(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 666 559**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2010 PCT/US2010/058457**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2011 WO11068810**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2010 E 10835016 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2506857**

(54) Título: **Entrega del mrna para la aumentación de proteínas y enzimas en enfermedades genéticas humanas**

(30) Prioridad:

01.12.2009 US 265653 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2018

(73) Titular/es:

TRANSLATE BIO, INC. (100.0%)
200 Sidney Street, Suite 310
Cambridge, MA 02139, US

(72) Inventor/es:

GUILD, BRAYDON, CHARLES;
DEROSA, FRANK;
HEARTLEIN, MICHAEL y
CONCINO, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 666 559 T3

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

Entrega del mrna para la aumentación de proteínas y enzimas en enfermedades genéticas humanas

Descripción

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] Los nuevos enfoques y terapias son todavía necesarias para el tratamiento de deficiencias de proteínas y enzimas, particularmente estrategias y terapias que superan las dificultades y limitaciones asociadas con la administración de ácidos nucleicos y la transfección de células diana. Los enfoques adicionales que modulan o complementan la expresión de una proteína o enzima deficiente y, por lo tanto, mejoran la deficiencia subyacente serían útiles en el desarrollo de terapias apropiadas para trastornos asociados.

[0002] Por ejemplo, los trastornos metabólicos del ciclo de la urea representan deficiencias de proteínas y enzimas para las cuales no existen actualmente curas disponibles. El ciclo de la urea es una serie de reacciones bioquímicas que se produce en muchos animales que produce urea ($(NH_2)_2CO$) a partir de amoníaco (NH_3) y, en los mamíferos, se produce solo en el hígado. Específicamente, el ciclo de la urea consiste en una serie de cinco reacciones bioquímicas y cumple dos funciones principales: la eliminación de nitrógeno como urea y la síntesis de arginina. Los defectos en el ciclo de la urea resultan en la acumulación de amoníaco y sus aminoácidos precursores (glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico y glicina). Los altos niveles resultantes de amoníaco son neurotóxicos, y la tríada de hiperamonemia, encefalopatía y alcalosis respiratoria caracteriza los trastornos del ciclo de la urea.

[0003] La deficiencia de transcarbamilasa de ornitina (OTC) representa un trastorno genético de ciclo de urea. Típicamente, un sujeto con deficiencia de OTC tiene un nivel reducido de la enzima OTC. En la forma severa clásica de deficiencia de OTC, en los primeros días de vida los pacientes presentan letargo, convulsiones, coma e hiperamonemia severa que rápidamente conducen a un desenlace fatal y en deterioro, sin intervención médica apropiada. Si no se trata, las complicaciones de la deficiencia de OTC pueden incluir retraso en el desarrollo, retraso mental y/o muerte.

[0004] El tratamiento de pacientes deficientes en OTC implica principalmente la regulación del amoníaco sérico y la hemodiálisis sigue siendo el único medio eficaz para reducir rápidamente los niveles séricos de amoníaco. En general, el objetivo del tratamiento de los trastornos metabólicos del ciclo de la urea es proporcionar suficiente proteína y arginina para el crecimiento, desarrollo y energía mientras que se previene el desarrollo de hiperamonemia e hiperglutaminemia. Los enfoques terapéuticos actualmente disponibles para el tratamiento terapéutico de los trastornos metabólicos del ciclo de la urea, como la deficiencia de OTC, dependen en gran medida del manejo dietético. Actualmente no existen tratamientos o curas a largo plazo para los trastornos metabólicos del ciclo de la urea. Nuevas terapias que aumentan el nivel o la producción de una proteína o enzima afectada en células diana, como los hepatocitos, o que modulan la expresión de ácidos nucleicos que codifican la proteína o enzima afectada, podrían proporcionar un tratamiento o incluso una cura para trastornos metabólicos, incluidos los trastornos metabólicos tales como la deficiencia de OTC.
El documento WO 90/11092 describe la administración y expresión de secuencias de polinucleótidos exógenos en un vertebrado.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0005] Se divulgan métodos de administración intracelular de ácidos nucleicos que son capaces de corregir defectos genéticos existentes y/o proporcionar funciones beneficiosas a una o más células diana. Después del suministro con éxito a tejidos y células diana, las composiciones de la presente invención transfectan esa célula objetivo y los ácidos nucleicos (es decir, ARNm) pueden traducirse en el producto génico de interés (es decir, una proteína funcional). Específicamente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo de transferencia, un excipiente farmacéuticamente aceptable y al menos una molécula de ARNm que codifica una proteína, comprendiendo el vehículo de transferencia uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, y uno o más lípido(s) modificado(s) con PEG, en donde el vehículo de transferencia es un liposoma y el tamaño del vehículo de transferencia es menor que 100 nm y el uso de tales composiciones farmacéuticas en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto que resulta de la producción deficiente de una proteína, en la que la composición farmacéutica se distribuye preferentemente en las células hepáticas después de la administración al sujeto y la proteína codificada se expresa en las células hepáticas del sujeto.

[0006] Las composiciones proporcionadas en el presente documento son útiles en la gestión y el tratamiento de un gran número de enfermedades que resultan de deficiencias de proteínas. Los individuos que padecen tales enfermedades pueden tener defectos genéticos subyacentes que conducen a la expresión comprometida de una proteína, incluyendo, por ejemplo, la falta de síntesis de la proteína, la síntesis reducida de la proteína, o la síntesis de una proteína que carece de o ha disminuido actividad biológica. En particular, las composiciones proporcionadas en este documento son útiles para el tratamiento de los trastornos metabólicos del ciclo de la urea que se producen como resultado de uno o más defectos en la biosíntesis de las enzimas implicadas en el ciclo de la urea. Los métodos y composiciones descritas aquí también son útiles en diversas aplicaciones *in vitro* e *in vivo* en las que se desea la administración de un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) a una célula diana y la transfección de esa célula

diana.
En algunas realizaciones, la composición comprende un ARNm y un vehículo de transferencia como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el ARNm codifica una enzima del ciclo de la urea. En algunas realizaciones, el ARNm puede comprender una o más modificaciones que confieren estabilidad al ARNm (por ejemplo, en comparación con una versión nativa o de tipo silvestre del ARNm) y también puede comprender una o más modificaciones relativas al tipo salvaje que corrigen un defecto implicado en la expresión aberrante asociada de la proteína. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la presente invención pueden comprender modificaciones en una o ambas regiones 5' y 3' no traducidas. Tales modificaciones pueden incluir, pero no están limitadas a la inclusión de una secuencia parcial de un gen inmediato-temprano 1 (IE1) de citomegalovirus (CMV), una cola de poli A, una estructura de Tapa 1 o una secuencia que codifica la hormona de crecimiento humana (hGH)).

