($p<0.05$) en el grupo día+2 10ug, el grupo día+7 10ug, y el grupo día+7 5ug.

Figura 8. Gráfico que muestra la relación ND-360 de luciferasa de Renilla:Luciérnaga (RLU) en respuesta a la entrega/administración subcutánea de NUC050 contra NUC049 en los ratones C57B1/6. Los ratones se administraron ya sea con el plásmido NUC050 o el plásmido control negativo NUC049 a través de la inyección subcutánea (SC) en el día 0. Ambos grupos de ratones recibieron una inyección hidrodinámica (HDI) del plásmido reportero doble de la luciferasa NUC060 en el día 6. Los valores representan el promedio de la relación RLU de Renilla/ RLU de Luciérnaga en el hígado de cada grupo de animales en el día 11. La diferencia de 16.7% es estadísticamente significativa mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para dos muestras ($p<0,05$).

Figura 9. Distribución de las relaciones de actividad de la luciferasa de Renilla/Luciérnaga del ratón individual ND-360 para NUC050 versus NUC049. La distribución de las relaciones de actividad Renilla:Luciérnaga entre los animales individuales de ND-360 en los grupos experimentales (NUC050) y control (NUC049) se muestran mediante el diagrama de cajas y bigotes. La porción 'caja' representa el intervalo intercuartílico (Q1-Q3). La línea vertical dentro de la caja representa la mediana y las líneas horizontales se extienden en los extremos inferior y superior de la distribución.

Figura 10 . Distribución de los niveles de HBsAg normalizados en el ratón individual para NUC 049 contra NUC050 en el día 6 (13 días después de la inyección del vector) y día 11 (18 días después de la inyección del vector).

Descripción detallada de la invención

La presente invención abarca métodos para entregar ARN incluyendo ARN bicatenario (ARNbc) a una célula objetivo distal del hígado expresando el ARN (*por ejemplo,* un ARNbc) en, o introduciendo el ARN en, una primera célula de la piel o músculo que es competente para la entrega inter-órgano o inter-tejido o intercelular. Por "distal" se entiende el RNA, *por ejemplo,* un ARNbc se transporta a un órgano, tejido o célula diferente de la célula en la que se introduce o expresa inicialmente. "Competente para la entrega inter-órgano o inter-tejido o intercelular" o "competente para dirigir una célula u órgano o tejido distal" se refiere a que la célula en la que el ARNbc se expresa o introduce es capaz de facilitar la entrega del ARNbc al órgano, tejido o célula distal, *por ejemplo,* a través de extrusión vesicular. Tales células incluyen las células del músculo y células de la piel.

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la inyección intramuscular, intradérmica o subcutánea de un ácido nucleico que codifica un ARNbc correspondiente a un gen objetivo resulta en la inhibición de la expresión del gen objetivo en el hígado. Como consecuencia, en una parte, la descripción abarca los métodos para entregar *in vivo* los ácidos nucleicos a los órganos y tejidos distales, los métodos para tratar o prevenir enfermedades y trastornos en los órganos o tejidos distales a través de la administración intramuscular, intradérmica o subcutánea y la transfección de células del músculo o piel con al menos un ARNbc, o al menos un ácido nucleico que expresa el ARNbc correspondiente a un gen objetivo en una célula de dicho órgano o tejido distal .

Según reportado en la presente, los presentes inventores han demostrado que la entrega intramuscular, intradérmica o subcutánea de un vector o constructo de ADN que expresa las moléculas de ARNbc específicas al objetivo, *por ejemplo,*

moléculas de ARNhc (iARN), es sorprendentemente capaz de reducir la expresión del antígeno de superficie de la hepatitis B (sAg), así como otros genes objetivo en el hígado. Si bien no se desea estar limitado por ningún mecanismo, se postula que las moléculas de ARN bicatenario codificadas (*por ejemplo,* las ARNhc o ARNbc bicatenario) se transcriben a partir de constructos de expresión transfectados en células del músculo o piel y las moléculas de iARN se entregan después en el hígado. Aunque no se encontró evidencia de que cualquier cantidad significativa de ADN plasmídico de expresión de ARNbc intacto se introduce por sí solo en los hepatocitos de hígado, todavía no se puede descartar de que el ADN que codifica las moléculas bicatenarias de la invención se transfiere al hígado, ya sea sólo o en combinación con el ARNbc expresado.

Las células del músculo son un tipo de célula conocida para extruir vesículas de membrana plasmática, o exovesículas, también conocidas como "protuberancias" de la membrana. Por ejemplo, la galectina es una proteína expresada a altos niveles en células del músculo esquelético y liso, que carece de una secuencia señal y se ha mostrado que se secreta por un mecanismo diferente de la exocitosis clásica. Previo a la secreción, se ha observado la galectina volverse específicamente concentrada bajo la membrana plasmática de mioblastos y en evaginaciones de la membrana plasmática que aparecen para estrangular y formar vesículas extracelulares ricas en galectina. Cooper y Barondes, 1990; Cooper, 1997, Galectin-1: Secretion and Modulation of Cell Interactions with Laminin, Trends in Glycoscience and Glycotechnol. 9(45): 57-67; Harrison y Wilson, 1992, The 14 kDa β-galactosidase binding lectin in myoblast and myotube cultures: localization by confocal microscopy, J. Cell Sci. 101: 635-46.

Aunque el proceso de formación de protuberancias de la membrana y la extensión en la que contribuye la formación de protuberancias de la membrana a exportar proteínas en otros tipos de células aún no están claros, la formación de de protuberancias de la membrana se ha observado además en células distintas a las células del músculo. Claramente, se han detectado una variedad de diferentes genes de galectina en diferentes tipos de células, que carecen de la secuencia señal y contienen una secuencia de núcleo altamente conservada de aproximadamente 130 aminoácidos. Ver Cooper y Barondes, 1999. La galectina-1, la mejor caracterizada de la familia de galectina, se expresa en muchos tejidos además del músculo esquelético y liso, incluyendo hígado, pulmón, corazón, bazo, intestino, cerebro, linfocitos, timocitos y otras células vasculares, el sistema olfativo, y los sistemas nerviosos central y periférico. Inagaki y otros 2000, Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties, European J. Biochem. 267(10): 2955-64. La galectina-1 se expresa y secreta además por las células CHO por un mecanismo no clásico. Ver Seelenmeyer y otros, 2005, Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1, J. Cell Biol. 171: 373-81. La galectina-3, que ha demostrado además secretarse en las exovesículas que estrangulan la membrana plasmática, se detectó en macrófagos activados, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, el epitelio de las vías respiratorias y gastrointestinales, los riñones y algunas neuronas sensoriales, así como muchos tumores. Krzeslak y Lipinska, 2004, Galectin-3 as a multifunctional protein, Cell. Mol. Biol. Letts. 9: 305-28.

La protuberancia de la membrana, denominada a veces como ectocitosis, se ha observado en la periferia de muchos tipos de células, incluyendo fibroblastos, neutrófilos y condrocitos. Ver Mehul y Hughes, 1997, Plasma membrane targeting, vesicular budding, and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion, J. Cell Sci. 110: 1169-78. Además, se ha postulado que el derramamiento de exovesículas membrana puede ser también un mecanismo para la secreción de FGF-2 de una variedad de otros tipos de células. Ver Walter Nickel 2005 Unconventional Secretory Routes: Direct Protein Export Across the Plasma Membrane of Mammalian Cells, Traffic 6: 607-14. Además, las protuberancias de membrana se han propuesto como un mecanismo potencial de secreción para ciertas proteínas apocrina-sintetizadas, incluyendo la transglutaminasa secretora. Ver Aumuller y otros 1999 Apocrine secretion-- Fact or artifact? Ann. Anat. 181(5): 437-46. Dado que la protuberancia de membrana está involucrada en los efectos reportados en la presente invención, los métodos de la presente invención pueden realizarse usando cualquier célula productora de exovesícula que se conoce en la actualidad o que será identificada en el futuro. Debido a que las exovesículas extrudidas como promedio son de aproximadamente 80 nm de diámetro y se recubren con galectinas de superficie, tienen el potencial de interactuar con los tipos de células que contienen receptores de galectina. Tales células incluyen los hepatocitos, cuyos receptores de galectina están posicionados para enfrentar los sinusoides y exponerse así a las moléculas y partículas en la sangre.

Las exovesículas, que se generan como un proceso de formación de protuberancia o derrame de la membrana, se deben distinguir de los exosomas o cuerpos multivesiculares. Ver Walter Nickel 2005; ver además Cooper, 1997. Los exosomas son producidos desde el retículo endoplásmico y tienen muy poco o ningún contenido citosólico, aunque tienen algunas de las moléculas MHC en su superficie se pueden usar y los que presentan los vehículos de antígeno. Por el contrario, exovesículas brote de la superficie de las células del músculo e incluir el contenido citosólico se ha demostrado por los inventores. Claramente, en el proceso de ARN de interferencia expresado (eiARN), se produce la transcripción en el núcleo, pero el ARN se transporta después al compartimiento citoplasmático, donde los inventores postulan que después se incorpora en protuberancias de exovesículas fuera de la superficie de la membrana.

A pesar del mecanismo actual, la presente descripción divulga los métodos para entregar al menos un ácido nucleico a una célula objetivo en un animal, que comprende transfectar una primera célula en el animal distinta de dicha célula objetivo que es competente para direccionar la célula distal con un ácido nucleico que codifica un ARN de interés, *por ejemplo,* una "molécula de ARN efectora" que tiene una actividad biológica deseada, *por ejemplo,* un ARN antisentido ,

ARN de triple formación, ribozima, un ligando de ARN de alta afinidad seleccionado artificialmente (aptámero), un ARN bicatenario (*por ejemplo,* ARNip, ARNhc, miARN) u otro ARN de regulación o un ARNm, en donde dicha transfección resulta ya sea en ADN o el ARN codificado que se entrega a la célula objetivo. El ARN puede o no ser poliadenilado. El ARN puede o no ser capaz de ser traducido. La primera célula competente puede transfectarse además *in vitro* o *ex vivo,* y después de eso introducir la célula competente en el animal. Los métodos de la presente descripción pueden usarse para suministrar cualquier ácido nucleico que esté presente en el citoplasma de la célula transfectada y es capaz de ser entregado a la célula objetivo distal. Adicionalmente a los ARNbc transfectados y expresados, la presente invención incluye además métodos para entregar ARNm expresados a partir de genes terapéuticos. Los ARN que pueden entregarse a la célula objetivo distal incluyen, pero sin limitarse a, moléculas de ARN antisentido, ARN ribozima, ARNbc que incluyen ARNbc horquilla, MicroARN y ARNbc bicatenario, así como también ARNm.

Las células "competentes" adecuadas para usar en los métodos de la invención incluyen células del músculo, células de la piel y cualquier otra célula competente capaz de entregar ácidos nucleicos a una célula objetivo distal. Otras células competentes pueden identificarse usando uno de los ensayos de transferencia de ARN descritos en WO 00/63364. Por ejemplo, el Ejemplo 2 de WO 00/63364 describe dos ensayos diferentes *in vitro*que pueden usarse para detectar la transferencia de moléculas de ARN entre células objetivo y donadoras co-cultivadas.

Por "ARN bicatenario" o "ARNbc" se entiende un ácido ribonucleico que contiene al menos la región de los nucleótidos que se encuentra en una conformación bicatenaria. El ARNbc puede ser un ARNip, ARNhc o miARN convencional (incluyendo el transcripto primario o pri-miARN, pre-miARN, o miARN funcional) o un ARN que contiene más de una estructura de horquilla. El ARN bicatenario puede ser una sola molécula con una o más region(es) de auto-complementariedad de manera que los nucleótidos en un segmento de la molécula formen pares de base con nucleótidos en otro segmento de la molécula de ARN bicatenario. En diversas modalidades, un ARN bicatenario que consiste de una sola molécula está compuesta en su totalidad de ribonucleótidos, una combinación de ribonucleótidos y bases modificadas, o incluye una región que es de ribonucleótidos complementaria a una región de desoxirribonucleótidos. Alternativamente, el ARN bicatenario puede incluir dos hebras diferentes que tienen una o más region(es) de complementariedad entre ellos. De forma deseada, la región del ARN bicatenario que está presente en una configuración bicatenaria incluye al menos aproximadamente 15 a 20, 20 a 25, 25 a 30, 50, 75, 100, 200, 500, 1000, 2000 o 5000 nucleótidos que participan en una hebra de la estructura bicatenaria, o incluye todos los nucleótidos que están representados en el ARN bicatenario. En algunas modalidades, el ARN bicatenario es totalmente complementario y no contiene regiones de hebras sencillas, tales como los extremos de hebra sencilla. En otras modalidades, como *por ejemplo,* las moléculas de ARNbc de tipo miARN, las regiones bicatenarias se pueden intercalar con uno o más nucleótidos o zonas de hebra sencilla. En algunas modalidades el ARNbc es un ARNhc. Todos estos ARN sintéticamente preparados y exógenamente entregados, incluyendo los ARNhc y bicatenarios o ARNip, se pueden estabilizar químicamente y modificar químicamente, usando uno o más de los métodos y modificaciones químicas conocidas por los expertos en la técnica. Tales modificaciones que se pueden usar en conjunto incluyen la modificación química del azufre tales como enlaces de fosforotioato que hacen el fármaco más resistentes a la degradación, modificaciones de 2'-*O*-metoxietilo, etc. Ver *por ejemplo*Chiu y Rana, ARNip function in iARN: A chemical modification analysis, RNA (2003), 9:1034-1048. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

En algunas modalidades, la región de ARNbc de la molécula de ARN corresponde a un gen objetivo en dicho órgano o tejido objetivo (por ejemplo, para mediar la interferencia de ARN o iARN). En tales ejemplos, la región de ARNbc es preferentemente, no traducidas, y es sustancialmente homóloga y complementaria a una región del gen objetivo. Cuando se usa el ARNbc para la interferencia de ARN, una hebra de la estructura o región de ARNbc, *es decir,* la hebra antisentido, tendrá al menos aproximadamente 70, 80, 90, 95, 98, o 100% de complementariedad con un ácido nucleico objetivo, y la otra hebra o región, *es decir,*el secuenciador o región tendrá al menos aproximadamente 70, 80, 90, 95, 98, o 100% de identidad con un ácido nucleico objetivo. En tales modalidades, el ARNbc se considera que tanto es sustancialmente homólogo como complementario al gen objetivo, lo que significa que el ARNbc no necesita ser totalmente idéntico y complementario al gen objetivo siempre que sea aun eficaz para mediar la interferencia de ARN específica de la secuencia. Tales ARNbc generalmente tendrán una secuencia de al menos 19 nucleótidos contiguos 100% complementarios y homólogos a un ácido nucleico objetivo. Aplicaciones preferidas para el iARN son las moléculas de ARNbc de horquilla pequeña (ARNhc) y moléculas de microARN (miARN). Por ARNhc (ARN de horquilla pequeña) se entiende una molécula de ARN de menos aproximadamente 400 a 500 nucleótidos (nt), preferentemente menos de 100 a 200 nt, en el cual al menos una extensión de al menos 15 a 100 nucleótidos (preferentemente 17 a 50 nt, con mayor preferencia 19 a 29 nt) se aparea de base con una secuencia complementaria, localizada en la misma molécula de ARN, y donde dicha secuencia y la secuencia complementaria se separan por una región no pareada de al menos aproximadamente 4 a 7 nucleótidos (preferentemente de aproximadamente 9 a aproximadamente 15 nucleótidos) que forma un lazo monocatenario por encima de la estructura de tallo creada por las dos regiones de complementariedad de bases. Las moléculas ARNhc comprenden al menos una estructura tallo-lazo que comprende una región tallo bicatenaria de aproximadamente 17 a aproximadamente 100 bp; aproximadamente 17 a aproximadamente 50 bp; aproximadamente 40 a aproximadamente 100bp; aproximadamente 18 a aproximadamente 40 bp; o de aproximadamente 19 a aproximadamente 29 bp; homóloga y complementaria a una secuencia objetivo a inhibir; y una región lazo no pareada de al menos aproximadamente 4 a 7 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 9 a aproximadamente 15 nucleótidos, que forma un lazo de una sola hebra por encima de la estructura de tallo creada por las dos regiones de complementariedad de base. Además de los ARNhc simples, los

ARNhc incluidos pueden ser dobles o bi-dedos y ARNbc de horquilla multi-dedos, en la que la molécula de ARN comprende dos o más de tales estructuras de tallo-bucle separadas por una región espaciadora de simple hebra. Un vector recombinante puede ser diseñado mediante ingeniería genética para codificar múltiples, *por ejemplo,* tres, cuatro, cinco o más ARNbc de horquilla pequeña y/u otros ARNs tal como ARNm. El ARNbc horquilla puede ser un ARNbc horquilla simple o un un ARNbc horquilla de dos dedos o de múltiples dedos como se describe en PCT/US03/033466 o WO 04/035766 o una estructura de horquilla parcial o forzada como se describe en WO 2004/011624, o el ARNbc puede ser polinucleótido que comprende una o más moléculas efectoras de ARNbc codificadas en un contexto de miARN como se describe en PCT/US2007/81103 presentada el 11 de octubre de 2007.

Un ARNip se puede expresar o sintetizar y se compone de dos hebras de ARN que se aparean de base entre sí para formar un ARNbc, es decir, ARN bicatenario. El apareamiento de bases no necesita ser 100% y por lo tanto la complementariedad de una hebra con la segunda no necesita ser 100%. La complementariedad debe ser suficiente para mantener las hebras en la confirmación bicatenaria. La cantidad de complementariedad necesaria es dependiente de la secuencia y longitud y puede calcularse fácilmente por un experto en la técnica. La longitud de ARNip más óptima es 19-29 pb, cercana a la preferida es 30-40 bp. Un número limitado de desajustes dentro de la región bicatenaria, especialmente en el secuenciador, es compatible con la actividad de iARN. Los ARNip se pueden estabilizar químicamente y modificar químicamente, usando uno o más de los métodos y modificaciones químicas conocidas por los expertos en la técnica.