[0007] También se describen métodos de tratamiento de un sujeto, en los que el sujeto tiene una proteína o deficiencia de la enzima. Los métodos pueden comprender la administración de una composición proporcionada en este documento. Por ejemplo, se describen métodos para tratar o prevenir afecciones en las que la producción de una proteína particular y/o la utilización de una proteína particular es inadecuada o está comprometida. En una realización, los métodos descritos en este documento pueden usarse para tratar un sujeto que tiene una deficiencia en una o más enzimas del ciclo de la urea. El método puede comprender poner en contacto y transfectar células o tejidos diana (tales como hepatocitos que son deficientes en una o más enzimas del ciclo de la urea) con una composición proporcionada en la presente, en la que el ácido nucleico codifica la enzima deficiente del ciclo de la urea. De esta manera, se incrementa la expresión de la enzima deficiente en la célula diana, lo que a su vez se espera que mejore los efectos de la deficiencia enzimática subyacente. La proteína expresada por la célula diana del ARNm traducido se puede retener dentro del citosol de la célula diana o alternativamente se puede secretar extracelularmente. En algunas realizaciones, el ARNm comprende una modificación que confiere estabilidad al código de ARNm (por ejemplo, cuando se compara con la versión nativa o de tipo natural del ARNm). Por ejemplo, el ARNm que codifica una enzima funcional puede comprender una o más modificaciones en una o ambas regiones 5' y 3' no traducidas.

[0008] Los ARNm proporcionados en este documento se formulan en el vehículo de transferencia de lípidos o liposomas para facilitar la administración a las células diana y/o para estabilizar los ácidos nucleicos contenidos en ellas. Los vehículos de transferencia comprenden uno o más lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos modificados con PEG. Por ejemplo, el vehículo de transferencia puede comprender una mezcla de los lípidos CHOL, DOPE, DLinDMA y DMG-PEG-2000. En otra realización, el vehículo de transferencia puede comprender los lípidos ICE, DOPE y DMG-PEG-2000. En otra realización más, el vehículo de transferencia puede comprender uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en ICE, DSPC, CHOL, DODAP, DOTAP y ceramida C8-PEG-2000. El vehículo de transferencia es un liposoma que es capaz de distribuir preferentemente a las células y tejidos diana *in vivo.*

[0009] La célula diana se pone en contacto con una composición que comprende un ARNm y un vehículo de transferencia. Después de la expresión de la proteína o enzima codificada por el ARNm, la proteína o enzima expresada puede retenerse dentro del citosol de la célula diana o alternativamente puede secretarse extracelularmente. En algunas realizaciones, el ARNm codifica una enzima del ciclo de la urea. En algunas realizaciones, el ARNm puede comprender una o más modificaciones que confieren estabilidad al ARNm y también puede comprender una o más modificaciones relativas al tipo salvaje que corrigen un defecto implicado en la expresión aberrante asociada de la proteína. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención se basan en las células diana para expresar la proteína funcional codificada por el ARNm administrado exógenamente. Debido a que la proteína codificada por el ARNm exógeno se traduce por la célula diana, las proteínas y enzimas expresadas se pueden caracterizar por ser menos inmunogénicas en relación con sus homólogos preparados recombinantemente.
La presente descripción contempla el uso de ligandos de direccionamiento capaces de potenciar la afinidad de una composición por una o más células diana. En una realización, el ligando de direccionamiento es apolipoproteína-B o apolipoproteína-E y las células diana correspondientes expresan receptores de lipoproteínas de baja densidad, facilitando así el reconocimiento del ligando de direccionamiento.
[0010] Las otras características anteriormente discutidas y ventajas concomitantes de la presente invención se entenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención cuando se toma en conjunción con los ejemplos que se acompañan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

FIG. 1 ilustra la síntesis del lípido de éster de colesterol de imidazol ICE.
FIG. 2 ilustra la presencia de actividad de luciferasa de luciérnaga producida a partir del suministro de ARNm exógeno en los hígados y bazos de ratones CD-1 tratados y no tratados.
FIG. 3 ilustra la hibridación *in* situ de ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado para codones en hígados de ratón de control y tratados (B1 y B2) observados en una película de rayos X con un aumento bajo (2X). (A) representa la tinción de violeta de cresilo del control (Ct) y las secciones hepáticas tratadas de los ratones B1 y

B2; (B) representa la detección por autorradiografía de película de rayos X mediante sondas antisentido de ARNm de luciferasa CO-FF en hígados de ratón B1 y B2; y (C) representa hibridación de control (sentido). Las abreviaturas "cv", "as" y "s" corresponden a violeta de cresilo, antisentido y sentido, respectivamente.

FIG. 4 ilustra el etiquetado de ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado para codones en hígados tratados (B1) y de control. (A) representa la detección por autorradiografía de emulsión de ARNm de luciferasa de CO-FF en una sección de hígado B1 vista como marcaje brillante bajo iluminación de campo oscuro; (B) representa la misma región que (A) vista bajo iluminación de campo claro usando violeta de cresilo como una tinción de contraste; (C) representa la sección hepática B1 tratada con la ribosonda control (control) de luciferasa CO-FF que establece el nivel de marcaje no específico; (D) representa la misma región que (C) vista bajo iluminación de campo claro; (E) representa la sección de hígado control no tratada tratada con sonda antisentido de luciferasa de CO-FF, no se detectó señal; (F) representa la misma región que (E) vista bajo iluminación de campo claro; (G) representa la sección hepática de control tratada con la ribosonda control (control) de luciferasa CO-FF que establece el nivel de marcaje no específico; y (H) representa la misma región que (G) vista debajo de la iluminación de campo claro. Las abreviaturas "BD", "HA", "H", "PV", "como" y "s" corresponden a conducto biliar, arteria hepática, hepatocito, vena porta, antisentido y sentido, respectivamente. Ampliación: 100X.

FIG. 5 ilustra la tinción inmunohistoquímica de hígados de ratón para la detección de la proteína luciferasa de luciérnaga. (A) representa una tinción de luciferasa negativa para el hígado de control del ratón tratado con 1x PBS (20X); (B) representa detección de proteína de luciferasa positiva mediante métodos inmunohistoquímicos basados en fluorescencia, demostrando que se observa proteína de luciferasa de luciérnaga en los hepatocitos (20X), así como un pequeño número de células endoteliales sinusoidales que también fueron positivas para proteína de luciferasa; (C) representa una tinción de proteína de luciferasa de luciérnaga positiva que se muestra a mayor aumento (40X). La proteína luciferasa se observa en todo el citoplasma de los hepatocitos. Las abreviaturas (S) y (H) corresponden a células sinusoidales y hepatocitos, respectivamente.

FIG. 6 muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm de luciferasa de CO-FF (SEQ ID NO: 1).

FIG. 7 muestra las secuencias de nucleótidos de una secuencia 5’ CMV (SEQ ID NO: 2) y una secuencia 3' hGH (SEQ ID NO: 3) que pueden usarse para flanquear una secuencia de ARNm de interés.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0012] Se describen aquí composiciones de arco que facilitan la administración de ácidos nucleicos a, y la posterior transfección de, células diana. Las composiciones proporcionadas en este documento son útiles para el tratamiento de enfermedades que resultan de la producción deficiente de proteínas. Por ejemplo, las enfermedades adecuadas que pueden tratarse son aquellas en las que una mutación genética en un gen particular hace que las células afectadas no expresen, tengan una expresión reducida de, o expresen una proteína no funcional. Poniendo en contacto dichas células diana con las composiciones de la presente invención de manera que las células diana se transfecten con un ácido nucleico que codifica una versión funcional de la proteína, permite la producción de una proteína funcional, esto es útil en el tratamiento de tal deficiencia.