Por "ácido nucleico objetivo" se entiende la secuencia de ácido nucleico en el órgano, tejido o célula objetivo distal, cuya expresión se modula como resultado de la inhibición basada en el ácido nucleico específica de secuencia, *por ejemplo,* silenciamiento génico transcripcional o post-transcripcional, inhibición antisentido, escisión ribozimal, etc. La secuencia de ácido nucleico objetivo puede ser cualquier ácido nucleico en la célula objetivo, ADN, ARN o híbrido de ADN/ARN, cuya expresión se desea modular, e incluyen sin limitarse a las secuencias génicas o secuencias cromosómicas endógenas a la célula, así como secuencias introducidas, secuencias genómicas, ADNc, secuencias de ARNm, secuencias de patógenos intracelulares tales como los ácidos nucleicos virales presentes en la célula, secuencias transcritas y no transcritas, secuencias codificantes y no codificantes, secuencias traducidas y no-traducidas incluyendo los UTR 3' y/o 5', y secuencias reguladoras tales como el sitio de unión al factor de transcripción, secuencias de promotor, potenciador, y represor. Las secuencias de ácidos nucleicos objetivo adecuadas se asocian con el cáncer o el crecimiento anormal de las células, tal como oncogenes, y las secuencias de ácido nucleico asociadas con trastornos autosómicos dominantes o recesivos, así como las secuencias de ácido nucleico asociadas con patógenos, incluyendo los virus. "Modular" significa disminuir la expresión de un ácido nucleico objetivo en una célula, o la actividad biológica del polipéptido objetivo codificado en una célula, por al menos aproximadamente 20%, más preferentemente en al menos aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o aún 100%. En algunos ejemplos, la expresión de los genes en la célula objetivo se puede aumentar también, por ejemplo donde el gen dirigido por el ARNbc es un gen represor transcripcional u otro regulador negativo. En algunos ejemplos el ácido nucleico objetivo no estará presente en la primera célula transfectada. En algunos ejemplos el ácido nucleico objetivo estará presente en la primera célula transfectada, así como en la célula objetivo distal .

Típicamente con el ARN de interferencia expresado (eiARN), el ARNbc se expresa en la primera célula transfectada de un vector de expresión. En un vector tal, el secuenciador y la hebra no codificante del ARNbc se pueden transcribir a partir de la misma secuencia de ácido nucleico usando *por ejemplo,* dos promotores convergentes ya sea en el extremo de la secuencia de ácido nucleico o promotores separados que transcriben una secuencia codificante o antisentido. Alternativamente, dos plásmidos se pueden co-transfectar, con uno de los plásmidos diseñados para transcribir una hebra del ARNbc, mientras que el otro está diseñado para transcribir la otra hebra. Alternativamente, la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNbc comprende una repetición invertida, de manera que después de la transcripción a partir de un único promotor, el ARN expresado forma un ARN bicatenario, *es decir* que tiene una horquilla o estructura "tallo-lazo", *por ejemplo,* un ARNhc. El lazo entre las regiones de repetición invertida, o regiones codificantes o antisentido, típicamente es de al menos cuatro pares de bases, pero puede ser al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 50, o al menos aproximadamente 75, o más, o cualquier tamaño que permita la formación de la estructura bicatenaria. Múltiples estructuras de tallo-lazo se pueden formar a partir de un solo transcrito de ARN para generar un ARNbc multi-objetivo, ver WO 00/63364, y WO2004/035765. Las estructuras de horquilla pueden ser parciales o estructuras de horquilla forzadas como se describió en WO2004/011624.

Por "vector de expresión "se entiende un vector recombinante que incluye un constructo de ADN o ARN o vector viral que contiene al menos un promotor enlazado operativamente a una secuencia que codifica un ARN regulador tal como un ARNip, ARNhc, miARN, antisentido, o un gen corriente abajo o región codificante u otra secuencia de ácido nucleico que se transcribe (*por ejemplo,* un ADNc o fragmento de ADN genómico que codifica una proteína, opcionalmente, enlazado operativamente a la secuencia situada fuera de una región codificante, o una región codificante de ARN sentido y/o una antisentido, y/o secuencias de ARN situadas fuera de una región codificante). La secuencia(s) que se transcribe puede incluir cualquier secuencia de ácido nucleico objetivo cuya expresión se desea modular. La transfección o transformación del vector de expresión en una célula receptora permite a la célula expresar el ARN codificado por el vector de expresión. Un vector de expresión puede ser un plásmido diseñado mediante ingeniería genética, vector viral que incluye pero sin limitarse a AAV, adenovirus, virus de la viruela, herpesvirus, retrovirus,

lentevirus, y alfavirus, o cromosoma artificial derivado de, por ejemplo, un bacteriófago, adenovirus, virus adeno-asociado, retrovirus, virus de la viruela, o herpesvirus. Preferido para la expresión de moléculas efectoras de ARNbc en los métodos de la invención son la ARN polimerasa III tipo 3 o promotores de ARN polimerasa III " tipo U6" y múltiples constructos de expresión del promotor de la RNA polimerasa III como se enseña en WO 06/033756. Los promotores de ARN polimerasa II, incluyendo promotores virales de mamíferos, y promotores celulares de mamíferos, incluyendo humanos se pueden utilizar para la expresión de los ARN más largos, incluyendo los ARNm. Un constructo de expresión se puede replicar en una célula viva, tales como una bacteria o célula eucariota o puede se puede hacer sintéticamente. Para los propósitos de esta solicitud, los términos "vector de expresión", "constructo de expresión", "vector", y "plásmido" se usan indistintamente en el sentido ilustrativo general y no pretenden limitar la invención a un tipo particular de constructo de expresión.

Por "enlazado operativamente" se entiende que un gen y una o más secuencias reguladoras de la transcripción, *por ejemplo,* un promotor o potenciador, están conectados de tal de forma que permitan la expresión génica cuando las moléculas apropiadas (*por ejemplo*, proteínas activadoras de la transcripción) se unen a las secuencias reguladoras.

Por "promotor" se entiende una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción de un gen. Se incluyen también en esta definición los elementos de control de transcripción (*por ejemplo,* potenciadores) que son suficientes para controlar la expresión génica dependiente del promotor de una manera específica al tipo de células, tejido-específico, o temporal específica, o que son inducibles mediante señales o agentes externos; tales elementos, que son bien conocidos por los artesanos expertos, se puede encontrar en una región 5' o 3' de un gen o dentro de un intrón. Se incluyen los promotores ARN pol I, ARN pol II y ARN pol III, incluyendo los promotores de ARN polimerasa III Tipo 3 tales como H1, 7SK, y U6. Los promotores de la polimerasa III Tipo 3 se pueden usar ventajosamente para expresar oligonucleótidos cortos tales como los ARNhc, ARNip, y otras moléculas efectoras de oligonucleótidos de ARN de no más de 300 a 400 nucleótidos de longitud (ver US 5,624,802, Noonberg y otros). Un promotor preferido de ARN pol III 7SK (7SK 4A) y constructos de expresión que comprenden múltiples promotores de la polimerasa III se enseñan en WO 06/033756. Se incluyen también los promotores que permiten la sobreexpresión de los ARNm en el citoplasma de la célula transfectada, por ejemplo para optimizar la incorporación de las moléculas de ARNm expresados en exovesículas de membrana.

Los plásmidos de expresión que transcriben las moléculas efectoras de ARN incluyendo las ARNbc, ya sea en el citoplasma o el núcleo se pueden utilizar. Los vectores de expresión se pueden diseñar para integrarse en el cromosoma de las células transfectadas, por ejemplo por recombinación homóloga. Alternativamente, los vectores de expresión pueden replicarse en las células transfectadas extracromosómicamente. Los vectores de transcripción nuclear para la expresión de proteínas están diseñados preferentemente para expresar ARN terminal 5' poliadenilado (por ejemplo, un vector que contiene un promotor de la ARN polimerasa II y un sitio poli A) para facilitar la exportación desde el núcleo. La transcripción intracelular puede utilizar también los promotores del bacteriófago T7 y SP6, *es decir*, mediante la transfección de un vector que coexpresa el gen de la ARN polimerasa apropiada, que se puede diseñar para transcribir en el citoplasma o en el núcleo. Se pueden usar también los promotores para las ARN polimerasas virales, ya sea dependiente de ADN y ARN. Alternativamente, las polimerasas replicadoras de ARNbc pueden usarse. Los promotores para las polimerasas celulares tales como ARN polimerasa I, II, o III o ARN polimerasa mitocondrial se pueden utilizar también. Los promotores específicos de tejido o células pueden usarse para limitar la expresión del ARNbc en la primera célula transfectada. Los promotores de la polimerasa III son especialmente deseables para laexpresión de los ARN pequeños diseñados mediante ingeniería genética, ver WO 06/033756, Multiple Polymerase III Promoter Expression Constructs. Se prefieren los promotores de la polimerasa III tipo 3, incluyendo varios promotores de mamíferos U6, H1 y 7SK, incluyendo la secuencia promotora 7SK 4A modificada enseñada en él. Ver además, por ejemplo, US 2005/0130184 A1, Xu y otros, dirigido a los promotores de polimerasa III modificados que utilizan elementos potenciadores de la polimerasa II, así como US 2005/0130919 A1, Xu y otros, dirigida a promotores reguladores de la polimerasa III y polimerasa II. En algunas modalidades se puede desear incluir uno o más promotores de la polimerasa I, y/o uno o más de la polimerasa II, y/o uno o más de la polimerasa III en un constructo de expresión simple, como, *por ejemplo,* donde se desee utilizar los promotores de la pol III para expresar una o más moléculas efectoras de ARN tales como los ARNbc y uno o más promotores de la pol II para expresar uno o más ligandos de dirección.

Un enfoque deseable para la expresión citoplásmica es usar polimerasas endógenas tales como la ARN polimerasa mitocondrial para fabricar el ARNbc en el citoplasma. Estos vectores se forman diseñando los constructos de expresión de ADN que contienen promotores mitocondriales corriente arriba de la secuencia que codifica el ARNbc. Como se describió anteriormente para los vectores de transcripción nuclear, el ARNbc se puede generar usando dos de tales promotores situados a cada lado de la secuencia objetivo, tal que la dirección de transcripción de cada promotor se opone mutuamente. Alternativamente, dos plásmidos se pueden co-transfectar. Uno de los plásmidos se diseña para transcribir una hebra de la secuencia objetivo, mientras que el otro se diseña para transcribir la otra hebra. Los constructos de promotor único se pueden desarrollar tal que dos unidades de la secuencia objetivo se transcriben en tándem, de tal manera que la segunda unidad está en la orientación inversa con respecto a la otra. Las estrategias alternativas incluyen el uso de secuencias de relleno entre las secuencias objetivo en tándem.

La expresión citoplasmática de ARNbc puede lograrse además mediante la transcripción de un molde de ARN de hebra

sencilla en el núcleo de la célula transfectada, que se transporta después al citoplasma donde sirve como un molde para la transcripción de moléculas de ARNbc, utilizando un único promotor subgenómico opuesto en la orientación con respecto al promotor nuclear. El promotor nuclear genera una hebra de ARN que se transporta en el citoplasma, y el promotor subgenómico singular en el extremo 3' del transcripto es suficiente para generar su copia antisentido por una ARN polimerasa dependiente de ARN para dar lugar a una especie de ARNbc citoplasmático. Tanto los vectores de transcripción nuclear como citoplasmática pueden contener un gen reportero que permite monitorear las células que adoptaron el plásmido. Cualquier tipo de vector puede usarse, incluyendo plásmidos, vectores virales, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores de AAV, etc. El uso de vectores de expresión para expresar el ARN bicatenario se discute también en detalle en US 20040152117.

Si se desea, los sistemas de transcripción inducible y reprimible se pueden usar para controlar el momento de la síntesis de moléculas efectoras de ARN incluyendo los ARNm. Los sistemas de regulación inducible y reprimible implican el uso de elementos del promotor que contienen secuencias que se unen a factores de transcripción procariótico o eucariótico corriente arriba de la secuencia de codificación del ARNbc. Adicionalmente, estos factores portan también dominios de la proteína que transactiva o transreprime la ARN polimerasa II. El sistema de regulación también tiene la capacidad de unirse a una molécula pequeña (*por ejemplo*., un coinductor o un correpresor). La unión de la molécula pequeña a la molécula de proteína reguladora (*por ejemplo*, un factor de transcripción) resulta ya sea en un aumento o disminución de la afinidad por el elemento de la secuencia. Ambos sistemas inducibles y reprimibles se pueden desarrollar usando cualquiera de las combinaciones de inductor/factor de transcripción mediante el posicionamiento apropiado del sitio de unión con respecto a la secuencia del promotor. Los ejemplos de sistemas inducibles/reprimible descritos anteriormente incluyen lac, ara, esteroide-RU486, y ecdisona Rheogene, Lac (Cronin y otros Genes & Development 15: 1506-1517, 2001), ara (Khlebnikov y otros, J. Bacteriol. 2000 diciembre; 182(24):7029-34), ecdisona (Rheogene, www.rheogene.com), RU48 (esteroide, Wang X J, Liefer K M, Tsai S, O'Malley B W, Roop D R., Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Julio 20;96(15):8483-8), promotor tet (Rendal y otros, Hum Gene Ther. 2002 enero; 13(2):335-42. y Lamartina y otros, Hum Gene Ther. 2002 enero;13(2):199-210), o un promotor descrito en WO 00/63364, presentada en abril 19, 2000.

En una modalidad, entre otros, la presente descripción divulga los métodos para entregar ácidos nucleicos al hígado a través de la administración intramuscular, intradérmica o subcutánea y transfección *in vivo* de las células del músculo o de la piel con al menos un ácido nucleico. Al transfectar las células del músculo, el constructo de expresión comprende las secuencias de polinucleótidos que codifican el ARN bicatenario que se enlaza operativamente a elementos de regulación operables en la célula del músculo. Al transfectar las células de la piel, el constructo de expresión comprende secuencias de polinucleótidos que codifican el ARN bicatenario que se enlaza operativamente a elementos de regulación operables en la célula de la piel. Los promotores y otros elementos de regulación operables en las células del músculo y/o de la piel se conocen en la técnica, y por ejemplo incluyen, pero sin limitarse a los promotores de la polimerasa I, polimerasa II, y polimerasa III (*por ejemplo,* preferentemente promotores de pol III tipo 3 incluyendo los promotores humanos y otros mamíferos U6, 7SK, y H1), así como promotores mitocondriales, *por ejemplo,* promotores mitocondriales de cadena pesada y ligera humano y de otros mamíferos. Los ARN cortos (ARN modificados mediante ingeniería genética inferiores a 300-400 nt tal como los ARNhc) se expresan mejor por los promotores de pol I y/o pol III. Las ARN más largas, incluyendo los ARNm, se expresan mejor por los promotores de pol II, incluyendo los promotores virales tales como CMV IEP, RSV LTR, SV40, etc. Los promotores de bacteriófagos tales como T7, T3, SP6, etc. se pueden utilizar también si la célula se proporciona además con la(s) polimerasa(s) análogas T7, T3, SP6. Para la expresión en las células del músculo y/o de la piel, tales promotores de la polimerasa III se pueden usar para expresar los ARNbc pequeños y promotores de la polimerasa II, tales como CMV (promotor temprano de citomegalovirus) incluyendo HCMV (humano), MCMV (murino), SCMV (simio), SV40, RSV, vaccinia, y otros promotores virales; eucariótico incluyendo los promotores de la polimerasa II de mamífero, tales como el promotor de B-actina, se puede usar para expresar una ARNm traducible que codifica una proteína de la superficie celular, receptor, o ligando específico u otra proteína deseada. El ARNm se puede traducir en la primera célula y/o una célula distal en la que entrega.

Las células del músculo incluyen miocitos estriados o esquelético de mamíferos, incluyendo miocitos diferenciados, así como mioblastos indiferenciados. El músculo cardíaco es también músculo estriado. Un mioblasto es un tipo de célula madre que existe en los músculos. Las células del músculo esquelético se llaman fibras musculares o miocitos y se producen cuando los mioblastos se fusionan juntos. Por lo tanto, las fibras del músculo pueden tener múltiples núcleos. Los mioblastos que no forman fibras musculares se diferencian en células satélites. Estas células satélites permanecen adyacentes a una fibra muscular, separadas sólo por su membrana celular y por el endomicio (el tejido conectivo de colágeno que rodea la fibra muscular).

Administración "intramuscular" significa que el ácido nucleico se administra al tejido muscular y cualquier célula del músculo en el animal, incluyendo pero sin limitarse al músculo esquelético tales como los músculos deltoide, vasto lateral, ventroglúteo, tibial y dorsoglúteo. El medio por el que se puede lograr la administración intramuscular incluye la inyección por aguja, inyección sin aguja, electroporación, enfoques biolísticos, y cualquier otro método que puede lograr la entrega en una célula del músculo o una célula en el tejido muscular. Tal entrega puede ser directamente en el tejido muscular o a través de la entrega intravascular en las células del músculo o en las células en el tejido muscular suministrados por esos vasos sanguíneo(s). En los métodos de la invención, que comprenden la administración

intramuscular, el agente iARN o ARNbc expresado u otro agente terapéutico basado en ácido nucleico se diseña para inhibir la función de un polinucleótido objetivo en una célula de mamífero que no es una célula del músculo.

En un aspecto de la invención, un constructo de expresión de este tipo que codifican secuencias homólogas y complementarias a una o más secuencias de polinucleótidos objetivos presente en una célula del hígado se introduce en una célula del músculo esquelético u otro y la función de uno o más polinucleótidos objetivos en un hepatocito de hígado se inhibe, *por ejemplo,* polinucleótidos de un patógeno del hígado tal como un virus de la hepatitis, incluyendo el HBV y/o HCV y HDV y HAV. En otro aspecto, la invención implica introducir en una célula del músculo un constructo de expresión que codifica las secuencias de los genes específicos en el hígado responsables de enfermedades o trastornos metabólicos tales como niveles altos de colesterol, por ejemplo, incluyendo pero sin limitarse a la apolipoproteína B y pcsk9. Otro objetivo potencial en el hígado es el trastorno genético de la deficiencia alfa 1-antitripsina (deficiencia de α1-antitripsina, A1AD o alfa-1), causado por una mutación que resulta en la producción defectuosa de la alfa 1-antitripsina (A1AT), que conduce a la actividad disminuída de A1AT en la sangre y pulmones, y la deposición excesiva de proteína A1AT anormal en las células del hígado. El tratamiento utilizando los métodos de la invención puede incluir proporcionar un ARNbc inhibidor que dirige la secuencia de A1AT mutada, mientras que se co-expresa un ARNm que codifica la A1AT funcional. Esto se puede lograr proporcionando a las células del músculo un vector(es) de expresión que co-expresa el ARNbc inhibidor y un ARNm que codifica la proteína funcional, ambos se entregan a las células del hígado.

La administración "intradérmica" significa en o dentro de la piel, y puede incluir la administración a cualquier capa de la dermis o epidermis, y la entrega en cualquier célula de las mismas. La administración "subcutánea" significa justo debajo de la piel, o en la capa subcutánea de la piel, y la entrega en cualquier célula de la misma. Se abarca también las formas epicutáneas de administración, *es decir,*con "epicutánea" que significa sobre la superficie de la piel (por ejemplo, usando un parche transdérmico, pomada, loción o cualquier otro medio adecuado). Las células de la piel incluyen las células de la epidermis, incluyendo, por ejemplo, las células basales, melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel, nervios sensoriales, queratinocitos, y cualquier otra célula que se encuentra en el diversas capas de la epidermis, incluyendo la capa basal, la capa de células escamosas, el estrato granuloso, el estrato lúcido y estrato córneo. Se incluyen también las células de la piel, incluyendo células vasculares, células de la linfa, células de glándulas sudoríparas y sebáceas, células nerviosas, fibroblastos, y cualquier otra célula que se encuentra en las distintas capas de la dermis, incluyendo la capa papilar y la capa reticular. Las células de la piel incluyen también las de la hipodermis, *es decir* la capa más interna de la piel, que incluye las células de la grasa y colágeno.

La presente invención abarca los regímenes de entrega donde los ARNbc o vectores de ácidos nucleicos que expresan el mismo se entregan tanto a las células de la piel como células del músculo simultánea o secuencialmente. El medio por el que se puede lograr la administración intradérmica, subcutánea, y/o intramuscular incluye la inyección por aguja, inyección sin aguja, electroporación, métodos biolísticos, y cualquier otro método que puede lograr la entrega en una célula del músculo o de la piel o una célula en el tejido muscular o de la piel.

En una parte, la presente descripción divulga los métodos para entregar los ácidos nucleicos, incluyendo moléculas de ARN bicatenario y/o constructos de expresión de polinucleótidos que codifican las moléculas de ARN, *por ejemplo,*ARNm, antisentido, ribozima o ARNbc incluyendo los agentes de iARN tales como ARNip, ARNhc, o miARN, a una célula objetivo *in vitro* o *ex vivo* entregando un ácido nucleico a o expresando un ácido nucleico en una célula que es competente para la célula distal específica. Las células competentes donadoras pueden utilizarse también para la producción en cultivo de células de exovesículas que contienen ARN, o para el trasplante autólogo o heterólogo en un organismo mamífero receptor. La célula puede ser una célula del músculo, célula de la piel, células madre, o cualquier célula competente adecuada. Una célula que es competente para la célula distal específica se puede obtener *por ejemplo,* a partir de un potencial receptor mamífero, *por ejemplo,* un receptor humano o de otro donante, transfectadas *in vitro* o *ex vivo* con un constructo de expresión del polinucleótido seleccionado o con moléculas de ARN seleccionadas, e implantadas, *por ejemplo,*vía subcutánea o intramuscular, en un organismo mamífero receptor. La célula(s) trasplantada(s) puede ser autóloga o heteróloga con respecto al receptor. El mamífero receptor puede ser un mamífero inmunocomprometidos o un mamífero administrados con inmunosupresores. Las células implantadas pueden entonces servir como una "fábrica" para la producción *in vivo* de moléculas efectoras de ARN, *por ejemplo,* moléculas de iARN y/o ARNm, para el transporte a una célula distal. Tales células pueden expresar también ligandos u otras proteínas que mejoran la producción transporte, dirección, y/o absorción de exovesículas, tal como el receptor para el VIH. La célula distal puede ser una célula del hígado tales como un hepatocito u otra célula. La molécula efectora de ARN puede reprimir un gen objetivo en el hígado, *por ejemplo,* un gen de un patógeno tal como un virus de la hepatitis o un gen endógeno asociado con la enfermedad encontrado en el hígado. La célula objetivo distal puede ser también una célula no hepática, incluyendo cualquiera de las células objetivo descritas en la presente.

En un aspecto, la invención se refiere a un método de inhibición génica mediada por el ARNbc o iARN que comprende entregar *in vivo* a las células del músculo o la piel de un mamífero un vector de expresión de ácido nucleico que codifica un agente de iARN o ARNbc. Como se describe anteriormente, el(os) agente(s) iARN puede ser una o más moléculas de ARNbc de horquilla o bicatenario, incluyendo uno o más agentes ARNbc de horquilla pequeña . El vector de expresión de ARNbc puede ser ADN o ARN, incluyendo ADN plasmídico. El vector de expresión puede ser un vector viral tal como, por ejemplo AAV. El vector de expresión de polinucleótido puede ser suministrado al músculo como ADN

o ARN "desnudo"(libre de asociación con un agente facilitador de la transfección) o en asociación con un agente que facilita la transfección o la transferencia en las células de la piel o células del músculo o miocitos de mamíferos, incluyendo miocitos diferenciados, así como mioblastos indiferenciados. En otro aspecto, la invención se refiere a un método de iARN que implica la entrega por transfección intramuscular *in vivo* mediada por la electroporación del músculo esquelético o miocitos, o células de la piel de un mamífero con un vector o constructo que expresa las moléculas de ARNbc .

Numerosos agentes se pueden usar para facilitar la transfección de las células del músculo de mamífero *in vivo* incluyendo pero sin limitarse a complejos de polímeros o péptidos, anfífilos catiónicos, lípidos catiónicos, formulaciones liposómicas catiónicas, incluyendo la bupivacaína anestésico local de amida amino, partículas incluyendo las partículas de oro utilizadas para la entrega biolística o de "pistola de genes", agentes anfifilo policatiónico o catiónico, incluyendo espermina y/o derivados de la espermidina, incluyendo varios compuestos de colesterilo espermina. El vector de expresión de polinucleótido que se entrega frecuentemente al tejido muscular o de la piel de mamíferos formulado en asociación con o como un complejo con uno o más de tales agentes facilitadores de la transfección.

La bupivacaína es uno de los agentes anestésicos locales anfifílicos de amida amino conocidos para actuar como un agente facilitador de la transfección para la entrega a los tejidos incluyendo el músculo esquelético, de polinucleótido, incluyendo ADN plasmídico, que codifica las proteínas inmunogénicas, *por ejemplo,* antígenos de patógenos, para su uso en el campo de las vacunas de ADN. Las proteínas se expresan en las células del músculo, induciendo respuestas inmunes tanto humorales como celulares. Ver *por ejemplo,* patente de los Estados Unidos 6,217,900 y 6,383,512, "Vesicular Complexes and Methods of Making and Using the Same." Los métodos para inyectar el ADN "desnudo" que codifica los polipéptidos inmunogénicos y otros biológicamente activos en el músculo o en la piel son también conocidos, ver *por ejemplo,* patente de los Estados Unidos 5,580,859; 5,589,466. US 6,413,942describe entregar a las células del músculo el ADN "desnudo" que codifica un polipéptido terapéutico secretable, *por ejemplo,* hormona de crecimiento, que se libera en la circulación para lograr un efecto terapéutico. Entre los numerosos compuestos anfífilo policatiónicos o catiónicos útiles para facilitar la transfección de polinucleótidos *in vivo* en células de mamífero son diversos compuestos de espermina de colesterilo o espermidina de colesterilo , incluyendo carbamatos de espermina de colesterilo y sus combinaciones usadas como se enseña *por ejemplo* en la patente de los Estados Unidos 5,837,533; 6,127,170; 6,379,965; 5,650,096; y5,783,565; y US 2006/0084617, publicada el 20-Abril-2006. Estos son sólo ejemplos ilustrativos de los muchos agentes químicamente diferentes conocidos por los expertos en la técnica que se puede emplear para facilitar la transfección de ácidos nucleicos que incluyen constructos de expresión de ARNbc en las células del músculo o de la piel de mamífero de acuerdo con la enseñanza de la invención.

Tales ácidos nucleicos desnudos y complejos se pueden usar en métodos de entrega, incluyendo la inyección con aguja y/o sin aguja directamente en el tejido de la piel y/o muscular, *por ejemplo,* vector de expresión de ADN en complejo con 0.25% de bupivacaína en un vehículo adecuado para inyección como se enseñó anteriormente, así como la entrega a células del músculo o de la piel por vía vascular, tales como el método hidrodinámico mediante el que la presión intravascular aumentada produce aumento de la permeabilidad vascular para el paso de moléculas, incluyendo ácidos nucleicos en el espacio intersticial del tejido muscular y, de la piel y la absorción aumentada de tales moléculas por las células de la piel y músculo. Tal presión intravascular aumentada se puede lograr a través de una combinación de la presión aplicada externamente *por ejemplo* torniquete o puño, y/o volumen aumentado de la administración del fármaco, y/o la velocidad aumentada de la administración. Los volúmenes administrados a la extremidad de un mamífero puede ser de 250 ml, 500 ml, hasta un litro o más. En un aspecto, el ácido nucleico es un vector de expresión de ADN plasmídico que se puede administrar en dosis relativamente grandes sin toxicidad,*por ejemplo* 100mg, 200mg, 350mg, 500mg hasta 1, 2, o 5 gramos o más. De ese modo *por ejemplo*un vehículo de entrega se puede formular que comprende 350-500mg del vector de expresión de ADN desnudo o en complejo en 100 a 500 ml (*por ejemplo* 2mg/ml) de tampón de citrato con dextrosa al 5% en agua para inyección (D5W). Cuando se administra rápidamente en el sistema vascular aferente o eferente que suministra a una extremidad del mamífero sometido a la presión aplicada externamente, una formulación tal proporciona una gran cantidad de agente en el espacio intersticial de las células del músculo, facilitando de ese modo la transfección de las células por acción de masas. La formulación puede ser hipotónica, isotónica o hipertónica. La administración de un vehículo de entrega hipertónico puede aumentar el transporte de moléculas tales como ADN u otros ácidos nucleicos en las células del músculo adyacentes. Ver la discusión adicional más abajo. Otros vehículos de entrega, excipientes y métodos adecuados para su uso en los métodos de la invención pueden formularse por aquellos expertos en la técnica de las ciencias farmacéuticas, ver *por ejemplo,* las enseñanzas de Remington's Pharmaceutical Sciences 18va Ed. (1990); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ma Ed. (2000), 21ra Ed. (2005).

En otro aspecto, los ácidos nucleicos que incluyen los constructos de expresión de ARNbc se entregan *in vivo* en células de la piel de mamíferos o miocitos estriados o esqueléticos y/o mioblastos a través de electroporación. Ver, *por ejemplo,* las formulaciones y metodología de electroporación de constructos de ácido nucleico en las células del músculo de mamífero tal como se enseña en US 2004/0014645 A1 "Increased delivery of a nucleic acid construct *in vivo* by the poly-L-glutamate ('PLG') system" y los métodos y dispositivos para la electroporación se enseñan en *por ejemplo,* US 2005/0052630A1 "Constant current electroporation device and methods of use." Ver además US 2005/0070841A1 y US 2004/0059285A1"Electroporation device and injection apparatus" y US 2004/0092907A1"Method for muscle delivery of drugs, nucleic acids and other compounds." Los diversos parámetros, que incluyen la resistencia del campo eléctrico

requerida para la electroporación de cualquier tipo de célula conocida incluyendo músculo y la piel son generalmente conocidos en la literatura relevante de la investigación, así como en numerosas patentes y solicitudes en el campo . Ver *por ejemplo,* US 6,678,556 "Electrical field therapy with reduced histopathological change in muscle"; US 7,171,264 "Intradermal delivery of active agents by needle-free injection and electroporation"; y US 7,173,116, que enseña formulaciones para la entrega de genes a través de la electroporación, incluyendo las formulaciones de varios polímeros aniónicos, que incluyen el poli-L-glutamato. El aparato para la aplicación terapéutica de la electroporación se encuentra comercialmente disponible, *por ejemplo,* el sistema de electroporación de ADN MedPulser® (Inovio/Genetronics, San Diego, CA), y se describen en las patentes tales como US 6,567,694; US 6,516,223, US 5,993,434, US 6,181,964, US 6241,701, y US 6,233,482 ; la electroporación también puede usarse para la transfección de células *in vitro* como se describe *por ejemplo.* en US20070128708A1. La electroporación *in vivo* en las células del músculo de mamífero presenta una alternativa atractiva para aplicaciones experimentales, así como un método de entrega prometedor para aplicaciones terapéuticas en mamíferos, incluyendo los humanos, con los ensayos clínicos en curso en el campo de las vacunas de ADN. La electroporación puede utilizarse también para entregar ácidos nucleicos en células *in vitro.* En consecuencia, la administración mediada por electroporación en las células del músculo y de la piel de ácidos nucleicos que incluyen constructos de expresión que utilizan cualquiera de los muchos dispositivos disponibles y sistemas de electroporación conocidos por los expertos en la técnica representa un nuevo medio sorprendente para la entrega de un ARN de interés a una célula, tejido, u órgano objetivo distal, tal como un hepatocito o otra célula del hígado.

En otra modalidad, la administración puede ser a través de la inyección con aguja, inyección sin aguja, *por ejemplo,* el dispositivo de inyección sin aguja Biojector® 2000 (Sistemas libre de aguja Bioject, Tualatin, Oregon), que puede ajustarse para entregar un medicamento líquido a varias profundidades incluyendo las vías intradérmica, subcutánea, y/o intramuscular. Otros sistemas de inyección sin aguja comercialmente disponibles incluyen el Dermo-jet (Robbins Instruments, Chatham, NJ). La inyección sin aguja se basa en una corriente de alta presión de la propia medicación para penetrar la piel. A medida que la corriente de fluido se abre camino a través del tejido, sigue el camino de menor resistencia, lo que resulta en una distribución de la medicación muy dispersa, tipo tela de araña. Un parche transdérmico se puede emplear también, así como un inyector de biolística o dispositivo de "pistola de genes" capaz de disparar un vector de expresión plasmídica en las células, incluyendo las células de la piel, la región subcutánea, y/o el tejido muscular. Los dispositivos de pistola de genes o biolística para la entrega *in vivo* a mamíferos se encuentran comercialmente disponibles, como *por ejemplo,* la pistola Helios Gene Gun (Bio-Rad, Hercules, CA) ver, *por ejemplo,* las patentes de Estados Unidos 5,830,877 y 6,723,077.

En otro aspecto, la administración intramuscular puede lograrse a través de métodos intravasculares hidrodinámicos que utilizan diversos medios,*por ejemplo,* presión aumentada, para promover la entrega a las células incluyendo el músculo, *por ejemplo,*los métodos de entrega de genes Mirus Pathway IV™ (Mirus, Madison, WI) que utilizan un torniquete o puño para restringir el flujo de sangre y aumentar la presión dentro del vaso para facilitar la entrega intravascular de ácidos nucleicos tales como vectores de expresión de plásmidos para el extremo muscular. Una variedad de métodos conocidos en la técnica se pueden usar para aumentar el paso de un ácido nucleico a partir de vasos sanguíneos aferentes o eferentes en las células, incluyendo las células del parénquima de los tejidos adyacentes. Por ejemplo, la permeabilidad aumentada de los vasos a los ácidos nucleicos y otras moléculas se pueden lograr mediante la aplicación externa de presión con un puño tal como un puño o torniquete de la presión arterial en una ubicación distal al sitio de la administración del ácido nucleico y/o a través de la presión intravascular aumentada lograda mediante la administración de una formulación farmacéutica seleccionada en un volumen de inyección relativamente grande y/o a través de una entrega rápida y/o la administración de agentes biológicamente activos, tales como la papaverina, hialuronidasa, etc. Los parámetros específicos para lograr óptimos aumentos en la permeabilidad vascular en sujetos de prueba, tales como animales de laboratorio, así como los sujetos humanos están dentro del nivel de experiencia en las técnicas de la ciencia animal, anatomía, fisiología, farmacología y medicina clínica. Por ejemplo, el volumen de inyección óptimo está relacionado con el tamaño del animal a inyectar, así como el volumen de tejido objetivo, *por ejemplo,*se pueden necesitar volúmenes de 0.03ml/g a 0.1ml/g de peso corporal o superior, con volúmenes de inyección de 70 a 200 ml reportado para los primates La entrega al tejido de músculo esquelético de una extremidad se puede lograr por inyección intravascular rápida o la entrega a través de la aguja, catéter, etc de un volumen relativamente grande (*por ejemplo,* > 5ml por extremidad de la rata o > 70 ml para un primate) con aplicación externa concomitante de una presión *por ejemplo* con un puño o torniquete, tal que la presión dentro del vaso se aumenta y se mejora la permeabilidad al movimiento hacia fuera de oligonucleótido, polinucleótido, etc. Ver *por ejemplo,* US 2004/0259828, US 6,379,966; US 2007/0244067; Hagstrom y otros, Molecular Therapy (2004) Vol. 10 (núm. 2), 386-398; Herweijer y Wolff, Gene Therapy (2007) 14, 99-107; Lewis y Wolff, Advanced Drug Delivery Reviews 59 (2007) 115-123. Tales métodos se pueden emplear para entregar ácidos nucleicos, incluyendo los ARN, ADN, y mezclas de estos, a diversas células del parénquima de los tejidos en un mamífero, incluyendo las células del músculo estriado como *por ejemplo,* mioblastos, células satélite, miotúbulos y miofibras, mediante la entrega en un vaso sanguíneo aferente o eferente suministrando al tejido, preferentemente a un vaso del sistema arterial tales como una arteria, arteriola, sinusoides, y/o capilar, pero en algunas modalidades un vaso del sistema venoso, incluyen una vena, vénulas y capilares. La transfección aumentada de tales células, incluyendo las células del músculo, puede lograrse *por ejemplo* mediante el aumento de la permeabilidad de un vaso aferente proximal al tejido objetivo en el que un ácido nucleico seleccionado se administra como se enseña *por ejemplo* en US 7,148,205, "Intravascular delivery of non-viral nucleic acid". El ácido nucleico, *por ejemplo,* un un vector de expresión de ARN o ADN, puede ser "desnudo" (es decir, libre de agentes que se asocian o forman complejo con el ácido nucleico y promueven la transfección) o se asocian o forman

complejo con uno o más agentes, incluyendo compuestos anfipáticos o anfifílicos tales como anfífilos catiónicos, colesterol y/o espermina que contienen complejos como se describe en otra parte de la presente invención. Varios medios se pueden usar para aumentar la permeabilidad de los vasos, *por ejemplo,* el ácido nucleico desnudo o en complejo se puede suministrar en un volumen de solución relativamente grande, y/o con medidas físicas para aumentar la presión dentro del vaso aplicando la presión distal y/o disminuyendo la luz del vaso, como *por ejemplo*, con un torniquete o puño

Aunque algunas modalidades abarcan transfectar las células de la piel o del músculo esquelético o de otras células competentes en un animal con un ácido nucleico que codifica un ARNbc, también se abarcan los métodos en donde el ARNbc se transfecta directamente en las células del músculo o de la piel u otras células competentes específicas. Por ejemplo, la invención incluye un método para proporcionar al menos un ARNbc al hígado en un animal que comprende transfectar las células de la piel o del músculo esquelético en animales con dicho ARNbc, en el que dicha transfección resulta en dicho ARNbc que se entrega a dicho hígado.

Las moléculas de ARNbc adecuadas para la entrega a células de la piel y del músculo u otras células objetivo competentes incluyen los ARNhc y ARNip para modalidades de iARN y están típicamente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 pares de bases, y más particularmente entre aproximadamente 19 y aproximadamente 29 pares de bases. El ARNbc y complejos u otras formulaciones que contienen la misma se pueden entregar a las células de la piel o del músculo u otras células usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los descritos anteriormente con respecto a los vectores de expresión.