Específicamente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo de transferencia, un excipiente farmacéuticamente aceptable y al menos una molécula de ARNm que codifica una proteína, comprendiendo el vehículo de transferencia uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, y uno o más lípido(s) modificado(s) con PEG, en donde el vehículo de transferencia es un liposoma y el tamaño del vehículo de transferencia es menor que 100 nm y el uso de tales composiciones farmacéuticas en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto que resulta de la producción deficiente de una proteína, en la que la composición farmacéutica se distribuye preferentemente en las células hepáticas después de la administración al sujeto y la proteína codificada se expresa en las células hepáticas del sujeto.

El ARNm codifica, por ejemplo, una enzima funcional del ciclo de la urea. En algunas realizaciones, el ARNm de la composición puede modificarse para impartir una estabilidad mejorada (por ejemplo, en relación con la versión de tipo salvaje del ARNm y/o la versión del ARNm que se encuentra endógenamente en la célula diana). Por ejemplo, el ARNm de la composición puede incluir una modificación en comparación con una versión de tipo salvaje del ARNm, en donde la modificación confiere estabilidad al ARNm de la composición. En algunas realizaciones, el ARNm de la composición es más estable que la versión de tipo salvaje del ARNm y/o más estable que la versión del ARNm que se encuentra endógenamente en la célula diana.

[0013] Se dan a conocer los métodos de tratamiento de un sujeto con una deficiencia de ciclo de la urea. Los métodos comprenden administrar una composición que comprende un ARNm y un vehículo de transferencia, en donde el ARNm codifica una enzima del ciclo de la urea. En algunas realizaciones, el ARNm de la composición es más estable que la versión de tipo salvaje del ARNm y/o más estable que la versión del ARNm que se encuentra endógenamente en el objetivo.

[0014] En la presente memoria, el término "ácido nucleico" se refiere a material genético (por ejemplo, los oligonucleótidos o polinucleótidos que comprenden ADN o ARN). El ácido nucleico de las composiciones de la invención es ARNm.

La presente invención describe el uso de ARNm o ARNm estabilizado como un agente terapéutico capaz de facilitar la expresión de una enzima o proteína funcional que un sujeto es deficiente (por ejemplo, una enzima del ciclo de la urea). El término "funcional", como se usa en el presente documento para calificar una proteína o enzima, significa que la proteína o enzima tiene actividad biológica, o alternativamente es capaz de realizar la misma, o una función

similar a la proteína o enzima nativa o que funciona normalmente. Las composiciones de la presente invención son útiles para el tratamiento de diversos trastornos metabólicos o genéticos, y en particular aquellos trastornos genéticos o metabólicos que implican la no expresión, expresión errónea o deficiencia de una proteína.

[0015] En el contexto de la presente invención el término "expresión" se utiliza en su sentido más amplio para hacer referencia a la transcripción de un gen específico o ácido nucleico en al menos un transcrito de ARNm, o la traducción de al menos un ARNm o ácido nucleico en una proteína o enzima. Las composiciones de la presente invención son composiciones que comprenden uno o más ácidos nucleicos de ARNm que codifican proteínas o enzimas funcionales, y en el contexto de dichos ácidos nucleicos de ARNm, el término expresión se refiere a la traducción de dicho ARNm para producir la proteína o enzima codificada.

[0016] El ácido nucleico es capaz de ser expresado (la transcripción del ARNm de un gen) y traducido (la traducción de la proteína codificada a partir de un transcrito de ARNm sintético o exógeno). El ácido nucleico puede codificar, por ejemplo, una hormona, enzima, receptor, polipéptido, péptido u otra proteína de interés. En una realización de la presente invención, el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína deficiente) puede tener opcionalmente modificaciones químicas o biológicas que, por ejemplo, mejoran la estabilidad y/o la vida media de tal ácido nucleico o que mejoran o no facilitan la traducción.

[0017] Se contemplan también por la presente invención la co-administración de uno o más únicos ácidos nucleicos a las células diana, por ejemplo, mediante la combinación de dos ácidos nucleicos únicos en un solo vehículo de transferencia. En una realización de la presente invención, un primer ácido nucleico terapéutico, tal como ARNm que codifica uridiltransferasa de galactosa-1-fosfato (GALT), y un segundo ácido nucleico terapéutico, tal como ARNm que codifica galatoquinasa (GALK), se puede formular en un único vehículo de transferencia y administrado (p. ej., para el tratamiento de la galactosemia). La presente invención también contempla la coadministración y/o la administración conjunta de un primer ácido nucleico terapéutico y un segundo ácido nucleico para facilitar y/o mejorar la función o administración del primer ácido nucleico terapéutico. Por ejemplo, dicho segundo ácido nucleico (por ejemplo, ARNm exógeno o sintético) puede codificar una proteína transportadora de membrana que tras la expresión (por ejemplo, traducción del ARNm exógeno o sintético) facilita la administración o potencia la actividad biológica del primer ácido nucleico. Alternativamente, el primer ácido nucleico terapéutico se puede administrar con un segundo ácido nucleico que funciona como "chaperona", por ejemplo, para dirigir el plegamiento del primer ácido nucleico terapéutico o ácidos nucleicos endógenos.

[0018] También se contempla el suministro de uno o más ácidos nucleicos terapéuticos para el tratamiento de una sola deficiencia de proteína, en el que cada una de tales funciones de ácido nucleico terapéutico por un mecanismo de acción diferente. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden comprender un primer ácido nucleico terapéutico que se administra para corregir una deficiencia de proteína endógena, y que se acompaña de un segundo ácido nucleico, que se administra para desactivar o "derribar" un mal funcionamiento de ácido nucleico endógeno y su proteína o producto enzimático. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar, por ejemplo, ARNm y siARN.

[0019] Mientras que ácidos nucleicos transcritos *en vitro* (por ejemplo, ARNm) se pueden transfectar en células diana, tales ácidos nucleicos se degradan fácilmente y eficientemente por la célula *in vivo,* haciendo así tales ácidos nucleicos ineficaces. Además, algunos ácidos nucleicos son inestables en fluidos corporales (particularmente suero humano) y pueden degradarse incluso antes de alcanzar una célula diana. Además, dentro de una célula, un ARNm natural puede descomponerse con una vida media de entre 30 minutos y varios días.