Algunas secuencias de ARNbc, posiblemente en ciertos tipos de células y mediante ciertos métodos de entrega, pueden resultar en una respuesta de interferón. Los métodos de la invención se pueden realizar para no inducir una respuesta de interferón/PKR, por ejemplo mediante el uso de moléculas de ARNbc corta entre 20 a 25 pares de bases, expresando moléculas de ARNbc intracelularmente, o usando otros métodos conocidos en la técnica, ver solicitud de los Estados Unidos 20040152117. Por ejemplo, uno de los componentes de una respuesta del interferón es la inducción de la proteína quinasa PKR inducida por interferón. Para prevenir una respuesta de interferón, las respuestas de interferón y PKR se pueden silenciar en las células transfectadas y objetivo usando especies de ARNbc dirigidas contra los ARNm que codifican las proteínas involucradas en la respuesta Como alternativa, los promotores de la respuesta de interferón se silencian usando ARNbc, o la expresión de proteínas o factores de transcripción que unen secuencias del elemento de respuesta de interferón (IRE) usando ARNbc u otras técnicas conocidas.

Por "bajo condiciones que inhiben o previenen una respuesta de interferón o una respuesta al estrés por ARNbc" se entiende las condiciones que previenen o inhiben una o más respuestas de interferón o respuestas de estrés por ARN celular que involucran toxicidad celular, muerte celular, una respuesta anti-proliferativa, o una capacidad disminuída de una ARNbc para llevar a cabo un evento PTGS. Estas respuestas incluyen, pero sin limitarse a, la inducción de interferón (tanto Tipo 1 como Tipo II), inducción de uno o más genes estimulados con interferón, activación de PKR, activación 2'5'-OAS, y cualquier secuela organismal y/o corriente abajo celular que resultan de la activación/inducción de una o más de estas respuestas. Por "secuela organismal" se entiende cualquier efecto en un animal completo, órgano, o más localmente (*por ejemplo*, en el sitio de la inyección) causada por la respuesta al estrés. Las manifestaciones ilustrativas incluyen producción elevada de citocinas, inflamación local y necrosis. Deseablemente las condiciones que inhiben estas respuestas son tales que no más de aproximadamente 95%, 90%, 80%, 75% , 60% , 40% , o 25% , y lo más deseablemente no más de aproximadamente 10 % de las células se someten a toxicidad celular, muerte celular, o una capacidad disminuida para llevar a cabo el evento PTGS, en comparación con una célula no expuesta a tales condiciones que inhiben la respuesta de interferón, todas las otras condiciones que sean iguales (*por ejemplo*, mismo tipo de célula, misma transformación con el mismo ARNbc).

La apoptosis, inducción de interferón, la activación/inducción de 2'5' OAS, inducción/activación de PKR, respuestas anti-proliferativas, y los efectos citopáticos son todos indicadores de la vía de respuesta al estrés por ARN. Los ensayos ilustrativos que se pueden usar para medir la inducción de una respuesta de estrés por ARN como se describe en la presente incluyen un ensayo TUNEL para detectar las células apoptóticas, ensayos ELISA para detectar la inducción de alfa, beta y gamma interferón, análisis de la fragmentación de ARN ribosomal para detectar la activación de 2'5' OAS, medición de eIF2a fosforilado como un indicador de activación de PKR (proteína quinasa inducible por ARN), ensayos de proliferación para detectar cambios en la proliferación celular, y el análisis microscópico de las células para identificar los efectos citopáticos celulares, ver *por ejemplo*, solicitud de Estados Unidos 20040152117.

Como se señaló anteriormente, aunque no desea estar vinculado por cualquier mecanismo particular, los presentes inventores plantean la hipótesis que las moléculas de ARN de doble hebras transcritas a partir de constructos de expresión en células de músculo y piel se entregan al hígado, posiblemente dentro de exovesículas formadas a partir de protuberancias o desprendimiento de la membrana en la superficie de la célula transfectada. En línea con esta hipótesis, la presente descripción incluye además co-transfectar o co-expresar, junto con un ARN de interés, que incluye ARNbc o ARNm terapéutico en las células del músculo u otras células competentes, los genes que codifican ligandos de superficie o transmembrana específicos para la célula objetivo, órgano o tejido de interés. Los genes que codifican ligandos específicos se pueden expresar en el mismo vector como el ARNbc, por ejemplo, a partir de un promotor separado, o se pueden expresar a partir de un vector separado. En algunas modalidades, entre otros, el ARNbc se

expresa a partir de un promotor pol III y el ligando específico se expresa a partir del promotor poIII. La incorporación de dichos ligandos de superficie en exovesículas podrían mejorar más aún la entrega al hígado, o facilitar la entrega a otros objetivos, tales como las células cancerosas o células inmunes.

Por ejemplo, la presente invención abarca métodos por los cuales las células de la piel o músculo se transfectaron con (1) eiARN o ARNbc o complejos de ARNbc y (2) un vector de expresión que codifica un ligando de la superficie de la célula que se une específicamente a un receptor en la célula del hígado. El vector de expresión eiARN y el vector de expresión que codifica el ligando pueden ser un solo vector de expresión o dos vectores de expresión diferentes. Como un ejemplo, expresar una glicoproteína viral (tal como la glicoproteína gp120 de la envoltura del VIH) en células de músculo o la piel adicionalmente a los ARNbc específicos a VIH podría conducir a la formación de exovesículas de músculo que contienen ARNbc anti-VIH que comprende la glicoproteína del VIH en la superficie. Estas exovesículas ahora tienen el potencial para ser absorbidas por las células T y otros inmunocitos CD4+ que infecta el VIH Otros ligandos de la superficie de la célula adecuados y células objetivo incluyen el dominio de unión del receptor a la hemaglutinina (HA) de la influenza A que reconoce e interactúa con un oligosacárido en la superficie de las células epiteliales respiratorias. Desde que los virus de influenza A aviar y virus de la influenza A humana preferentemente se dirigen a receptores diferentes de oligosacáridos de superficie de la célula epitelial (*por ejemplo*., receptores de la célula epitelial identificados como glicanos terminados por un ácido siálico unido por α 2,3 (SA) que unen preferentemente cepas aviares y glicanos terminados por un SA unido por α2,6 que unen cepas humanas. J. Virol., agosto 2006, p. 7469-7480, Vol. 80, núm. 15), los constructos de expresión se pueden diseñar para expresar ARNbc activos contra los virus de la influenza A humana y/o aviar, así como los dominios de unión del receptor de la influenza A que preferentemente se dirigen al receptor humano y/o receptor aviar. Aun otros ejemplos de ligandos de la superficie de la célula y las células objetivo serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica de la virología. Por ejemplo, el HBsAg se puede codificar para facilitar aún más la entrega a los hepatocitos. Cualquier proteína de unión al receptor viral codificada por un virus se puede expresar para dirigir las protuberancias o exovesículas a las células infectadas por o capaces de ser infectadas por los virus respectivos. Las células se pueden dirigir profilácticamente o terapéuticamente.

Cualquier ligando de la superficie de la célula adecuado que tiene especificidad a un receptor de superficie de la célula objetivo se puede expresar en las células transfectadas, clonando el gen para el ligando de superficie de la célula detrás de un promotor operativo en la célula transfectada tal que el ligando de superficie de la célula se expresa y se muestra en la superficie de la célula transfectada. Para localizar preferentemente los ligandos expresados en la superficie de la célula en las exovesículas, el gen para el ligando de la superficie de la célula se puede fusionar a, o modificar para incorporar señales específicas adecuadas a partir de proteínas conocidas que se incorporan dentro de las exovesículas en la superficie de la célula transfectada.

Por ejemplo, como se discutió anteriormente, la galectina es una proteína que se expresa a altos niveles en células del músculo esquelético y liso, y se observó que se vuelve específicamente concentrado en las evaginaciones de la membrana plasmática y extrudidas en las vesículas extracelulares Cooper y Barondes, 1990; Cooper, 1997; Harrison y Wilson, 1992. Se detectó una variedad de otros genes de galectina en diferentes tipos de células, cada una que carecen de una secuencia señal y que contienen una secuencia del núcleo altamente conservada de aproximadamente 130 a 135 aminoácidos que contienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) entre aproximadamente 30 y 90 residuos. Ver Cooper y Barondes, 1999. Walter Nickel y colaboradores encontraron que el dominio CRD en la galectina es necesario para la exportación, sugiriendo que la maquinaria de exportación de galectina hace uso de moléculas de superficie que contienen β-galactosidasa como receptores de exportación para galectina-1 intracelular. Seelenmeyer y otros, 2005. En consecuencia, puede ser posible dirigir otros ligandos de la superficie de la célula a evaginaciones de exovesículas en la membrana celular fusionando las regiones codificantes para dichos ligandos de superficie de la célula en el marco para todo o parte de la región de codificación del dominio CRD de galectina. La secuencia completa de aminoácidos de la galectina-1 se determinó a partir de humanos, así como algunas otras especies incluyendo vaca , rata, ratón, pollo y anguila eléctrica Inagaki y otros, 2000; Hirabayashi y otros, 1988, Complete amino acid sequence of a β-galactosidase-binding lectin from human placenta, J. Biochem. (Tokyo) 104:1-4; Abbott y Feizi, 1989, Evidence that the 14 kDa soluble beta-galactosidase-binding lectin in man is encoded by a single gene, Biochem. J. 259: 291-94; Couraud y otros, 1989, Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14 kDa lectin, J. Biol. Chem. 264: 1310-16.

La galectina-3 es otro miembro de la familia galectina que muestra que se secreta por las estrangulaciones de los dominios de evaginación de membrana y la liberación de vesículas extracelulares donde se protege de la proteolisis. Krzeslak y Lipinska, 2004. La microscopía electrónica demostró que las vesículas son morfológicamente heterogéneas y tienen un tamaño pequeño (hasta aproximadamente 0.5 micras). La galectina-3 es única en la familia galectina al poseer un dominio N -terminal adicional que consiste de 100 a 150 aminoácidos dependiendo de la especie de origen, que se propuso por contener información específica para la secreción no clásica. Más aun, al menos un grupo ha demostrado que la adición de este segmento N-terminal a una proteína citosólica normalmente, tal como cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) resultó en la exportación eficiente de la proteína de fusión a partir de células Cos transfectadas. Ver Mehul y Hughes, 1997. En consecuencia, debería ser posible dirigir otros ligandos de la superficie de la célula a evaginaciones de exovesículas en la membrana celular mediante la fusión de las regiones de codificación para dichos ligandos de la superficie de la célula en el marco para todo o parte de la región codificante para este dominio N-terminal

de galectina-3. Además, se pueden usar otros métodos clásicos para expresar ligandos específicos sobre la superficie de la célula.

La descripción abarca además los métodos en donde los genes de los receptores de la superficie de la célula que tienen especificidad de unión para ligandos de superficie de la célula en la célula competente se clonan, transfectan en y expresan *in vivo.* en las células objetivo. Como alternativa, los genes recombinantes se pueden introducir en las células objetivo que sobrerregulan la expresión de receptores específicos de superficie de la célula. Administrar ciertos fármacos al paciente puede resultar además en la sobrerregulación de los receptores de la superficie de la célula objetivo en función del receptor de superficie de la célula objetivo de interés.

En algunas modalidades, los métodos de la presente descripción pueden comprender aislar además al menos una exovesícula a partir de una célula transfectada, en donde la exovesícula aislada contiene el ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc, y contactar dicha célula objetivo con la exovesícula aislada. Las células productoras de exovesículas se pueden transfectar *in vitro* o *in vivo,* y las exovesículas que contienen ARNbc después de eso se aíslan y usan para contactar las células objetivo. Los métodos para transfectar las células productoras de exovesículas y líneas celulares *in vitro* con vectores de expresión y las composiciones de ARNbc son conocidos en la técnica, como son los métodos para aislar exovesículas. Por ejemplo, Mehul y Hughes describieron un método para aislar una fracción vesicular enriquecida con galectina-3 a partir de macrófagos murinos y células Cos-7 transfectadas con el plásmido que expresa la galectina-3. Mehul y Hughes, 1997, Plasma membrane targeting, vesicular budding, and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion, J. Cell Sci. 110: 1169-78.

Los métodos de la presente invención se pueden usar en métodos para tratar y prevenir las enfermedades en los mamíferos, particularmente humanos. Cualquier mamífero se puede tratar por los procedimientos de la presente invención, que incluyen pero sin limitarse a humanos, primates, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, cobayos, etc., animales de granja, tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, cabras, etc., así como animales domésticos, que incluyen gatos, perros, etc. Los experimentos descritos en la presente muestran que las enfermedades se pueden tratar terapéuticamente o profilácticamente. Particularmente, la presente invención demuestra que el ARNbc expresado en o justo debajo de la piel, o en el músculo esquelético se pueden entregar a otros órganos o tejidos. En consecuencia, la presente invención se puede usar para tratar o prevenir cualquier enfermedad de un órgano o tejido en el que una reducción en la expresión génica es eficaz. Por ejemplo, la descripción incluye un método para tratar un paciente que sufre de una infección de un órgano o tejido, por ejemplo una infección viral, por la entrega de ARNbc específico viral y fármacos virales que contienen ARNbc a la célula objetivo infectada.

En el caso de la infección viral por hepatitis B y/o C, por ejemplo, los ARNbc específicos a HBV y/o HCV u otros fármacos específicos a HBV o HCV que contienen ARNbc se entregan al hígado por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea o por la administración a cualquier otra célula competente específica. Cualquier secuencia génica de HBV y/o HCV puede ser específica. Otras enfermedades virales del hígado tratables por los métodos de la presente invención incluyen la hepatitis inducidas por CMV y HAV, HBV y/o, HDV, y HEV y HAV.

En el caso de la infección por VIH, por ejemplo, los ARNbc específicos del VIH u otros fármacos específicos al VIH que contienen ARNbc se entregan a las células T, progenitores de células T u otras células susceptibles a la infección por el VIH por administración intramuscular, intradérmica o subcutánea o por administración a cualquier otra célula competente específica. Cualquier secuencia génica de VIH adecuada puede ser específica, incluyendo, pero sin limitarse a env (gp12), gag, y pol. Como con cualquier virus altamente mutable, es deseable suministrar una pluralidad de moléculas de ARNbc que se dirigen a dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias génicas virales diferentes de VIH y/o diferentes genes virales de VIH *por ejemplo*., una o más secuencias de env de VIH (gp 120 y gp 41), gag de VIH (p24 , p17, etc.), y/o pol de VIH (incluyendo proteasa, integrasa p31, ribonucleasa p15, transcriptasa inversa p51) que codifican para proteínas estructurales, y/o una o más secuencias de genes reguladores del VIH tat, rev, nef , vif, vpr y vpu, que codifican para proteínas que controlan la capacidad del VIH para infectar una célula, producir nuevas copias de virus, o causar la enfermedad. En el caso del VIH, como se discutió anteriormente, que expresan la glicoproteína gp120 del VIH en las células del músculo u otras células competentes, adicionalmente a ARNbc específica a VIH deben conducir a la formación de exovesículas que contienen ARNbc que comprenden la glicoproteína del VIH en la superficie. Estas exovesículas ahora tienen el potencial para ser absorbidas por las células T y otros inmunocitos CD4+ que infectan el VIH. Cualquier otro ligando que se une a un receptor sobre la superficie de las células T se podría además usar para los ARNbc objetivos o ARNm terapéuticos para las células T.

Otros virus que pueden ser específicos por la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, influenza, RSV, rabia, picomavirus, polio, coxsacchie, virus herpes simple Tipo I y 2, encefalitis San Luis, virus de Epstein - Barr, mixovirus, JC, coxsakievirus B, togavirus, sarampión, paramixovirus, echovirus, buniavirus, citomegalovirus, varicela- zóster, paperas, encefalitis equina, coriomeningitis linfocítica, rhabodovirus que incluyen la rabia, virus de simio 40, virus de polioma humano, parvovirus, virus del papiloma, adenovirus de primates, coronavirus, retrovirus, Dengue, fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, y/o BK o cualquiera de las especies/familias de Astoviridae, Togaviridae, Flaviviridae, paramyxoviridae, arterivirus, Rhabdoviridae, Filoviridae, orthomyxoviridae, bunyaviridae, arenaviridae , reoviridae, Birnaviridae, circoviridae, Adenoviridae, Iridoviridae, Retrovirus , Herpesvirus, Hepadenovirus, Poxvirus, Parvovirus, Papilomavirus, y Papovavirus.

El ARN prion, *por ejemplo*, ARNm, puede ser dirigido además para la represión.

Las infecciones por otros patógenos se pueden prevenir o tratar además usando los métodos de la presente invención, incluyendo protozoos, bacterias, levaduras, e infecciones fúngicas. Por ejemplo, para los parásitos intracelulares, tal como Plasmodio, fármacos que contienen ARNbc específicos a patógenos u otros ARNbc efectivos contra el patógeno se pueden entregar a las células susceptibles a la infección por administración intramuscular, intradérmica o subcutánea o por administración a cualquier otra célula competente específica. Los métodos de la presente invención son especialmente útiles para tratar la infección de hepatocitos por especies de Plasmodio por administración intramuscular, intradérmica o subcutánea y/o expresión y entrega de ARNbc específico a Plasmodium para el hígado.

Como se discutió anteriormente, los presentes inventores plantean la hipótesis que los ARNbc expresados en las células de músculo y piel se entregan a los órganos o tejidos distales después que se incorporan dentro de exovesículas en la superficie de la célula transfectada. Esta incorporación podría ser un mecanismo pasivo basado en los números verdaderos de moléculas de ARNbc expresadas en el citoplasma de la célula, donde los ARNbc se capturan como resultado de un proceso natural, y llevado adelante en la vesícula. En este sentido, como se describió anteriormente, la invención podría abarcar los métodos para entregar cualquier ácido nucleico u otro componente celular expresado en niveles suficientes para que se incorporen en exovesículas de membrana como protuberancias de la superficie de la célula, que incluyen los ARNm expresados a partir de genes terapéuticos, *es decir*, terapia génica.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir e ilustrar la presente invención. Como tal, estos no deben interpretarse para limitar el alcance de la invención. Aquellos en la técnica apreciarán bien que muchas otras modalidades también caen dentro del alcance de la invención, como se describió anteriormente y en las reivindicaciones.

Ejemplos

Como se reporta en la presente descripción los presentes inventores encontraron que la entrega intramuscular de complejos ADN/Bupivacaína, o transfección mediada por electroporación intramuscular de las células del músculo con un vector o constructo que expresa moléculas ARNbc, *por ejemplo*, moléculas ARNhc (iARN), es sorprendentemente capaz de reducir la expresión de genes objetivo expresados en el hígado. Algunos conjuntos de experimentos que se describen demostraron silenciamiento génico en el hígado del ratón, mediado por un vector de expresión de ARN interferente (eiARN) expresado, inyectado en el músculo. Los diseños experimentales difieren más significativamente en la secuencia de administración del material de prueba (terapéutico vs. profiláctico), y el producto final que está siendo ensayado para determinar el nivel de silenciamiento génico que tienen lugar. En el modelo terapéutico, la molécula objetivo (plásmido que expresa un ARN que se silencia) se administra antes que se administre la molécula fármaco (plásmido que expresa la molécula de silenciamiento ARNhc). Lo contrario es cierto para el modelo profiláctico. En todos los experimentos, el ARN objetivo que se silencia se mide indirectamente cuantificando el nivel de proteína o actividad enzimática que se traduce a partir del ARN objetivo. En algunos experimentos, el antígeno de superficie del HBV (sAg) es el producto final medido. En otros, la actividad luciferasa es el producto final medido.