[0020] Los ácidos nucleicos de ARNm proporcionados en este documento retienen al menos cierta capacidad para ser traducidos, produciendo de ese modo una proteína funcional dentro de una célula diana. Por consiguiente, la presente invención se refiere a la administración de un ácido nucleico estabilizado (ARNm que se ha estabilizado contra la digestión o degradación de nucleasas *in vivo*) que modula la expresión de un gen o la traducción de una proteína funcional dentro de una célula diana. En una realización preferida de la presente invención, la actividad del ácido nucleico (ARNm que codifica una proteína funcional) se prolonga durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, la actividad de los ácidos nucleicos puede prolongarse de manera que las composiciones de la presente invención se administren a un sujeto de manera semisemanal o quincenal, o más preferiblemente en forma mensual, bimensual, trimestral o anual. La actividad prolongada o extendida de las composiciones de la presente invención, y en particular del ARNm comprendido en ellas, está directamente relacionada con la cantidad de proteína funcional o enzima traducida a partir de dicho ARNm. De forma similar, la actividad de las composiciones de la presente invención puede extenderse o prolongarse adicionalmente mediante modificaciones realizadas para mejorar la traducción de los ácidos nucleicos de ARNm. Por ejemplo, la secuencia de consenso de Kozac desempeña un papel en el inicio de la traducción de proteínas, y la inclusión de dicha secuencia de consenso de Kozac en los ácidos nucleicos de ARNm de la presente invención puede extender o prolongar adicionalmente la actividad de los ácidos nucleicos de ARNm. Además, la cantidad de proteína funcional traducida por la célula diana es una función de la cantidad de ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) administrado a las células diana y la estabilidad de dicho ácido nucleico. En la medida en que la estabilidad de la composición de la presente invención pueda mejorarse o mejorarse, la semivida, la actividad de la proteína traducida y la frecuencia de dosificación de la composición pueden extenderse más.

[0021] Por consiguiente, en una realización preferida, los ácidos nucleicos proporcionados en este documento comprenden al menos una modificación que confiere una mayor o mayor estabilidad al ácido nucleico, que incluye, por ejemplo, resistencia mejorada a la digestión con nucleasas *in vivo.* Como se usa en este documento, los términos "modificación" y "modificado" como tales se refieren a los ácidos nucleicos proporcionados aquí, incluyen al menos una alteración que preferiblemente mejora la estabilidad y hace que el ácido nucleico sea más estable (por ejemplo, resistente a la digestión con nucleasas) que el tipo salvaje o versión de origen natural del ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, los términos "estable" y "estabilidad" como tales términos se refieren a los ácidos nucleicos de la presente invención, y particularmente con respecto al ARNm, se refieren a resistencia incrementada o potenciada a la degradación por, por ejemplo, nucleasas (es decir, endonucleasas o exonucleasas) que normalmente son capaces de degradar dicho ARN. El aumento de la estabilidad puede incluir, por ejemplo, menos sensibilidad a la hidrólisis u otra destrucción por enzimas endógenas (por ejemplo, endonucleasas o exonucleasas) o afecciones dentro de la célula o tejido diana, aumentando o mejorando así la residencia de tales ácidos nucleicos en la célula diana, tejido, sujeto y/o citoplasma. Las moléculas de ácido nucleico estabilizadas proporcionadas en este documento demuestran semividas más largas en relación con sus contrapartidas naturales no modificadas (por ejemplo, la versión de tipo salvaje del ácido nucleico). También se contemplan los términos "modificación" y "modificado" ya que tales términos relacionados con los ácidos nucleicos de la presente invención son alteraciones que mejoran la traducción de ácidos nucleicos de ARNm, que incluyen, por ejemplo, la inclusión de secuencias que funcionan en el inicio de traducción de proteínas (p. ej., la secuencia de consenso de Kozac). (Kozak, M., Nucleic Acids Res 15 (20): 8125 - 48 (1987)).

[0022] En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de la presente invención han sido sometidos a una modificación química o biológica para hacerlos más estable. Las modificaciones ejemplares de un ácido nucleico incluyen la reducción de una base (por ejemplo, mediante deleción o mediante la sustitución de un nucleótido por otra) o la modificación de una base, por ejemplo, la modificación química de una base. La frase "modificaciones químicas" como se usa en este documento, incluye modificaciones que introducen químicas que difieren de las vistas en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, modificaciones covalentes tales como la introducción de nucleótidos modificados (por ejemplo, análogos de nucleótidos o la inclusión de grupos colgantes que no se encuentran naturalmente en tales moléculas de ácido nucleico).

[0023] Además, las modificaciones adecuadas incluyen alteraciones en uno o más nucleótidos de un codón de tal manera que el codón codifica el mismo aminoácido pero es más estable que el codón que se encuentra en la versión de tipo salvaje del ácido nucleico. Por ejemplo, se ha demostrado una relación inversa entre la estabilidad del ARN y un mayor número de residuos de citidinas (C) y/o uridinas (U), y se ha encontrado que el ARN desprovisto de residuos C y U es estable a la mayoría de las ARNasas (Heidenreich, y col., J Biol Chem 269, 2131 - 8 (1994)). En algunas realizaciones, se reduce el número de restos C y/o U en una secuencia de ARNm. En otra realización, el número de residuos C y/o U se reduce mediante la sustitución de un codón que codifica un aminoácido particular por otro codón que codifica el mismo aminoácido o uno relacionado. Las modificaciones contempladas para los ácidos nucleicos de ARNm de la presente invención también incluyen la incorporación de pseudouridinas. La incorporación de pseudouridinas en los ácidos nucleicos de ARNm de la presente invención puede potenciar la estabilidad y la capacidad de traducción, así como disminuir la inmunogenicidad *in vivo.* (Véase, por ejemplo, Kariko, K., y col., Molecular Therapy 16 (11): 1833-1840 (2008)). Las sustituciones y modificaciones de los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden realizar por métodos fácilmente conocidos por los expertos en la técnica.

[0024] Las limitaciones en la reducción del número de residuos de C y U en una secuencia probable serán mayores dentro de la región de codificación de un ARNm en comparación con una región no traducida, (es decir, es probable que no sea posible eliminar la totalidad de residuos C y U presentes en el mensaje mientras que aún retienen la capacidad del mensaje para codificar la secuencia de aminoácidos deseada). La degeneración del código genético, sin embargo, presenta una oportunidad para permitir que se reduzca el número de residuos C y/o U que están presentes en la secuencia, mientras que se mantiene la misma capacidad de codificación (es decir, dependiendo de qué aminoácido esté codificado por un codón, pueden ser posibles varias posibilidades diferentes para la modificación de secuencias de ARN). Por ejemplo, los codones para Gly se pueden alterar a GGA o GGG en lugar de GGU o GGC.

[0025] La modificación del término también incluye, por ejemplo, la incorporación de enlaces no nucleótidos o nucleótidos modificados en las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención (por ejemplo, las modificaciones de uno o ambos el 3' y 5' de una molécula de ARNm codificando una proteína o enzima funcional). Tales modificaciones incluyen la adición de bases a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, la inclusión de una cola de poli A o una cola de poli A más larga), la alteración de la UTR en 3' o la UTR en 5', complejando el ácido nucleico con un agente (por ejemplo, una proteína o una molécula complementaria de ácido nucleico), e inclusión de elementos que cambian la estructura de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, que forman estructuras secundarias).