En todos los experimentos descritos aquí, el protocolo hidrodinámico usado para la inyección del plásmido objetivo dirige el plásmido al hígado, y se ensaya en los intervalos de tiempo cuando el plásmido se expresa exclusivamente en el hígado. En ciertos conjuntos de experimentos, la expresión de ARN objetivo se restringe además al hígado porque se usa un promotor específico al hígado, que no permite niveles significativos de la transcripción en otros tejidos. Dado que el hígado secreta los productos de proteína en el sistema circulatorio del animal, es posible y conveniente para la muestra del suero de la sangre del animal medir la expresión del plásmido objetivo basado en el hígado en algunos de estos experimentos. Ya que la obtención de una muestra de suero del animal no implica sacrificar al animal o de cualquier otra forma alterar la función hepática, esto permite al investigador probar repetidamente los niveles de ARN objetivo en el hígado en múltiples intervalos de tiempo, midiendo de manera indirecta el producto de la proteína o actividad enzimática de la proteína indicadora en la sangre.

En todos los experimentos "NUC050" se refiere al plásmido eiARN que es específico al HBV y que media el silenciamiento génico de sAg. NUC049 es un plásmido eiARN control negativo (que contiene una versión mutada de un ARNhc derivado de NUC050).

Ejemplo 1: Inhibición terapéutica de la expresión *in vivo* del gen de sAg de HBV por inyección intramuscular

En el modelo terapéutico, los animales reciben el objetivo ARN exógeno en la forma de un plásmido que expresa la secuencia codificante del antígeno de superficie del HBV a través de inyección hidrodinámica en la vena de cola. La inyección hidrodinámica es un método que usa un volumen grande con tiempo de inyección rápido para preferentemente dirigir el plásmido de ADN al hígado donde se expresa.

Para obtener ratones que expresan un gen objetivo en el hígado, el ADNc de HBsAg (antígeno de superficie) se colocó bajo el control de un promotor específico de hígado en un vector plasmídico disponible en el comercio (pLIVE). En el Día

-10, este vector se inyectó hidrodinámicamente en una cepa de ratones inmunodeficientes (*NOD.CB17-Pkrdc*^{scid}/J). De este modo, el ADN se localiza en gran medida en los hepatocitos del hígado y el promotor específico a tejido restringe además la expresión del ARNm de sAg a estas células. Dado que los ratones son inmunodeficientes, son capaces de expresar el gen objetivo durante largos períodos de tiempo (más de un mes) porque no se realizará respuesta inmune a la proteína foránea codificada por el gen objetivo.

Cinco días después de la administración de plásmido objetivo (Día -5), se sangraron los ratones para determinar los niveles de HBsAg circulante en el suero.

En el día 0, los ratones se inyectaron por vía intramuscular con el vector NUC050 a 1.0 mg/ml en una solución 0.25 % bupivacaína en un volumen total de 50 ul. El vector NUC050 codifica cuatro moléculas diferentes de ARNhc que se dirigen a porciones diversas del genoma de la hepatitis B para la degradación a través del mecanismo del iARN celular. Tres de estas se dirigen a las regiones de HBsAg contenidas en el vector objetivo preadministrado a los ratones. Un grupo control de ratones se trató con el plásmido NUC049 control negativo. En algunos experimentos, los ratones recibieron otro plásmido control negativo, pGL2, que expresa el ARNm de luciferasa pero no moléculas de ARNhc)

Los animales se sangraron posteriormente de nuevo en los Días 4, 11, 19, y 26 días después de la administración del vector eiARN, respectivamente, y los niveles de HBsAg en el suero se determinaron usando un ELISA HBsAg disponible en el comercio (Bio-Rad, Hercules, CA. HBsAg 3.0 EIA # de catálogo 32591). De 5 a 8 ratones se usaron para cada grupo de tratamiento y los resultados se presentan como el porcentaje de HBsAg de los valores iniciales de HBsAg (pre-tratamiento). La capacidad del tratamiento con el vector NUC050 para disminuir la expresión de HBsAg se estimó calculando, para cada día de sangrado, un valor normalizado de la diferencia de los niveles promedio de HBsAg para el control menos los grupos experimentales. La normalización se realizó calculando el porcentaje de HBsAg para cada día posterior del sangrado, con respecto a los valores de HBsAg en el pretratamiento. Pruebas estadísticas Wilcoxon se usaron para evaluar la significación de los resultados. Las diferencias experimental vs. control se tomaron que sean significativas en los valores de p de menos de 0.05.

El Día 11 y el Día 19 muestran promedios de diferencias estadísticamente significativas de -36% y - 28 % respectivamente, entre NUC050 y NUC049 (p=0.0088, p=0.0339). (Estos valores reflejan valores promedios normalizados que están debajo de los valores de presangrado (pretratamiento) de 56% y 93% para NUC050 y NUC049 respectivamente. Para el Día 11 los valores promedios normalizados en comparación con los valores de presangrado fueron 54 % (NUC050) vs 82 % (NUC049) para el Día 19). Los valores promedios para todos los días de sangrado para NUC050 fueron considerablemente inferiores que todos los valores de NUC049 correspondientes, pero alcanzaron significación estadística en los Días 11 y 19. Ver la Figura 1.

Ejemplo 2: Inhibición terapéutica de la expresión *in vivo* del gen de sAg por inyección intramuscular.

Los ratones (cepa inmunodeficiente *NOD.CB17-Pkrdc*^{scid}/J) recibieron el plásmido de expresión objetivo (dirigido al hígado por inyección hidrodinámica como se describió en el Ejemplo 1) de sAg de HBV (antígeno de superficie) algunos días antes que se inyectan IM (por vía intramuscular) con 1) vector eiARN que expresa ARNhc anti HBV, 2) vector control negativo, o 3) se deja sin tratamiento después de la inyección inicial del plásmido objetivo. Los vectores eiARN para la inyección IM se formularon con 0.25% bupivacaína. Los niveles de expresión del sAg, producido en el hígado, se supervisaron por ELISA de sAg de muestras de suero durante el curso de aproximadamente 4 semanas.

En este modelo, la expresión de sAg se expresa en un nivel determinado a continuación de la inyección, y después disminuye gradualmente durante varias semanas, si simplemente se deja a su propio curso, como se ve en los ratones que se dejan sin tratar después de la inyección inicial del plásmido objetivo. Por la administración del plásmido eiARN ARNhc anti-sAg, la velocidad de disminución de sAg aumenta en el tiempo con respecto a los ratones no tratados después de la inyección del plásmido de expresión objetivo de HBsAg, o con respecto a los ratones que reciben un plásmido control negativo en lugar de eiARN anti HBV. Un nivel de expresión de sAg inferior total se puede además observar en los grupos de ratones experimental vs. control. La velocidad de éxito y la eficiencia de la transfección del músculo por la inyección se puede demostrar por la cotransfección de un gen reportero (*por ejemplo*, codificando un gen reportero tal como EGFP en los plásmidos eiARN) y supervisando su expresión, ya sea en el músculo entero o secciones de tejidos después de la inyección.

Ejemplo 3: Inhibición profiláctica de la expresión *in vivo*del gen sAg de HBV por inyección intramuscular.

Los ratones (cepa inmunocompetente C57B1/6) recibieron una sola dosis intramuscular del plásmido efector ARNhc de anti HBV, NUC050 o un plásmido control negativo, que se siguió tres días después por inyección hidrodinámica (a través de la vena de la cola) del plásmido de HBsAg objetivo (el mismo plásmido objetivo como en el Exp 1 anteriormente). El plásmido de control usado en este experimento fue el vector comercial pGL2, que no codifica proteína y se usa como un control de plásmido irrelevante con respecto a la actividad de eiARN . Las inyecciones IM se formularon con bupivacaína (0.25 % p/v) con una concentración de ADN de 1.0 mg/ml. 100 ul de la formulación de bupivacaína se administró IM a cada ratón (100ug de ADN).

Los ratones se sangraron para el ensayo ELISA de HBsAg en 3, 6, 9, y 13 días después de la administración hidrodinámica del plásmido objetivo.

Dado que el plásmido objetivo que codifica ARNm de HBsAg y la proteína se reciben con posterioridad al plásmido efector en el modelo profiláctico no es posible obtener un valor de sAg de los "valores iniciales" para estos ratones antes de la administración del fármaco. La inyección hidrodinámica se conoce por producir generalmente niveles robustos pero muy variable de sAg en este tipo de modelo animal. Por lo tanto, el nivel de sAg determinado en cualquier intervalo de tiempo refleja una variación desconocida en el nivel máximo potencialmente de expresión de sAg a partir del plásmido objetivo, así como la variable experimental de interés, que es el efecto de silenciamiento génico del plásmido eiARN. Por esta razón, una comparación de los niveles totales de sAg en los grupos de control y experimental no es concluyente, y se realiza el análisis de la velocidad (también llamado "análisis de pendiente").

La velocidad de disminución de los niveles de sAg entre los días 3 y 13 se aproxima primero ajustando una línea a la curva de los datos, y después comparando las pendientes de esta línea de ajuste óptimo entre los grupos de control y experimental. Los resultados revelaron un aumento en la velocidad de descomposición de sAg mediado por el plásmido eiARN NUC050, con respecto al plásmido control negativo o ratones que recibieron sólo el plásmido objetivo. Las velocidades de disminución oscilan de 1.4 a 1.7 veces mayor para el tratamiento con eiARN en comparación con los ratones control.

Ejemplo 4: Modelo profiláctico usando la cepa inmunodeficiente *NOD.CB17-Pkrdc*^{scid}/J, dosificación múltiple y lectura de luciferasa

En este experimento, usando solamente formulaciones de bupivacaína, de los vectores NUC050 (eiARN contra el sAg de HBV) y el NUC049 (control negativo), se usó un sistema de doble reportero para normalizar para la expresión dirigida al hígado del plásmido objetivo.

El plásmido objetivo contiene dos genes separados que codifican luciferasas de dos organismos diferentes, luciérnaga (FF) y medusas (Renilla o "JF"). Ver WO 04076629A3: Métodos y constructos para la evaluación de los objetivos principales y moléculas efectoras. Debido a que cada uno produce una longitud de onda diferente de luminiscencia tras la hidrólisis del sustrato luciferina, las dos señales se pueden medir en la misma muestra. El ARNm de luciferasa de renilla se modifica como un ARNm de fusión con elementos de secuencia presentes en el genoma del HBV, tales como el ARNm de fusión se vuelve un objetivo para el plásmido eiARN NUC050, y la señal de renilla es una medida del efecto de silenciamiento génico de NUC050. Por lo tanto la actividad de NUC050 resultará en una reducción de la señal de luciferasa de renilla aunque se dirige a secuencias del HBV porque las secuencias del HBV están presentes en el extremo del ARNm de renilla. La señal de luciferasa de FF sirve como un estándar de normalización para corregir la variabilidad total en el plásmido objetivo de entrega/transfección, porque no está sujeta a la modulación negativa por el efector eiARN, sino depende del mismo plásmido para la expresión. Así, tomando la relación, luciferasa JF:FF se normaliza para la expresión del plásmido dirigido al hígado. En los casos donde se observa una luciferasa de FF insuficiente, se puede concluir que el plásmido no se entregó, y por lo tanto la muestra no es válida para el análisis.

En este experimento, se usaron 25 animales para cada grupo de tratamiento. Los niveles de luciferasa de FF se aceptaron para 19/25 animales en el grupo eiARN (NUC050) y para 17/25 animales en el grupo control (NUC049). Un diagrama de caja y bigotes de todos los valores de relación indica un cambio claro para relaciones inferiores renilla:FF en el tratamiento vs. el grupo control como se espera a partir del efecto de silenciamiento del plásmido NUC050.

Debido a que las señales promedio de luciferasa de FF fueron superiores en el grupo NUC050 vs NUC049, los datos se analizaron además comparando las relaciones renilla:FF en los subgrupos de animales con niveles similares de expresión de luciferasa de FF en ambos grupos de tratamiento. En el subgrupo superior o más alto (más de luciferasa de luciérnaga) el cambio de relación pasó de 33.5 para los ratones control NUC049 a 24.8 para los ratones NUC050 (26 %) . Así, existió una reducción del 26 % en la relación de renilla:FF en el subgrupo de animales que expresan la cantidad más alta de la luciferasa de luciérnaga. Existieron un total de 10 ratones en este grupo. El siguiente subgrupo más alto mostró una diferencia de 8 % y pasó de una relación de 30.8 a 28.4. Existieron solamente 5 ratones en este grupo o cubo. El resto de los ratones estuvieron en los grupos que expresan inferior con diferencias menores entre los grupos como se esperaba, pero todavía existió algunas diferencias .. La diferencia total entre los 2 grupos comparando todos los animales fue de 10 %.

Para evaluar la importancia en la reducción de 10-26 % en la relación renilla: FF visto a través de los grupos y subgrupos, comparamos la reducción en la relación con esa en los animales que reciben tanto los plásmidos objetivo como efectores juntos por entrega directa hidrodinámica. La entrega hidrodinámica directa de tanto los plásmidos objetivo como efectores típicamente resultó en un efecto de silenciamiento máximo de 30% en este sistema. Por lo tanto, en comparación con un efecto máximo de 30 %, el 10-26 % observado con este mecanismo de entrega nuevo parece muy significativo y sugiere que estos experimentos pueden servir como una base para métodos y composiciones nuevas para eiARN y ARNip/ARNhc mediado por el silenciamiento génico a través de la entrega en el músculo.

Ejemplo 5: Entrega por electroporación.*in vivo* del modelo eiARN:doble luciferasa

Para probar si la electroporación *in vivo* sería una forma eficaz para entregar eiARN en las células del músculo esquelético, los ratones se anestesiaron primero, entregaron la inyección IM y colocaron los electrodos en los músculos y se entregan los pulsos. Más específicamente, hembras C57B1/6 recibieron una inyección intramuscular (IM) en el músculo de la tibia de una pata de cualquier formulación NUC 050 (sustancia fármaco) o NUC 049 (control negativo) en un volumen de 25ul, concentración de 2.0 mg/ml. Se usó una sonda de 3 puntas de Advisys, The Woodlands, Texas, y se colocó en el músculo de la tibia de la pata del ratón. Se administraron dos pulsos de electricidad (ver detalles en la tabla más abajo).

Tabla 1 Ajustes del electroporador

Pulso en la Secuencia :	1	2
Tiempo (s) de espera previo :	4	1
Ancho del pulso (ms):	52	52
Corriente del pulso (A):	0.1	0.1

Seis días después de la dosificación, a todos los ratones se les administró una inyección hidrodinámica, o "desafío" de 1 ug del plásmido de expresión (NUC 060, plásmido de fusión doble luciferasa de HBV).

Cinco días después de la inyección hidrodinámica, todos los ratones se sacrificaron y sus hígados se disecaron, congelaron, y almacenaron a - 70C Los hígados se homogeneizaron con un homogeneizador mecánico en un tampón de lisis celular, centrifugaron, y el sobrenadante se eliminó para el análisis. Las muestras de sobrenadante de todos los hígados se ensayaron para la presencia de proteínas de luciferasa tanto de Renilla como luciérnaga. La relación de luciferasa de Renilla:luciérnaga (RLU) representa un perfil de expresión normalizado y sirve como medida de la salida del ensayo. El promedio de la relación de luciferasa de Renilla:luciérnaga del grupo NUC 050 se compara con la relación promedio del grupo NUC 049. Esta diferencia se representa como un valor neto de la relación y una diferencia de porcentaje.

$$\%\ \text{de Diferencia} = \frac{\text{Promedio de NUC 050} - \text{Promedio de NUC 049}}{\text{Promedio de NUC 049}} \times 100\%$$

La diferencia de los dos promedios se prueba para la significación estadística usando una prueba no paramétrica de Wilcoxon de 2 muestras para un valor de p menos de 0.05.

Los resultados indican una reducción del 35 % en el ARNm de fusión de Renilla con respecto al ARNm de luciérnaga en el grupo de NUC050 (Ver las Figuras 2 y 3 y las Tablas 2 y 3). Con respecto a los resultados obtenidos con la inyección IM (sin electroporación) de NUC050, estos resultados son consistentes con la mejor transfección del músculo cuando se usa la electroporación como medio para transfectar el músculo con los vectores eiARN. Esto es consistente además con una velocidad de entrega al hígado de los ARNip o ARNhc a hepatocitos aproximando y quizás excediendo lo que típicamente se logra por inyección hidrodinámica cuando el eiARN se inyecta hidrodinámicamente primero y después el desafío con el vector doble de luciferasa se recibe más tarde por inyección hidrodinámica (HDI). Estimamos basado en estos datos que aproximadamente 40%-60% de los hepatocitos probablemente tomaron una o más ARNhc codificados por NUC050. Esto se debe a que cada inyección hidráulica típicamente transfecta aproximadamente 40-60% de los hepatocitos. La transfección de hepatocitos a continuación de la HDI es aleatoria y la segunda HDI llegaría aproximadamente 40-60 % de las células que se transfectaron por la primera HDI

Tabla 2

Valores individuales de ratón (relaciones)

#	300-1 Nuc050	300-2 Nuc049
1	16.8	19.3
2	17.7	22.4
3	18.6	25.4
4	18.7	26.0
5	20.0	26.1
6	20.6	30.8
7	21.4	32.9
8	21.8	34.9
9	23.2	36.6
10	23.3	39.7
11	23.5	42.1
12	23.7	44.0
13	27.4	44.9
Promedio	21.3	32.7
SD	2.97	8.49

Tabla 3

Análisis adicional		
	Nuc050	***Nuc049***
Promedio	**21.28**	**32.69**
Error Estándar	0.82	2.35
Promedio	**21.43**	**32.90**
Modo	#N/A	#N/A
Desviación Estándar	2.97	8.49
Varianza de la muestra	8.84	72.01
Curtosis	-0.09	-1.30
Asimetría	0.34	0.00
Intervalo	10.62	25.60
Mínimo	16.78	19.30
Máximo	27.40	44.90
Suma	276.70	425.01
Conteo	13	13

Ejemplo 6. Entrega por electroporación *In vivo* de eiARN contra el antígeno de superficie de HBV

En este experimento, los ratones inmunocompetentes C57B16 se electroporaron por vía intramuscular con el eiARN anti-HBV (NUC050) o con un eiARN irrelevante (NUC049). A continuación de la electroporación, los ARNhc codificados por los vectores eiARN se transcriben a altos niveles de copia en el músculo electroporado (2,000,000,000 de copias de ARNhc individuales detectados por QRT-PCR en el pedazo del músculo electroporado). Siete días posterior a la electroporación intramuscular (IM-EP), grupos de ratones se desafiaron por inyección hidrodinámica con tres dosis diferentes de NUC054, un vector de expresión de HBV que codifica HBsAg. Las dosis fueron de 10 ug, 5.0 ug y 2.0 ug de NUC054. Las inyecciones hidrodinámicas además todas contuvieron cantidades idénticas de un vector de expresión hAAT como un marcador para la HDI exitosa, *es decir*, valores de hAAT en el suero son un marcador sustituto de la cantidad de transfección de NUC054 ya que ambos plásmidos se co-administraron. La cantidad total de ADN se mantuvo constante en cada inyección a través de la inclusión de un plásmido rellenador inerte, pGL2-básico

Dos días, siete días y 16 días a continuación del desafío con NUC054, se recogió la sangre de los ratones para la medición de HBsAg. Si IM-PE de NUC050 específicamente es capaz de regular negativamente el HBsAg en el suero (en comparación con el control NUC049), después el músculo transfectado debe ser capaz de pasar las moléculas de plásmido especificadas tales como ARNhc/ARNip producidos en el músculo a los hepatocitos donde se produce el iARN del ARNm objetivo de HBV. Esto es porque NUC054 que codifica el ARNm del HBV se expresa en los hepatocitos específicamente a continuación de la HID de NUC054 y debe ocurrir en los hepatocitos si se produce la regulación negativa. El HBsAg se elabora en los hepatocitos y se secreta en el suero donde se puede medir. Como se discute además más abajo, los resultados indican que NUC050 específicamente, y con significación estadística regula negativamente la expresión de HBsAg en los ratones que recibieron NUC050 a través de electroporación intramuscular.