[0026] Se piensa que la cola poli A estabiliza mensajeros naturales y ARN sentido sintético. Por lo tanto, en una realización, se puede añadir una cola larga de poli A a una molécula de ARNm, lo que hace que el ARN sea más estable. Las colas poli A se pueden agregar usando una variedad de técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden añadir largas colas de poli A a ARN transcrito sintético o *in vitro* usando polimerasa de poli A

(Yokoe, y col., Nature Biotechnology, 1996; 14: 1252-1256). Un vector de transcripción también puede codificar colas largas de poli A. Además, las colas de poli A se pueden agregar mediante transcripción directamente desde productos de PCR. El Poli A también se puede ligar al extremo 3' de un ARN sentido con ARN ligasa (véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª edición, editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: edición de 1991)). En una realización, la longitud de la cola de poli A es al menos aproximadamente 90, 200, 300, 400 al menos 500 nucleótidos. En una realización, la longitud de la cola de poli A se ajusta para controlar la estabilidad de una molécula de ARNm con sentido modificado de la invención y, por lo tanto, la transcripción de la proteína. Por ejemplo, dado que la longitud de la cola de poli A puede influir en la vida media de una molécula de ARNm sentido, la longitud de la cola de poli A se puede ajustar para modificar el nivel de resistencia del ARNm a nucleasas y así controlar el curso del tiempo de expresión de proteínas en una célula. En una realización, las moléculas de ácido nucleico estabilizadas son suficientemente resistentes a la degradación *in vivo* (por ejemplo, mediante nucleasas), de manera que pueden administrarse a la célula diana sin un vehículo de transferencia.

[0027] En una realización, un ácido nucleico que codifica una proteína puede ser modificada por la incorporación de secuencias no traducidas 3' y/o 5' (UTR) que no se encuentra de forma natural en el ácido nucleico de tipo salvaje. En una realización, la secuencia flanqueante 3' y/o 5' que flanquea naturalmente un ARNm y codifica una segunda proteína no relacionada se puede incorporar a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm que codifica una proteína terapéutica o funcional para modificarla. Por ejemplo, secuencias 3' o 5' de moléculas de ARNm que son estables (p. ej., globina, actina, GAPDH, tubulina, histona o enzimas del ciclo del ácido cítrico) pueden incorporarse en la región 3' y/o 5' de un sentido ARNm de la molécula de ácido nucleico para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm sentido.

[0028] También se contemplan por la presente invención modificaciones de las secuencias de ácido nucleico realizadas a uno o ambos de los extremos 3' y 5' del ácido nucleico. Por ejemplo, la presente invención contempla modificaciones en el extremo 5' de los ARNs para incluir una secuencia parcial de un gen CMV inmediato-temprano 1 (IE1), o un fragmento del mismo (por ejemplo, SEQ ID Nº: 2) para mejorar la resistencia a nucleasa y/o mejorar la vida media del ácido nucleico. Además de aumentar la estabilidad de la secuencia de ácido nucleico de ARNm, se ha descubierto sorprendentemente que la inclusión de una secuencia parcial de un gen CMV inmediato-temprano 1 (IE1) potencia la traducción del ARNm y la expresión de la proteína funcional o enzima. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona de crecimiento humana (hGH), o un fragmento de la misma (por ejemplo, SEQ ID NO: 3) a uno o ambos extremos 3' y 5' del ARNm para estabilizar aún más el ácido nucleico. Generalmente, las modificaciones preferidas mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, vida media) del ácido nucleico con respecto a sus equivalentes no modificados, e incluyen, por ejemplo, modificaciones hechas para mejorar la resistencia de dicho ácido nucleico a la digestión con nucleasa *in vivo.*

[0029] En algunas realizaciones, la composición puede comprender un reactivo estabilizante. Las composiciones pueden incluir uno o más reactivos de formulación que se unen directa o indirectamente a, y estabilizan el ácido nucleico, mejorando así el tiempo de residencia en el citoplasma de una célula diana. Tales reactivos conducen preferiblemente a una semivida mejorada de un ácido nucleico en las células diana. Por ejemplo, la estabilidad de un ARNm y la eficacia de la traducción pueden aumentarse mediante la incorporación de "reactivos estabilizantes" que forman complejos con el ARNm que se produce de forma natural dentro de una célula (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.677.124). La incorporación de un reactivo estabilizante se puede llevar a cabo, por ejemplo, combinando la poli A y una proteína con el ARNm para estabilizar *in vitro.* antes de cargar o encapsular el ARNm dentro de un vehículo de transferencia. Los reactivos estabilizantes a modo de ejemplo incluyen una o más proteínas, péptidos, aptámeros, proteína accesoria traduccional, proteínas de unión a ARNm y/o factores de iniciación de la traducción.

[0030] La estabilización de las composiciones también se puede mejorar mediante el uso de restos inhibidores de opsonización, que son típicamente polímeros hidrófilos grandes que están unidos química o físicamente al vehículo de transferencia (por ejemplo, mediante la intercalación de un anclaje soluble en lípidos en la membrana en sí misma, o uniéndose directamente a grupos activos de lípidos de membrana). Estos polímeros hidrófilos que inhiben la opsonización forman una capa superficial protectora que disminuye significativamente la absorción de los liposomas por el sistema macrófago-monocito y el sistema reticuloendotelial (por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.920.016). Los vehículos de transferencia modificados con restos de inhibición de la opsonización permanecen así en la circulación mucho más tiempo que sus homólogos no modificados.

[0031] Cuando el ARN se hibrida con una molécula de ácido nucleico complementaria (por ejemplo, ADN o ARN) que puede estar protegido de las nucleasas. (Krieg, y col., Melton. Methods in Enzymology. 1987; 155, 397-415). La estabilidad del ARNm hibridado probablemente se debe a la especificidad inherente de una sola cadena de la mayoría de las ARNasas. En algunas realizaciones, el reactivo estabilizante seleccionado para formar un complejo de un ácido nucleico es una proteína eucariota (por ejemplo, una proteína de mamífero). En otra realización más, el ARNm para uso en terapia se puede modificar mediante hibridación con una segunda molécula de ácido nucleico. Si se hibridaba una molécula de ARNm completa con una molécula de ácido nucleico complementaria, se puede reducir el inicio de la traducción. En algunas realizaciones, la región 5' no traducida y la región de inicio AUG de la molécula de ARNm pueden dejarse sin hibridar opcionalmente. Después de la iniciación de la traducción, la

actividad de desenrollado del complejo ribosómico puede funcionar incluso en dúplex de alta afinidad para que pueda llevarse a cabo la traducción. (Liebhaber J. Mol. Biol 1992; 226: 2-13; Monia, et al J Biol Chem 1993; 268: 14514-22).

[0032] Se entenderá que cualquiera de los métodos descritos anteriormente para mejorar la estabilidad de los ácidos nucleicos se puede usar solo o en combinación con uno o más de cualquiera de los otros métodos y/o composiciones descritas anteriormente.

[0033] En una realización, las composiciones de la presente invención facilitan la administración de ácidos nucleicos a células diana. En algunas realizaciones, facilitar la administración a las células diana incluye aumentar la cantidad de ácido nucleico que entra en contacto con las células diana. En algunas realizaciones, facilitar la administración a células diana incluye reducir la cantidad de ácido nucleico que entra en contacto con células no diana. En algunas realizaciones, facilitar la administración a las células diana incluye permitir la transfección de al menos algunas células diana con el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el nivel de expresión del producto codificado por el ácido nucleico entregado se incrementa en células diana.

[0034] Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden combinarse opcionalmente con un gen reportero (por ejemplo, aguas arriba o aguas abajo de la región codificante del ácido nucleico) que, por ejemplo, facilita la determinación de suministro de ácido nucleico a las células diana o tejidos. Los genes informadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, ARNm de proteína verde fluorescente (ARNm de GFP), ARNm de luciferasa de *Renilla* (ARNm de luciferasa), ARNm de luciferasa de luciérnaga, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el ARNm de GFP puede fusionarse con un ácido nucleico que codifica ARNm de OTC para facilitar la confirmación de la localización del ARNm en las células diana, tejidos u órganos.

[0035] Como se usa en el presente documento, los términos "transfectar" o "transfección" significan la introducción intracelular de un ácido nucleico en una célula, o preferiblemente en una célula diana. El ácido nucleico introducido puede mantenerse estable o transitoriamente en la célula diana. El término "eficacia de transfección" se refiere a la cantidad relativa de ácido nucleico captada por la célula diana que está sujeta a transfección. En la práctica, la eficacia de la transfección se estima por la cantidad de un producto indicador de ácido nucleico expresado por las células diana después de la transfección. Se prefieren composiciones con altas eficacias de transfección y, en particular, aquellas composiciones que minimizan los efectos adversos que están mediados por la transfección de células y tejidos no diana. Las composiciones de la presente invención que demuestran eficacias de transfección elevadas mejoran la probabilidad de que se administren las dosificaciones apropiadas del ácido nucleico en el sitio de la patología, al tiempo que se minimizan los posibles efectos adversos sistémicos.

[0036] Tal como se establece en el presente documento, las composiciones incluyen un vehículo de transferencia que comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos y uno o más lípidos modificados con PEG, en donde el vehículo de transferencia es un liposoma y el tamaño del vehículo de transferencia es inferior a 100 nm. Como se usa en el presente documento, el término "vehículo de transferencia" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, diluyentes, excipientes y similares que generalmente están destinados para uso en conexión con la administración de agentes biológicamente activos, que incluyen ácidos nucleicos. Las composiciones y en particular los vehículos de transferencia descritos en este documento son capaces de suministrar ácidos nucleicos de diferentes tamaños a sus células o tejidos diana. En una realización de la presente invención, los vehículos de transferencia de la presente invención son capaces de suministrar grandes secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ácidos nucleicos de al menos 1 kDa, 1.5 kDa, 2 kDa, 2.5 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, o más). Los ácidos nucleicos se pueden formular con uno o más reactivos aceptables, que proporcionan un vehículo para administrar dichos ácidos nucleicos a las células diana. Los reactivos apropiados generalmente se seleccionan con respecto a una serie de factores, que incluyen, entre otras cosas, las propiedades biológicas o químicas de los ácidos nucleicos (por ejemplo, carga), la vía de administración prevista, el entorno biológico anticipado al que tales ácidos nucleicos estará expuesto y las propiedades específicas de las células objetivo deseadas. En algunas realizaciones, los vehículos de transferencia, tales como liposomas, encapsulan los ácidos nucleicos sin comprometer la actividad biológica. En algunas realizaciones, el vehículo de transferencia demuestra unión preferencial y/o sustancial a una célula diana con relación a las células no diana. En una realización preferida, el vehículo de transferencia entrega su contenido a la célula diana de modo que los ácidos nucleicos se administran al compartimiento subcelular apropiado, tal como el citoplasma. El vehículo de transferencia de la invención es una vesícula liposomal, para facilitar la transferencia de un ácido nucleico a células y tejidos diana. Los lípidos se usan como un componente del vehículo de transferencia. Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen, por ejemplo, los compuestos de fosfatidilo (por ejemplo, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos).

[0037] El vehículo de transferencia se puede seleccionar y/o preparar para optimizar el suministro del ácido nucleico a la célula diana, tejido u órgano. Por ejemplo, las propiedades del vehículo de transferencia (por ejemplo, tamaño, carga y/o pH) pueden optimizarse para administrar eficazmente dicho vehículo de transferencia a la célula u órgano objetivo, reducir el aclaramiento inmunitario y/o promover la retención en ese órgano diana.

[0038] Los liposomas (por ejemplo, nanopartículas lípidas liposomales) generalmente son útiles en una variedad de

aplicaciones en la investigación, industria, y medicina, particularmente para su uso como vehículos de transferencia de compuestos de diagnóstico o terapéuticas *in vivo* (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998; Drummond et al., Pharmacol. Rev., 51: 691-743, 1999) y se caracterizan habitualmente como vesículas microscópicas que tienen un espacio acuoso interior secuestrado de un medio externo por una membrana de una o más bicapas. Las membranas de bicapa de liposomas se forman típicamente por moléculas anfifílicas, tales como lípidos de origen sintético o natural que comprenden dominios hidrofílicos e hidrófobos espacialmente separados (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Las membranas bicapa de los liposomas también pueden formarse por polímeros anfifílicos y tensioactivos (por ejemplo, polimerasomas, niosomas, etc.).

[0039] En el contexto de la presente invención, un vehículo de transferencia liposomal típicamente sirve para transportar el ácido nucleico a la célula diana. Para los fines de la presente invención, los vehículos de transferencia liposomal están preparados para contener los ácidos nucleicos deseados. El proceso de incorporación de un ácido nucleico deseado en un liposoma se denomina a menudo "carga" (Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992). Los ácidos nucleicos incorporados en liposomas pueden estar total o parcialmente localizados en el espacio interior del liposoma, dentro de la membrana bicapa del liposoma, o asociados con la superficie exterior de la membrana del liposoma. La incorporación de un ácido nucleico en los liposomas también se denomina aquí "encapsulación" en la que el ácido nucleico está contenido por completo dentro del espacio interior del liposoma.

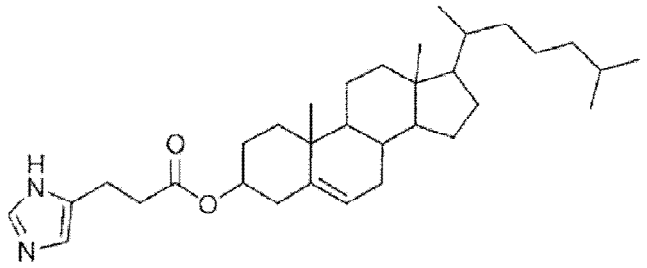
[0040] El propósito de la incorporación de un ácido nucleico en un vehículo de transferencia, tal como un liposoma, es a menudo para proteger el ácido nucleico a partir de un medio ambiente que pueden contener enzimas o productos químicos que degradan ácidos nucleicos y/o sistemas o receptores que causan la rápida excreción de los ácidos nucleicos. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, el vehículo de transferencia seleccionado es capaz de potenciar la estabilidad del ácido o ácidos nucleicos (ARNm que codifica una proteína funcional) contenidos en el mismo. El liposoma puede permitir que el ácido nucleico encapsulado alcance la célula diana y/o puede permitir preferentemente que el ácido nucleico encapsulado alcance la célula diana o, como alternativa, limite el suministro de tales ácidos nucleicos a otros sitios o células donde la presencia del ácido nucleico administrado puede ser inútil o indeseable. Además, la incorporación de los ácidos nucleicos en un vehículo de transferencia, tal como, por ejemplo, un liposoma catiónico, también facilita la administración de tales ácidos nucleicos en una célula diana.