Análisis Estadístico

Las concentraciones del antígeno de superficie en el suero (sAg) 2 días posterior al desafío de los ratones que recibieron tratamiento con el plásmido NUC050 y 2, 5 o 10 ug del plásmido sAg (NUC054) inyectado hidrodinámicamente se compararon con el grupo sAg compuesto de concentraciones de sAg en el suero en el mismo día que los ratones recibieron el plásmido NUC049 del tratamiento control y ya sea 2, 5 o 10 ug de NUC054 inyectado hidrodinámicamente usando una aplicación de la prueba unilateral de Wilcoxon de dos muestras proporcionada por el Dr. Sam Litwin. El tratamiento con NUC050 resultó en valores inferiores de sAg en el suero estadísticamente significativo en comparación con aquellos del grupo control (p=0.005).

El análisis anterior se realizó para los datos obtenidos 7 días después del desafío y el tratamiento con NUC050 resultó en valores de sAg en el suero inferiores, estadísticamente significativo cuando se comparó con el grupo control (p=0.002)

Los valores de hAAT en el suero a partir de ratones que recibieron tratamiento con NUC050 y 2, 5 o 10 ug de plásmido sAg inyectado hidrodinámicamente fueron coincidentes con los valores de hAAT de ratones que recibieron el tratamiento control con NUC049 y 2, 5 o 10 ug de plásmido NUC054 inyectado hidrodinámicamente . Los valores de hAAT en el suero son un marcador sustituto de la cantidad de transfección de NUC054 ya que ambos plásmidos se co-administraron. Los datos de las parejas de animales no coincidentes no se usó. El día 2 las concentraciones de sAg de ratones que recibieron tratamiento con el plásmido NUC050 se compararon con el grupo coincidente compuesto de concentraciones de sAg en el mismo día de los ratones que recibieron el plásmido NUC049 del tratamiento control usando una aplicación de la prueba unilateral de Wilcoxon de muestras pareadas proporcionada por el Dr. Sam Litwin. Los resultados de la prueba mostraron que el tratamiento con NUC050 resultó en concentraciones de sAg inferiores estadísticamente significativo en comparación con el grupo control (p= 0.011).

Los valores hAAT en el suero de ratones que recibieron el tratamiento con NUC050 y 10 ug del plásmido sAg inyectado hidrodinámicamente fueron coincidentes con los valores hAAT de los ratones que recibieron el tratamiento control con NUC049 y 10 ug de plásmido NUC054 inyectado hidrodinámicamente. Los valores de hAAT en el suero son un marcador sustituto de la cantidad de transfección de sAg ya que ambos plásmidos se co-administraron. Los datos de las parejas de animales no coincidentes no se usó. Las concentraciones de sAg en el día 2 de ratones que recibieron tratamiento con el plásmido NUC050 se compararon con el grupo coincidente compuesto de concentraciones de sAg en el mismo día que los ratones recibieron el plásmido NUC049 del tratamiento de control usando una aplicación de la prueba unilateral de Wilcoxon de muestras pareadas proporcionada por el Dr. Sam Litwin. Los resultados de la prueba mostraron que el tratamiento con NUC050 resultó en concentraciones de sAg que fueron estadísticamente significativo (p=0.009) menos que aquellos del grupo de plásmido control NUC049. Ver la Tabla 4.

Tabla 4.

Muestra	Prueba	valor-p
Datos combinados día 2	Wilcoxon 2 muestra	0.005
Datos combinados día 7	Wilcoxon 2 muestra	0.002
Datos coincidentes combinados día 2	Wilcoxon pareado	0.011
Datos coincidentes 10-ug día 2	Wilcoxon pareado	0.009

Ejemplo 7. Cuantificación de ARNip expresado en el músculo

El propósito de este experimento fue medir la cantidad de ARNip expresado en el músculo a partir de plásmido eiARN a continuación de la electroporación intramuscular. Para nuestra hipótesis de célula del músculo transfectado para actuar como un depósito para entregar ARNip/ARNhc o ADN a los sitios distales, el músculo primero se debe transfectar. Si el músculo está secretando o exportando vesículas que contienen ARNip/ARNhc, entonces mientras más moléculas de estas se expresen, más ARNip/ARNhc serán enviados hacia fuera de la célula, y se espera una entrega superior a los sitios distales.

En este experimento, los ratones se electroporaron por vía intramuscular con NUC050. NUC050 expresa cuatro ARNhc específicos a HBV que se procesan en los ARNip. Para este experimento, sólo se midió uno de los ARNip codificados. A continuación de la electroporación, el área del músculo electroporado se recogió y congeló rápidamente. El ARN posteriormente se extrajo y uno de los ARNip expresados a partir de NUC050, si1737, se midió por QRT-PCR.

El QRT-PCR para la detección de los ARNip expresados dirigidos a HBV que incluyen si1737, si1907 y si2791 se realizó utilizando el protocolo descrito por Caifu Chen, y otros en (Chen Caifu/ABI Method: Nucleic Acid Research, 2005, 33(20):e179). Si1737 sirvió como un ejemplo del protocolo. El procedimiento involucra una reacción de transcripción inversa para generar ADNc a partir del ARNip. Esto se realiza principalmente por el uso de un iniciador de lazo, que coincide con 8 nucleótidos de la secuencia de ARNip de 1737. (Fig. 4) Este protocolo utiliza un iniciador tallo-lazo para generar el ADNc para el PCR a partir del ARNip expresado. Este método se mostró para proporcionar mejor especificidad de RT y eficiencia que los iniciadores lineales debido al apilamiento de bases del tallo del iniciador, lo que mejora la estabilidad térmica del heterodúplex ARN-ADN resultante. La restricción espacial del iniciador lazo mejora además la especificidad del ensayo en comparación con los iniciadores lineales como se muestra por Chen.

El ARN para las reacciones se recogió por el protocolo de Invitrogen Trizol (catálogo #15596-026). El ARN se extrajo en Trizol a partir de tejido del músculo usando homogeneización. La reacción RT se realizó en un volumen de reacción de 15ul con las concentraciones finales de 10 mM $MgCl_2$, 1x tampón PCR GeneAmp (Applied Biosystems catálogo # N808 -0010), 50 nM iniciador lazo, 0.26mM dNTP, 3.33 U/µl MultiScribe transcriptasa inversa (Applied Biosystems catálogo # 4319983), 0.26 U/µl inhibidor de ribonucleasa GeneAmp (Applied Biosystems catálogo # N808 - 0119). Las reacciones se incubaron en un Reciclador Térmico MJ Research PTC - 200 Peltier durante 30 min a 16 °C , 30 min a 42 °C y 5 min a 85 °C. El ADNc se añadió después a la reacción Q-PCR con una concentración superior del iniciador directo. El exceso de iniciador directo preferentemente se une y genera más ADNc antisentido. La sonda FAM para Q-PCR une después el ADNc antisentido junto con el iniciador inverso, empezando así, la detección de Q-PCR. La reacción Q-PCR se realizó en 20µl de volumen de reacción con 2µl de producto de RT de entrada, y concentraciones finales de la Mezcla maestra 1 x Taqman Universal Amperase UNG (Applied Biosystems catálogo # 4324018), 1500 nM iniciador directo, 750 nM iniciador inverso, 200 nM sonda FAM . Las reacciones se ejecutaron en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7300 durante 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 min usando un detector FAM. Las secuencias de iniciadores y sonda fueron como sigue:

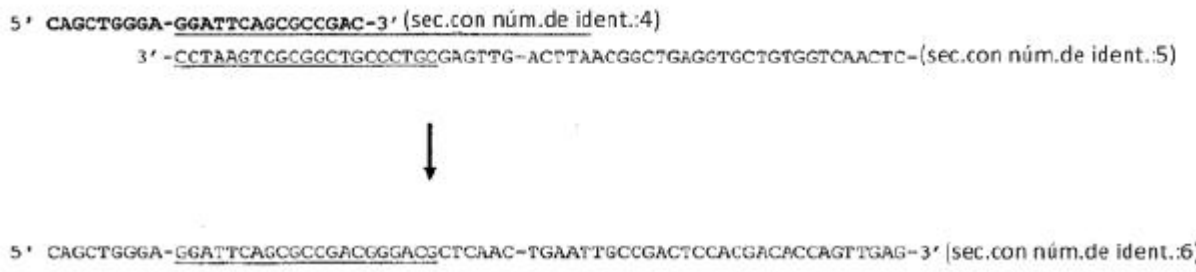
Las secuencias de si1737 (hebras subrayadas) y su iniciador lazo se enumeran más abajo:

5'-GGAUUCAGCGCCGACGGGACG-3' (sec. con núm. de ident.: 1)
3'-TGCCCTGCGAGTTG-ACTTAACGGCTGAGGTGCTGTGGTCAACTC-5' (sec. con núm. de ident.: 2)

Después de la reacción RT, un ADNc se sintetizará como sigue :

3'-CCTAAGTCGCGGCTGCCCTGCGAGTTG-ACTTAACGGCTGAGGTGCTGTGGTCAACTC-5' (sec. con núm. de ident.: 3)

En la reacción Q-PCR, la concentración superior del iniciador directo (hebra rosada) preferentemente elabora más ADNc antisentido (la hebra azul):



El ADNc antisentido se podrá usar para la unión de la sonda y iniciador inverso:

5' CAGCTGGGA-GGATTCAGCGCCGAC-3' (sec. con núm. de ident.: 7)
5'CAGCTGGGA-GGATTCAGCGCCGACGGGACGCTCAAC-TGAATTGCCGACTCCACGACACCAGTTGAG-3' (sec. con núm. de ident.: 8)
Q-TGCCCTGCGAGTTG-ACTT-Fam (sec. con núm. de ident.: 9)
3'-CTGAGGTGCTGTGGTCAACT-5' (sec. con núm. de ident.: 10)

Si1737 químicamente sintetizado por IDT, Ames Iowa se usó para generar una curva estándar y para usar en el recobrado pico.

Cuatro músculos electroporados a partir del estudio con ND311 que se inyectaron con NUC050 y APL050 mostraron niveles de expresión de si1737 entre 8.0 e+006 a 22 e+009 de los ARNip. Los músculos electroporados inyectados con el vector de expresión sAg solo, APL050, no produjeron ninguna detección del ARNip según predijimos. El músculo virgen fue negativo además para la expresión de ARNip según predijimos. Para los resultados, ver Tabla 5 más abajo.

Tabla 5

Nombre de la muestra	Detector	Tarea	Ct	Cantidad
6.00E+08	1737	Estándar	12.93	6.00E+08
6.00E+07	1737	Estándar	15.55	6.00E+07
6.00E+06	1737	Estándar	19.52	6.00E+06
6.00E+05	1737	Estándar	22.51	6.00E+05
6.00E+04	1737	Estándar	26.05	6.00E+04
músculo ND311 APL050 1A	1737	Desconocido	sin determinar	
músculo ND311 APL050 1B	1737	Desconocido	sin determinar	
músculo ND311 APL050 1C	1737	Desconocido	sin determinar	
músculo ND311 APL050 1D	1737	Desconocido	sin determinar	
músculo ND311 ALP050+Nuc050 2A	1737	Desconocido	19.04	7.24E+06
músculo ND311 ALP050+Nuc050 2B	1737	Desconocido	19.88	4.04E+06
músculo ND311 ALP050+Nuc050 2C	1737	Desconocido	14.95	1.24E+08
músculo ND311 ALP050+Nuc050 2D	1737	Desconocido	15.97	6.10E+07
músculo virgen	1737	Desconocido	sin determinar	
Control negativo H2O	1737	Desconocido	sin determinar	
Control negativo H2O	1737	Desconocido	sin determinar	
Nota 1. El ARN extraído del músculo se resuspendió en un volumen total de 12 ul. 5 ul de este				

Nombre de la muestra	Detector	Tarea	Ct	Cantidad
extracto se añadió a la reacción inicial RT cuyo volumen total fue 15 ul. 2u/l/15ul de la reacción RT se usó para una reacción de PCR. Esto significa que los valores de PCR para el número de copias de ARNip se multiplicaron por 18 para obtener el número de copias de si1737 en los extractos de músculo. Por ejemplo, los resultados que se obtienen y muestran como datos en la tabla anterior se multiplicaron por 18 para obtener el número total de copias de si1737 en la muestra extraída de músculo.				

Ejemplo 8. Micrografías electrónicas de protuberancias de músculo

Las fotos publicadas de protuberancias de músculo inmunológicamente teñidas por galectina-B (Fig. 5, paneles B, C y D) se compararon con una foto vencida en el tiempo por los presentes inventores de unas protuberancias secretoras de mioblastos (panel A). Antes de hacer la foto, las células L6 (que contienen mioblastos en cultivo que se diferenciaron en miotubos) se transfectaron con un plásmido de expresión EGFP para ver si podíamos ver las protuberancias y de ser así, si contienen EGFP. De ser así, esto indica que las protuberancias empacan el contenido citosólico en su interior. La imagen de la Figura 5, panel A muestra mioblastos transfectados con estructuras similares a protuberancias que son fluorescentes.

Ejemplo 9. Inhibición profiláctica de la expresión *in vivo* del gen de sAg de HBV por inyección intramuscular

Este ejemplo muestra esa inyección subcutánea de un plásmido eiARN que expresa los ARNip específicos de la Hepatitis B que causan la regulación negativa distal de los ARNm que contienen secuencias objetivo de la Hepatitis B en los hepatocitos del hígado. Los resultados de los datos podrían indicar que la inyección subcutánea de las moléculas de eiARN/moléculas de ARNip y probablemente la inyección intradérmica así puede mediar la regulación negativa del gen(es) en los hepatocitos, sin limitarse al gen de sAg de HBV ejemplificados aquí. Las moléculas transferidas a los sitios distales podrían ser ARNip/ARNhc, el ADN plásmido eiARN o el Complejo de silenciamiento inducido por ARN cargado con ARN. Cualquier ARNip/ARNhc y/o ADN se podría predecir por lo tanto para transferir. Aunque este modelo es profiláctico, ya que estos resultados muestran que el agente activo se transfiere a los hepatocitos, una inyección subcutánea terapéutica se predice además que funcione.

Fondo experimental

En el modelo profiláctico, la molécula fármaco (plásmido que expresa la molécula de silenciamiento ARNhc) se administra antes de que se administre la molécula objetivo (plásmido que expresa un ARN que se silencia).

En todos los experimentos "NUC050" se refiere a un vector de expresión de plásmido eiARN que expresa cuatro ARNbc de horquilla cortos diferentes (los ARNhc) específicos a HBV (ver *por ejemplo,* WO 2006/033756, plásmido pHB4, Figura 9) que media el silenciamiento de un vector de fusión HBV-Luciferasa, "NUC060", *por ejemplo*, como se describe en WO 04076629/US 2006/0263764. "NUC049" es un plásmido eiARN control negativo (que expresa una versión mutada de un ARNhc único derivado de NUC050).

El plásmido objetivo contiene dos genes separados que codifican luciferasas a partir de dos organismos diferentes, Luciérnaga (FF) y medusa (Renilla o "JF"). Ver WO 04076629: Métodos y constructos para la evaluación de los objetivos de iARN y moléculas efectoras. Debido a que cada uno produce una longitud de onda diferente de luminiscencia tras la hidrólisis del sustrato luciferina, las dos señales se pueden medir en la misma muestra. El ARNm de luciferasa de Renilla se modifica como un ARNm de fusión con elementos de secuencia presentes en el genoma del HBV, tal que el ARNm de fusión se vuelve un objetivo para el plásmido eiARN NUC050, y la señal de Renilla es una medida del efecto de silenciamiento génico de NUC050. La actividad de NUC050 por lo tanto resultará en una reducción de la señal de luciferasa de Renilla aunque se dirige a secuencias del HBV porque las secuencias de HBV están presentes en el extremo del ARNm de Renilla. La señal de luciferasa de FF sirve como un estándar de normalización para corregir la variabilidad total en el plásmido objetivo de entrega/transfección, porque no está sujeta a la modulación negativa por el efector eiARN, sino depende del mismo plásmido para la expresión. Así, tomando la relación, luciferasa JF:FF se normaliza para la expresión del plásmido dirigido al hígado. En los casos donde se observa una luciferasa de FF insuficiente, se puede concluir que el plásmido no se entregó, y por lo tanto la muestra no es válida para el análisis.

Administración subcutánea in vivo del modelo eiARN:doble luciferasa

Ratones hembras C57B1/6 recibieron una inyección subcutánea (SC) de ya sea formulación de NUC 050 (sustancia fármaco eiARN) o NUC 049 (sustancia control negativo eiARN) en un volumen de 200 µl, concentración de 1.5 mg/ml. Las formulaciones consisten de ADN en una solución salina isotónica. Seis días después de la dosificación, todos los ratones se les administró la inyección hidrodinámica (HDI), o "desafío" de 1 ug del plásmido de expresión (NUC 060,

plásmido de fusión luciferasa doble de HBV). HDI es un mecanismo que permite la transfección selectiva de los hepatocitos del hígado.

Cinco días después de la inyección hidrodinámica (día 11), todos los ratones se sacrificaron y sus hígados se disecaron, congelaron, y almacenaron a -70C. Los hígados se homogeneizaron con un homogeneizador mecánico en un tampón de lisis celular, centrifugaron, y el sobrenadante se eliminó para el análisis. Las muestras de sobrenadante de todos los hígados se ensayaron para la presencia tanto de proteínas de luciferasa de Renilla como luciérnaga. La relación de luciferasa de Renilla:Luciérnaga (RLU) representa un perfil de expresión normalizado y sirve para medir la salida del ensayo. El promedio de la relación de luciferasa de Renilla:Luciérnaga del grupo NUC 050 se compara con la relación promedio del grupo NUC 049. Esta diferencia se representa como un valor neto de la relación y una diferencia de porcentaje.

$$\text{\% de Diferencia} = \frac{\text{Promedio de NUC 050} - \text{Promedio de NUC 049}}{\text{Promedio de NUC 049}} \times 100\%$$

La diferencia de los dos promedios se prueba para la significación estadística usando una prueba no paramétrica de Wilcoxon de 2 muestras para un valor de p menos de 0.05.

En este experimento, se usaron 15 animales para cada grupo de tratamiento. Los niveles de luciferasa de FF fueron aceptables para 8/15 animales tanto en el grupo eiARN (NUC050) como el grupo de control (NUC049). Una gráfica de caja y bigotes de las relaciones de actividad de Renilla:FF en las células del hígado muestra una disminución clara y estadísticamente significativa del objetivo ARNm de fusión de HBV-luciferasa de Renilla en el tratamiento vs. el grupo de control. Los niveles promedios del ARNm objetivo se reducen por 16.7 % en el grupo de tratamiento (ver las Figuras 8 y 9 , Tablas 6 y 7) & 7).

El silenciamiento observado del ARNm objetivo indica ya sea que el ADN plasmídico, el eiARN expresado y/o sus productos procesados (es decir, el ARNip ds o complejo de silenciamiento inducido por ARN cargado con ARN) se transportaron del sitio de la inyección subcutánea a los hepatocitos en el hígado. Este transporte se puede mediar por las células en el sitio de la inyección. A pesar del mecanismo involucrado sin embargo, estos resultados muestran que la inyección subcutánea de un eiARN que expresa un plásmido puede reducir los niveles de ARNm objetivo en un sitio distal, en este caso hepatocitos del hígado.

Tabla 6
Valores indoviduales de ratón relaciones

	360-1 (Nuc050)	360-2 (Nuc049)
1	12.0	12.3
2	12.2	14.4
3	12.3	17.6
4	13.3	17.7
5	16.1	18.2
6	16.9	18.3
7	17.2	21.8
8	18.5	22.1
Promedio	14.8	17.8
SD	2.6	3.3

Tabla 7

Análisis adicional		
	360-1 (Nuc050)	***360-2 (Nuc049)***
Promedio	**14.81**	**17.79**

Análisis adicional		
Error Estándar	0.93	1.17
Promedio	**14.68**	**17.94**
Modo	#N/A	#N/A
Estándar		
Desviación	2.62	3.30
Varianza de la muestra	6.88	10.88
Curtosis	-2.10	-0.18
Asimetría	0.17	-0.34
Intervalo	6.47	9.78
Mínimo	12.03	12.28
Máximo	18.50	22.06
Suma	118.47	142.30
Promedio	**14.81**	**17.79**
Conteo	8	8

Ejemplo 10: Inhibición terapéutica de la expresión *in vivo* del gen de sAg de HBV por transferencia adoptiva subcutánea de células transfectadas NUC050.

El vector NUC050 codifica cuatro moléculas diferentes de ARNhc que se dirigen a porciones diversas del genoma de la hepatitis B para la degradación a través del mecanismo del iARN celular. Tres de estas se dirigen a las regiones de HBsAg contenidas en el vector objetivo preadministrado a los ratones.

En el modelo terapéutico, los animales reciben el objetivo ARN exógeno en la forma de un plásmido que expresa la secuencia codificante del antígeno de superficie del HBV a través de inyección hidrodinámica en la vena de cola. La inyección hidrodinámica es un método que usa un volumen grande con tiempo de inyección rápido para preferentemente dirigir el plásmido de ADN al hígado donde se expresa.

Para obtener ratones que expresan un gen objetivo en el hígado, el ADNc de HBsAg (antígeno de superficie) se colocó bajo el control de un promotor específico de hígado en un vector plasmídico disponible en el comercio (pLIVE). En el Día -7, este vector se inyectó hidrodinámicamente en una cepa de ratones inmunodeficientes (*NOD.CB17-Pkrdc*^{scid}/J). De este modo, el ADN se localiza en gran medida en los hepatocitos del hígado y el promotor específico a tejido restringe además la expresión del ARNm de sAg a estas células. Dado que los ratones son inmunodeficientes, son capaces de expresar el gen objetivo durante largos períodos de tiempo (más de un mes) porque no se realizará respuesta inmune a la proteína foránea codificada por el gen objetivo.

Cuatro días a continuación de la administración del plásmido objetivo (Día -3), los ratones se sangraron para determinar los niveles de HBsAg circulante en el suero. En el Día 0, los ratones se inyectaron por vía subcutánea con una suspensión de células RD (rabdomiosarcoma) (RD; ATCC CCL-135) que se había transfectado con NUC050 dentro de un volumen total de 0.2-0.4 ml. Un grupo control de ratones se trató con una suspensión de células RD que se había transfectado con el plásmido NUC049 de control negativo.

Las suspensiones celulares NUC050 y NUC049 se prepararon idénticamente como sigue: Brevemente, las células RD se sembraron en frascos T150 (150 cm^2) a una densidad de $5x10^6$ células por frasco e incubaron @ 37°C, 5% CO_2. Un día más tarde se transfectaron ya sea con vectores NUC050 o vector NUC049 control negativo (28ug/frasco, respectivamente) se mezclaron con el reactivo de transfección Fugene Roche ™ 6 (catálogo # 11814443001). Las células fueron más o menos 65% confluente en el momento de transfección. Después de la transfección se añadió la mezcla, las células RD se incubaron durante la noche @ 37°C, 5% CO_2. Al día siguiente, las células se lavaron en Solución Salina Tamponada con Fosfato 1x Dulbecco (DPBS) y el medio se cambió a Medio fresco de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con 10 % SFB. Tres días después de la transfección, las células RD se lavaron en DPBS estéril y se tripsinizaron para liberarlas de la superficie del frasco. Las células se contaron y múltiples alícuotas de $1x10^8$ células se lavaron dos veces en DPBS estéril y sedimentaron por centrifugación. Las células RD se resuspendieron después en 4.5 ml DPBS estéril. Una suspensión celular de 0.2-0.4 ml que contiene aproximadamente 8 x 10^6 células se inyectaron después por vía subcutánea en cada ratón NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/J (NOD/SCID) en el costado derecho, usando una aguja de calibre 23.

Los animales se sangraron de nuevo posteriormente en los Días 6 y 11 después de la administración del vector eiARN, respectivamente y los niveles de HBsAg en suero se determinaron usando un ELISA HBsAg disponible en el comercio (Bio-Rad, Hercules, CA. HBsAg 3.0 EIA catálogo # 32591). Los animales están programados para que se sangren de nuevo en los días 18 y 25 días después de la administración del vector eiARN, así como con la posterior medición del nivel de HBsAg. De 9 a 11 ratones se usaron para cada grupo de tratamiento y los resultados se presentan como porcentaje de HBsAg de los valores iniciales de HBsAg (pre- tratamiento). La capacidad de las células tratadas con el vector NUC050 transferidas adoptivamente para disminuir la expresión de HBsAg se estimó calculando, para cada día de sangrado, un valor de la diferencia normalizada de los niveles promedios de HBsAg para el control menos los grupos experimentales. La normalización se realizó calculando el porcentaje de HBsAg para cada día posterior del sangrado, con respecto a los valores de HBsAg en el pretratamiento.

Los Día 6 y Día 11 muestran los promedios de diferencia de -8 % y -18 % respectivamente, entre NUC050 y NUC049 (Figura 10 y Tabla 8) (Estos valores reflejan valores promedios normalizados que estan debajo de los valores de presangrado (pretratamiento) 124% y 132% para NUC050 y NUC049 respectivamente para el Día 6. Los valores promedios normalizados en comparación con los valores de Presangrado fueron 105% (NUC050) vs. 123% (NUC049) para el Día 11. Basado en esta tendencia y las tendencias de los datos históricos dentro de este modelo animal, anticipamos diferencias crecientes entre los grupos de tratamiento y control en los puntos de tiempo posteriores (Día 18 y Día 25).

Las células transfectadas exógenamente *por ejemplo*. las células del músculo como se describe en la presente se podrían además cultivar y su medio de cultivo usado como una fuente de "protuberancias" que contienen ARN o exovesículas para usar como se describe en otras partes en la presente. Un experto en la técnica reconocerá además que los métodos descritos se pueden utilizar para el trasplante heterólogo o autólogo en un mamífero receptor de células transfectadas exógenamente, tales como células del músculo para usar como una fuente de moléculas efectoras de ARN biológicamente activas entregados a las células distales que incluyen las células del hígado, tales como hepatocitos.

Tabla 8 Niveles normalizados de HBsAg (% del presangrado)

tiempo pt	**Nuc049**	**Nuc050**	**Diferencia**
Día 6	132.2	123.8	**-8.4**
Día 11	123.0	105.4	**-17.6**

Ejemplo 11. Entrega por electroporación in vivo de eiARN contra interleucina- 12 (IL-12) endógena.

En este experimento, ratones BALB/cJ inmunocompetentes se administran un vector eiARN anti-IL-12 o un vector eiARN irrelevante, control negativo a través de inyección intramuscular (IM) de forma concomitante con la electroporación (EP) (IM-EP). El vector plasmídico eiARN anti-IL-12 codifica una molécula de ARNhc conducida por un promotor 7SK, que dirige la subunidad p40 de la secuencia de ARNm de IL-12 de ratón para la degradación a través del mecanismo de iARN celular específico de la secuencia. A continuación de la administración IM-EP, las moléculas de ARNhc codificados por los vectores eiARN se transcriben a altos niveles de copia en el músculo electroporado (2,000,000,000 copias de ARNhc individual detectable por QRT-PCR en el pedazo de músculo electroporado).

Un día, cuatro días, siete días, y 11 días a continuación de la dosificación con los vectores eiARN anti-IL-12 y control, se recoge la sangre de los ratones para la medición de IL-2 usando un ELISA disponible en el comercio (R&D Systems). Si la entrega IM-PE del vector eiARN anti-IL-12 es específicamente capaz de regular negativamente la IL-12 endógena en el suero (en comparación con el vector control), el músculo transfectado después debe ser capaz de pasar las moléculas expresadas de plásmido, tales como ARNhc/ARNip producido en el músculo para al menos algunas de las diversas células inmunes distales (macrófagos, monocitos, células dendríticas y células B) que expresan IL-12 y donde se produce iARN del ARNm objetivo de IL-12. Debido a que la IL-12 se expresa por múltiples tipos de células en todo el cuerpo, la regulación negativa significativa sería muy probable para la entrega sustancial de la señal a múltiples sitios donde residen dichas células. En el presente estudio, esperamos que la inyección intramuscular del vector eiARN anti-IL-12 con la electroporación (IM-EP) en ratones resulte en la regulación negativa sostenida de IL-12 endógena en suero durante todos los intervalos de tiempo. Esperamos que los métodos alternativos de entrega a las células del músculo (*por ejemplo*, entrega vascular con presión aumentada al músculo de la extremidad de mamíferos como se describió en otras partes en la presente) podrían lograr además la regulación negativa de un ácido nucleico objetivo tal como la IL-12 en células no musculares distales, incluyendo las células inmunes.

Aunque en la especificación anterior esta invención se describió en relación con ciertas modalidades preferidas de esta, y muchos detalles se expusieron para propósitos de ilustración, resultará evidente para aquellos con experiencia en la técnica que la invención es susceptible a modalidades adicionales y que ciertos de los detalles descritos en la presente se pueden variar considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico o vector de expresión para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que involucra el hígado o para el tratamiento o prevención de una afección que involucra el hígado mediante la entrega de un ácido nucleico o vector de expresión a una célula del hígado en un animal en donde la entrega comprende:

transfectar al menos una célula de la piel o del músculo en dicho animal con el ácido nucleico o vector de expresión, en donde dicha transfección resulta en que dicho ácido nucleico o vector de expresión se entrega a al menos una célula en el hígado.

2. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha transfección de al menos una célula del músculo o al menos una célula de la piel resulta en dicho ácido nucleico o vector de expresión que se encapsula mediante al menos una exovesícula de la célula del músculo o de la célula de la piel, y en donde al menos una de dicha exovesícula se entrega a al menos una célula en el hígado.

3. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos una de dicha célula del músculo o de la piel se transfecta *ex vivo* con dicho ácido nucleico o vector de expresión, y en donde dicha célula del músculo o de la piel transfectada se introduce en un animal en donde dicha introducción resulta en dicho ácido nucleico o vector de expresión que se entrega a al menos una célula de hígado.

4. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha transfección de al menos una célula del músculo o de al menos una célula de la piel resultando en dicho ácido nucleico o vector de expresión que se encapsula mediante al menos una exovesícula se realiza *in vitro* o *ex vivo*, y en donde al menos una de dicha exovesícula se aísla y administra a un animal tal que dicho ácido nucleico o vector de expresión se entrega a al menos una célula de hígado.

5. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde al menos una célula del músculo o al menos una célula de la piel se selecciona del grupo que consiste de las células en la capa dérmica de la piel, las células en la capa subcutánea de la piel, miocitos, y mioblastos.

6. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde el ácido nucleico es ácido ribonucleico (ARN) o un ARN modificado o el vector de expresión contiene un ácido nucleico que codifica un ARN.

7. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 6 en donde el ARN se selecciona del grupo que consiste de ARN antisentido, ARN micro (miARN), ARN mensajero (ARNm), ARNip, ARNhc, ARN modificado químicamente, ARN de ribozima, ARNbc de horquilla, ARN micro que forma ARN triple, un ligando ARN de alta afinidad seleccionado artificialmente (aptómero) y ARNbc.

8. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en donde una hebra de dicho ARNbc es sustancialmente complementaria a una región de un gen objetivo en el hígado, y en donde la entrega de dicho ARNbc o dicho ácido nucleico que codifica dicho ARNbc a la célula de hígado inhibe o reduce la expresión de dicho gen objetivo.

9. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha región se selecciona del grupo que consiste de una región transcrita del gen objetivo, una región promotora del gen, y una región del gen sin traducir corriente arriba o corriente abajo.

10. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en donde dicho gen objetivo se selecciona del grupo que consiste de un gen patógeno, un gen viral, y un gen endógeno.

11. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho gen viral es un gel viral de la Hepatitis seleccionado del grupo que consiste de Hepatitis A (HAV), Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV), Hepatitis D (HDV) y Hepatitis E (HEV).

12. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho gen endógeno se selecciona del grupo que consiste de un gen de apolipoproteína (APOB), un gen pcsk 9, y un gen A1AT.

13. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en donde el ácido nucleico o vector de expresión se transfecta en las células del músculo o de la piel junto con un agente que facilita la transfección.

14. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 13 en donde el agente que facilita la transfección es bupivacaína o la electroporación.

15. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde dichas células transfectadas expresan un ligando de superficie o transmembrana específico para un receptor en la célula del hígado.

16. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 15, en donde un ácido nucleico que expresa dicho ligando de superficie o transmembrana se co-transfecta con dicho ácido nucleico o vector de expresión.

17. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico es ARNbc que tiene de 15 a 50 pares de bases.

18. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 17 en donde el ARNbc es un ARNhc, miARN o un ARNip.

19. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en donde el animal es un mamífero.

20. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con la reivindicación 19 en donde el mamífero es un humano.

21. El ácido nucleico o vector de expresión para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en donde la enfermedad o afección de o que involucra el hígado es:

(a) una enfermedad viral del hígado;
(b) cáncer del hígado;
(c) una enfermedad genética del hígado;
(d) una afección que se puede modular dirigiendo un ARN o gen en el hígado;o
(e) terapia génica en el hígado donde se sustituye un ARNm funcional.

22. El uso de un ácido nucleico o vector de expresión en la fabricación de un medicamento para entregar un ácido nucleico o vector de expresión a una célula de hígado en un animal en donde la entrega comprende:

transfectar al menos una célula de la piel o del músculo en dicho animal con el ácido nucleico o vector de expresión, en donde dicha transfección resulta en que dicho ácido nucleico o vector de expresión se entrega a al menos una célula en el hígado.

23. El uso del ácido nucleico o vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el ácido nucleico es el ácido ribonucleico (ARN) o un ARN modificado o vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica un ARN.

24. El uso del ácido nucleico o vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el ARN se selecciona del grupo que consiste de ARN antisentido, ARN micro (miARN), ARN mensajero (ARNm), ARNip, ARNhc, ARN modificado químicamente, ARN de ribozima, ARNbc de horquilla, ARN micro que forma ARN triple, un ligando ARN de alta afinidad seleccionado artificialmente (aptómero) y ARNbc.

25. El uso del ácido nucleico o vector de expresión de la reivindicación 23 o 24, en donde una hebra de dicho ARNbc es sustancialmente complementaria a una región del gen objetivo en el hígado, y en donde la entrega de dicho ARNbc o dicho ácido nucleico que codifica dicho ARNbc a la célula del hígado inhibe o reduce la expresión de dicho gen objetivo.

26. Uso de un ácido nucleico o vector de expresión de la reivindicación 25, en donde dicho gen objetivo se selecciona del grupo que consiste de un gen patógeno, un gen viral, y un gen endógeno.