[0041] Idealmente, vehículos de transferencia liposomal están preparados para encapsular uno o más ácidos nucleicos deseados (por ejemplo, ARNm que codifica una enzima de ciclo de urea) tal que las composiciones demuestran una alta eficacia de transfección y estabilidad mejorada. Aunque los liposomas pueden facilitar la introducción de ácidos nucleicos en células diana, la adición de policationes (por ejemplo, poli L-lisina y protamina), ya que un copolímero puede facilitar, y en algunos casos mejorar notablemente la eficacia de transfección de varios tipos de liposomas catiónicos por 2-28 veces en varias líneas celulares tanto *in vitro* como *in vivo.* (Véase N.J. Caplen, y col., Gene Ther. 1995; 2: 603; S. Li, y col., Gene Ther. 1997; 4, 891.)
Los lípidos y liposomas catiónicos se usan para encapsular y/o potenciar la administración de ácidos nucleicos en sus células y tejidos diana. Como se usa en este documento, la frase "lípido catiónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que llevan una carga neta positiva a un pH seleccionado, tal como el pH fisiológico. Los vehículos de transferencia liposomal contemplados y las nanopartículas de lípidos se pueden preparar incluyendo mezclas de lípidos multicomponente de proporciones variables que emplean uno o más lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos modificados con PEG. Se han descrito varios lípidos catiónicos en la literatura, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. En algunas realizaciones, se usa el lípido catiónico cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propilo]-N,N,N-trimetilamonio o "DOTMA". (Feigner y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 7413 (1987), Patente de Estados Unidos Nº 4.897.355). DOTMA puede formularse solo o puede combinarse con dioleoilfosfatidiletanolamina o "DOPE" u otros lípidos catiónicos o no catiónicos en un vehículo de transferencia liposomal o una nanopartícula lipídica, y tales liposomas pueden usarse para potenciar la administración de ácidos nucleicos en células diana. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, 5-carboxiespermilglicinadioctadecilamida o "DOGS", 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etilo]-N,N-dimetilo-1-propanaminio o "DOSPA" (Behr y col., Proc. Nat. 'Acad. Sci. 86, 6982 (1989), Patente de los Estados Unidos Núm. 5,171,678, Patente de los Estados Unidos Núm. 5,334,761), 1,2-Dioleoílo-3-Dimetilamonio-Propano o "DODAP", 1,2-Dioleoílo-3-Trimetilamonio-Propano o "DOTAP". Los lípidos catiónicos expresados también incluyen 1,2-diestearíloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLinDMA", cloruro de N-dioleílo-N,N-dimetilamonio o "DODAC", bromuro de N,N-distearilo-N,N-dimetilamonio o "DDAB", bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-ilo)-N,N-dimetilo-N-hidroxietiloamonio o "DMRIE", 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi)-3-dimetilo 1-1-(cis,cis-9', 1-2'-octadeca-dienoxi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetilo-3,4-dioleiloxibencilamina o "DMOBA", 1,2-N,N'-dioleilcarbamilo-3-dimetilaminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-Dilinoleoiloxi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-Dilinoleilcarbamilo-3-dimetilaminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-Dilinoleoilcarbamilo-3-dimetilaminopropano o "DLinC-DAP", 2,2-dilinoleílo-4-dimetilaminometilo-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-DMA", 2,2-dilinoleílo-4-dimetilaminoetilo-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA", o mezclas de los mismos. (Heyes, J., y col., J Controlled Release 107: 276 - 287 (2005); Morrissey, DV., y col., Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); publicación PCT WO2005/121348A1).

[0042] El uso de lípidos catiónicos a base de colesterol también se contempla por la presente invención. Tales lípidos catiónicos basados en colesterol se pueden usar en combinación con otros lípidos catiónicos y no catiónicos. Los lípidos catiónicos adecuados basados en colesterol incluyen, por ejemplo, DC-Chol (N,N-dimetilo-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilamino-propilo)piperazina (Gao, y col., Biochem. Biophys Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf y col., BioTechniques 23, 139 (1997), Patente de los Estados Unidos Núm. 5.744.335).

[0043] Además, varios reactivos están disponibles comercialmente para mejorar la eficacia de la transfección. Los ejemplos adecuados incluyen LIPOFECTINE (DOTMA: DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, CA), LIPOFECTAMINE (DOSPA: DOPE) (Invitrogen), LIPOFECTAMINE2000. (Invitrogen), FUGENE, TRANSFECTAM (DOGS) y EFFECTENE.

[0044] También se contemplan los lípidos catiónicos tales como los lípidos basados en dialquilamino, a base de imidazol, y a base de guanidinio. Por ejemplo, ciertas realizaciones están dirigidas a una composición que comprende uno o más lípidos catiónicos basados en imidazol, por ejemplo, el éster de colesterol de imidazol o lípido "ICE" (3S, 10R, 13R, 17R)-10,13-dimetilo-17-((R)-6-metilo-etan-2-ilo)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo 3-(1H-imidazol-4-ilo)propanoato, como se representa por la estructura (I) a continuación. En una realización preferida, un vehículo de transferencia para el suministro de ARNm, por ejemplo una cantidad terapéutica de ARNm, puede comprender uno o más lípidos catiónicos basados en imidazol, por ejemplo, el éster de colesterol de imidazol o lípido "ICE" (3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-dimetilo-17-((R)-6-metilheptan-2-ilo)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenanten-3-ilo 3-(1H-imidazol-4 ilo)propanoato, como se representa por la estructura (I).



(I)

Sin desear estar ligado a una teoría particular, se cree que la fusogenicidad del lípido catiónico ICE basado en imidazol está relacionada con la disrupción endosomal que se ve facilitada por el grupo imidazol, que tiene un pKa menor en relación con los lípidos catiónicos tradicionales. La disrupción endosomal a su vez promueve el hinchamiento osmótico y la ruptura de la membrana liposómica, seguido de la transfección o liberación intracelular de los contenidos de ácidos nucleicos cargados en la célula objetivo.

[0045] Los lípidos catiónicos a base de imidazol también se caracterizan por su toxicidad reducida en relación con otros lípidos catiónicos. Los lípidos catiónicos basados en imidazol (por ejemplo, ICE) se pueden usar como el único lípido catiónico en el vehículo de transferencia, o alternativamente se pueden combinar con lípidos catiónicos tradicionales (por ejemplo, DOPE, DC-Chol), lípidos no catiónicos, lípidos modificados por PEG y/o lípidos auxiliares. El lípido catiónico puede comprender una relación molar de aproximadamente 1% a aproximadamente 90%, aproximadamente 2% a aproximadamente 70%, aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 40% del lípido total presente en el vehículo de transferencia, o preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 70% del lípido total presente en el vehículo de transferencia.