Figura 1

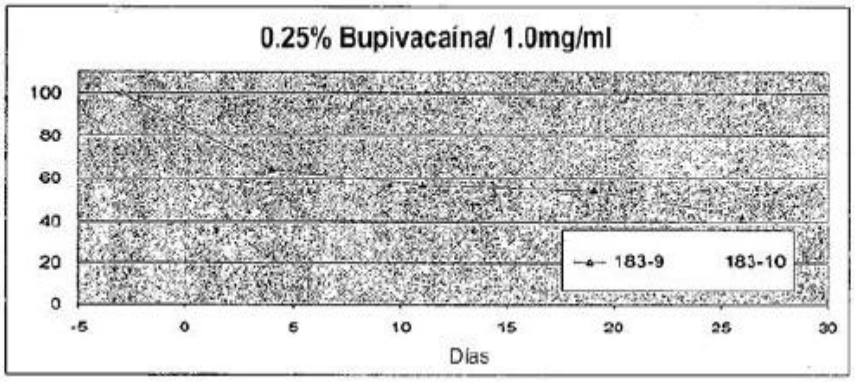
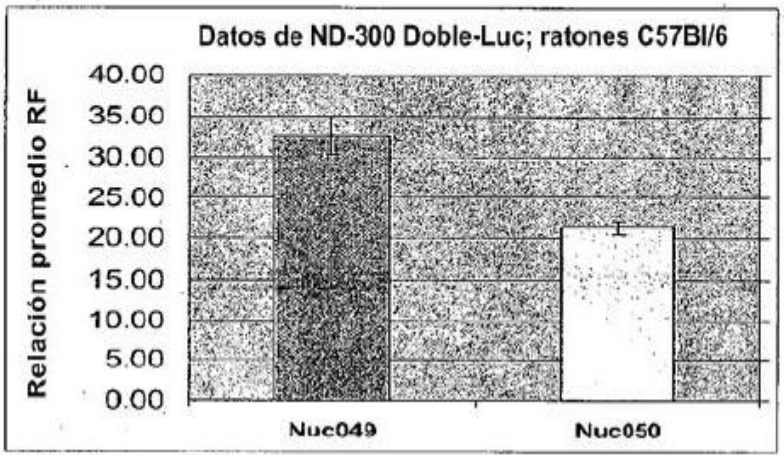


Figura 2

Todos los valores son RLU de Renilla/RLU de Luciérnaga



diferencia	-11.4
% diferencia	-34.9%
valor p	0.0003

Figura 3

Distribución de valores individuales de ratón (relaciones)

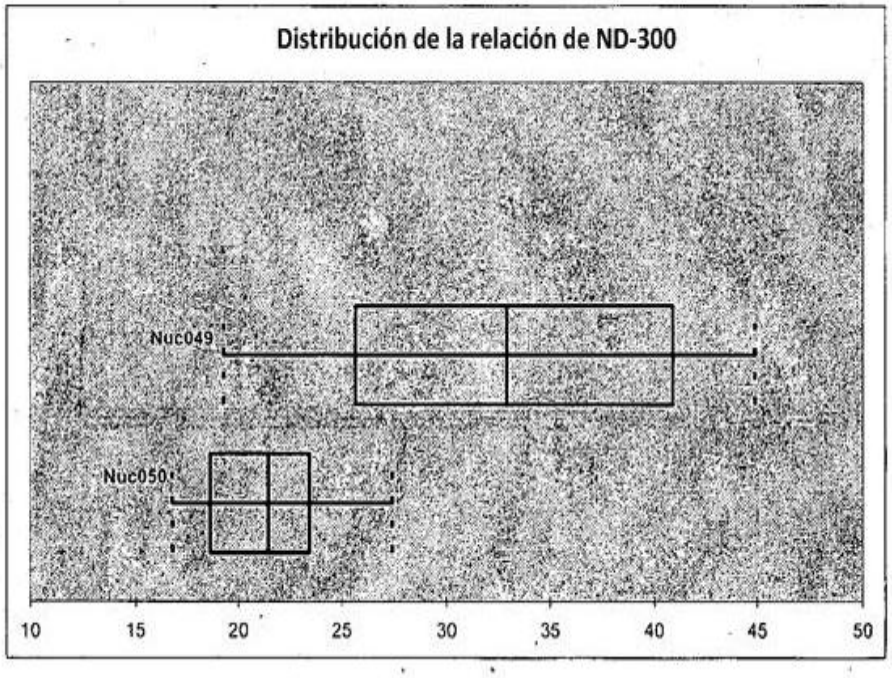


Figura 4

(Chen Caifu/ Método ABI: Nucleic Acid Research, 2005, 33(20):e179)

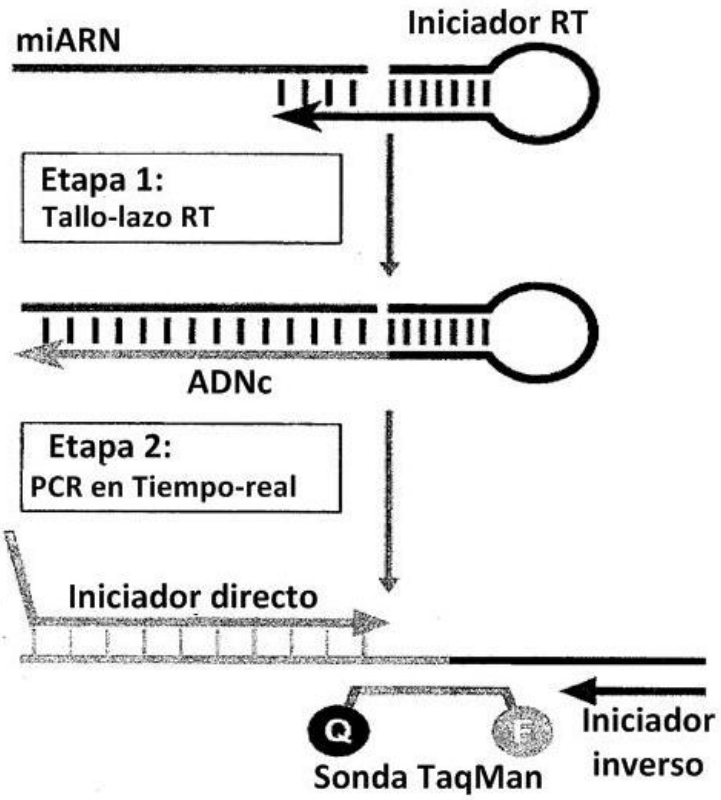


Figura 5

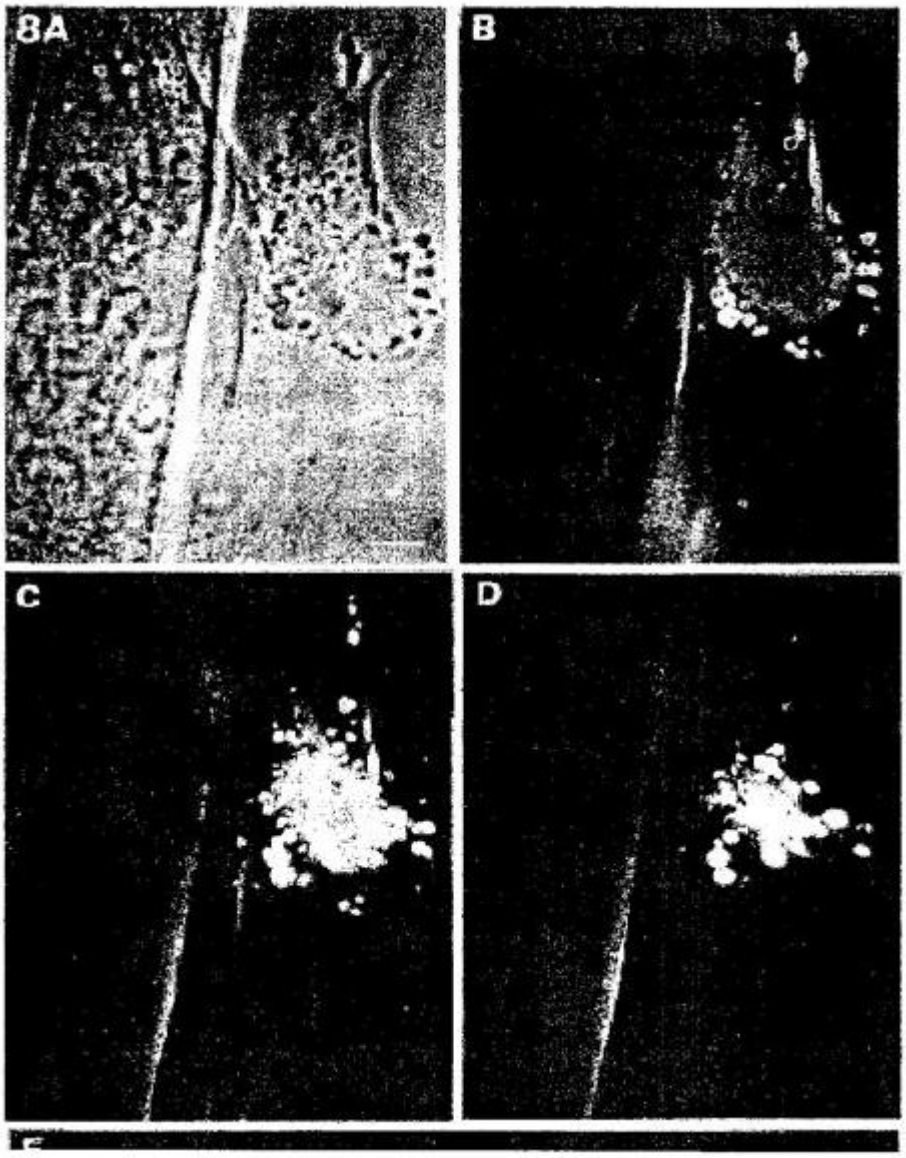


Figura 6

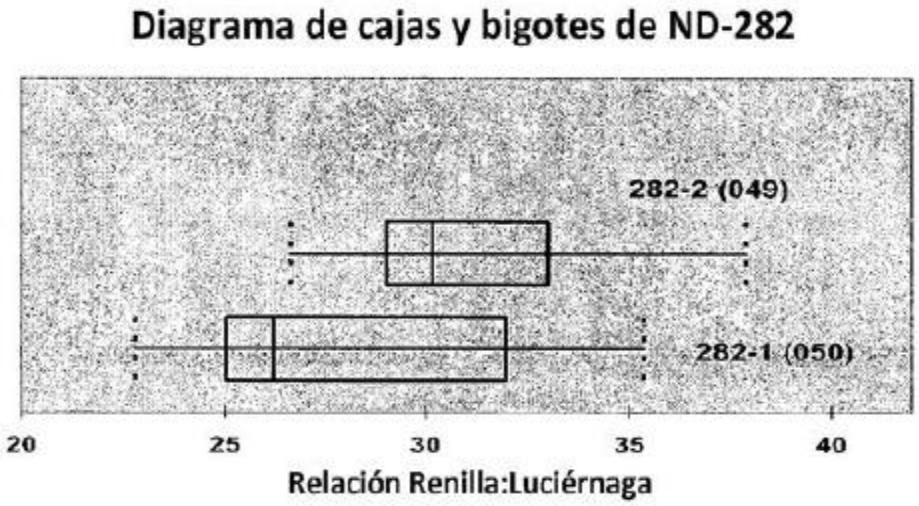
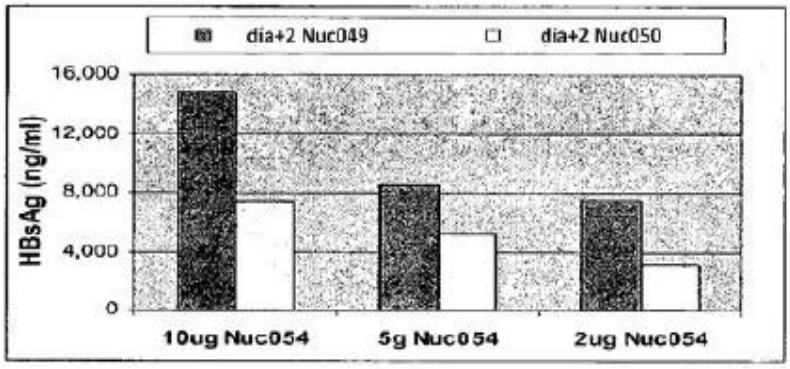


Diagrama de cajas y bigotes de ND-282
282-2 (049)
282-1 (050)
20
25
30
35
40
Relación Renilla:Luciérnaga

Figura 7

A


día+2 Nuc049
día+2 Nuc050
HBsAg (ng/ml)
16,000
12,000
8,000
4,000
0
10ug Nuc054
5g Nuc054
2ug Nuc054

B

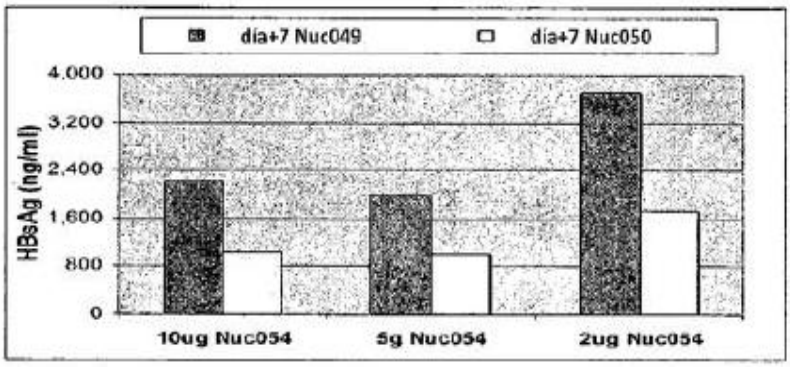

día+7 Nuc049
día+7 Nuc050
HBsAg (ng/ml)
4,000
3,200
2,400
1,600
800
0
10ug Nuc054
5g Nuc054
2ug Nuc054

Figura 7 cont.

C

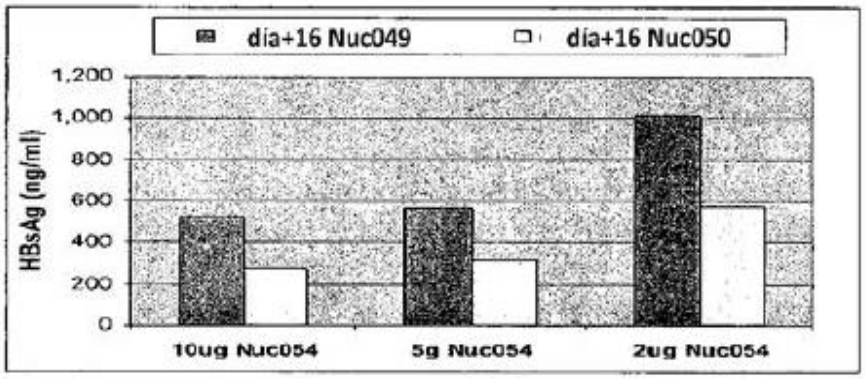
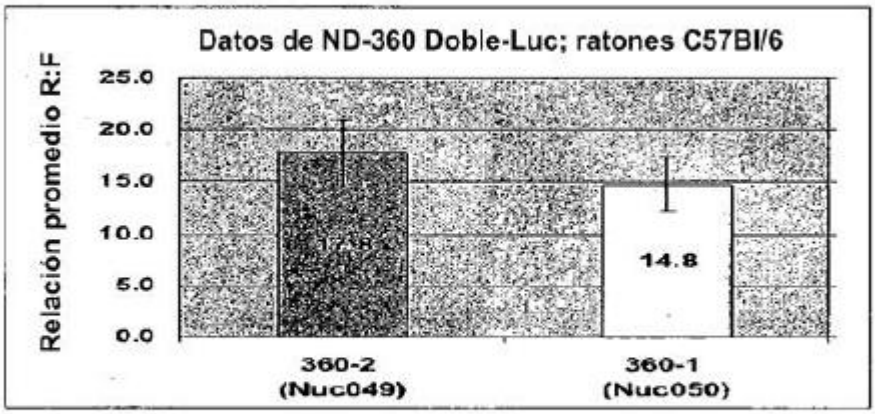


Figura 8

Todos los valores son RLU de Renilla/RLU de Luciérnaga



diferencia	-3.0
% diferencia	-16.7%
valor p	0.023

Figura 9
Distribución de valores individuales de ratón (relaciones)

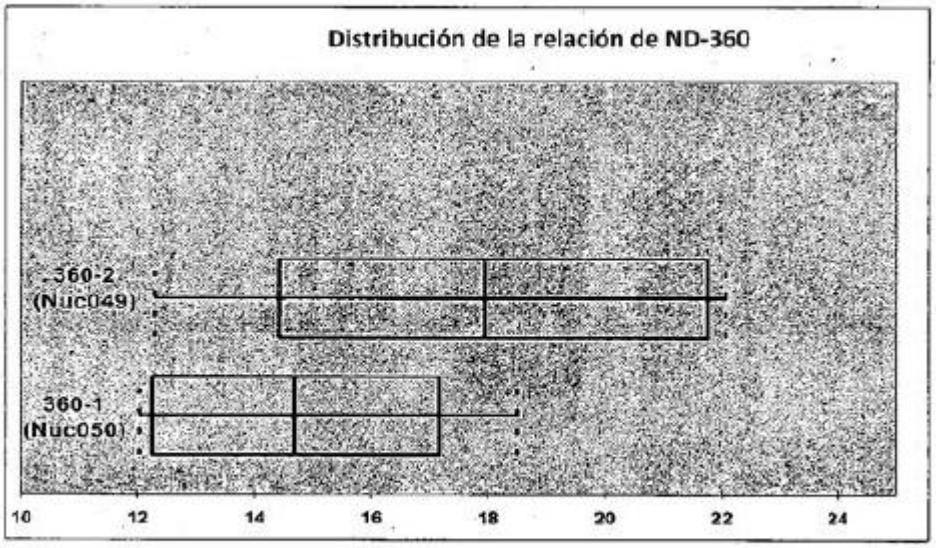
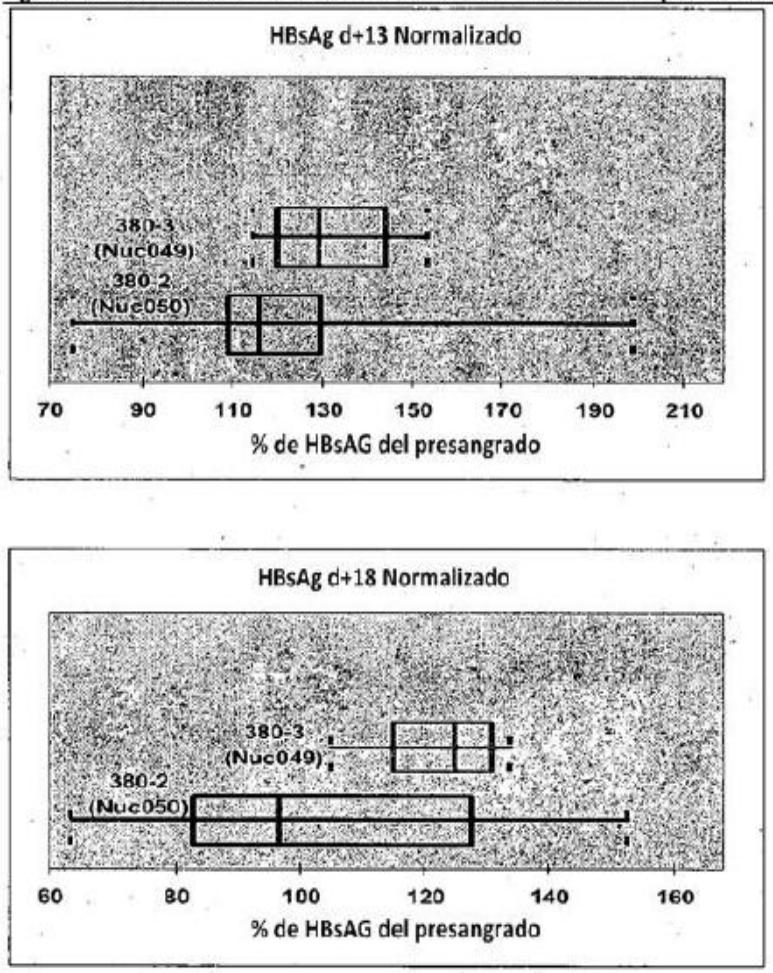



Figura 10. Distribución de niveles individuales de HBsAG de ratón (normalizado)