[0046] El uso de fosfolípidos modificados por (PEG) de polietilenglicol y lípidos derivatizados tales como cerarmidas derivatizadas (PEG-CER), incluyendo N-octanoílo-esfingosina-1-[succinilo(polietilenglicol de metoxi)-2000] (Ceramida de CS PEG-2000) también se contempla en la presente invención, solo o preferiblemente en combinación con otras formulaciones de lípidos juntas que comprenden el vehículo de transferencia. Lípidos modificados por PEG contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unido covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud C_6-C_{20}. La adición de dichos componentes puede evitar la agregación compleja y también puede proporcionar un medio para aumentar la duración de la circulación y aumentar la administración de la composición de lípido-ácido nucleico a los tejidos diana, (Klibanov y otros (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235 - 237), o se pueden seleccionar para que cambien rápidamente de la formulación *in vivo* (véase la Patente de Estados Unidos Nº 5.885.613). Los lípidos intercambiables particularmente útiles son PEG-ceramidas que tienen cadenas de acilo más cortas (por ejemplo, C14 o C18). El fosfolípido modificado con PEG y los lípidos derivatizados de la presente invención pueden comprender una relación molar de aproximadamente 0% a aproximadamente 20%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, o aproximadamente el 2% del lípido total presente en el vehículo de transferencia liposomal.

[0047] La presente invención también contempla el uso de lípidos no catiónicos. Como se usa en el presente documento, la frase "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido neutro, zwitteriónico o aniónico. Como se usa en este documento, la frase "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que llevan una carga neta negativa a un pH seleccionado, tal como el pH fisiológico. Los lípidos no catiónicos incluyen, pero no se limitan a, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoílo-fosfatidiletanolamina (POPE), dioleoílo-fosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometilo)-ciclohexano-1-carboxilato(DOPE-mal), dipalmitoílo fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoílo-fosfatidilo-etanolamina (DSPE), 16-O-monometilo PE, 16-O-dimetilo PE, 18-1- trans PE, 1-estearoílo-2-oleoílo-fosfatidietanolamina (SOPE), colesterol, o una mezcla de los mismos. Tales lípidos no catiónicos se usan en combinación con otros excipientes, es decir, lípidos catiónicos y lípidos no catiónicos. Cuando se usa en combinación con un lípido catiónico, el lípido no catiónico puede comprender una relación molar de 5% a aproximadamente 90%, o preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 70% del lípido total presente en el vehículo de transferencia.

[0048] El vehículo de transferencia se prepara mediante la combinación de múltiples componentes de lípidos y/o polímeros. Por ejemplo, se puede preparar un vehículo de transferencia usando ceramida DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG-5000 en una relación molar de aproximadamente 1 a 50 : 5 a 65 : 5 a 90 : 1 a 25, respectivamente. Un vehículo de transferencia puede estar compuesto de combinaciones de lípidos adicionales en diversas relaciones, que incluyen, por ejemplo, DSPC/CHOL/DODAP/mPEG-5000 (por ejemplo, combinadas en una relación molar de aproximadamente 33: 40: 25: 2), DSPC/CHOL/DODAP/C8 PEG-2000-Cer (por ejemplo, combinado en una relación molar de aproximadamente 31: 40: 25: 4), POPC/DODAP/CS-PEG-2000-Cer (por ejemplo, combinado en una relación molar de aproximadamente 75-87: 3-14: 10) o DSPC/CHOL/DOTAP/C8 PEG-2000-Cer (por ejemplo, combinados en una relación molar de aproximadamente 31: 40: 25: 4). La selección de lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos modificados con PEG que comprenden el vehículo de transferencia liposomal o la nanopartícula lipídica, así como la relación molar relativa de dichos lípidos entre sí, se basa en las características del lípido seleccionado.), la naturaleza de las células o tejidos diana pretendidos y las características de los ácidos nucleicos a administrar por el vehículo de transferencia liposomal. Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena alquílica, así como el tamaño, la carga, el pH, la pKa, la fusogenicidad y la toxicidad del/los lípido(s) seleccionado(s).

[0049] Los vehículos de transferencia de liposomas para uso en la presente invención se pueden preparar mediante diversas técnicas que son actualmente conocidas en la técnica. Las vesículas multilaminares (MLV) se pueden preparar técnicas convencionales, por ejemplo, depositando un lípido seleccionado en la pared interior de un recipiente o recipiente adecuado disolviendo el lípido en un disolvente apropiado, y luego evaporando el disolvente para dejar una película delgada en el interior del recipiente o mediante secado por pulverización. Luego se puede agregar una fase acuosa al recipiente con un movimiento de vortex que da como resultado la formación de MLV. Las vesículas unilaterales (ULV) pueden formarse entonces por homogeneización, sonicación o extrusión de las vesículas multilaminares. Además, las vesículas unilaminares se pueden formar mediante técnicas de eliminación de detergente.

[0050] En determinadas realizaciones de esta invención, las composiciones de la presente invención contienen un vehículo de transferencia en el que el ARNm terapéutico (por ejemplo, ARNm que codifica OTC) se asocia tanto en la superficie del vehículo de transferencia (por ejemplo, un liposoma) y encapsula dentro del mismo vehículo de transferencia. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, los vehículos de transferencia liposómica catiónica pueden asociarse con el ARNm a través de interacciones electrostáticas con dicho ARNm terapéutico.

[0051] En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se pueden cargar con radionúclidos de diagnóstico, materiales fluorescentes u otros materiales que son detectables tanto en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los materiales de diagnóstico adecuados para uso en la presente invención pueden incluir Rodamina-dioleoilfosfatidiletanolamina (Rh-PE), ARNm de Proteína Fluorescente Verde (ARNm de GFP), ARNm de *Renilla* Luciferasa y ARNm de Luciferasa de Luciérnaga.

[0052] Durante la preparación de vehículos de transferencia de liposomas, agentes portadores solubles en agua pueden encapsularse en el interior acuoso mediante su inclusión en la solución hidratante, y las moléculas lipófilas pueden incorporarse en la bicapa lipídica por la inclusión en la formulación de lípidos. En el caso de ciertas moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos lipófilos catiónicos o aniónicos), la carga del ácido nucleico en los liposomas preformados se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la patente de EE.UU. Nº 4.946.683. Después de la encapsulación del ácido nucleico, los liposomas pueden procesarse para eliminar el ARNm no encapsulado a través de procesos tales como la cromatografía en gel, la diafiltración o la ultrafiltración. Por ejemplo, si es deseable eliminar el ácido nucleico unido externamente de la superficie de la formulación del vehículo de transferencia liposomal, tales liposomas pueden estar sujetos a una columna de Dietilaminoetilo SEPHACEL.

[0053] Además de ácido nucleico encapsulado, uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico se pueden incluir

en el vehículo de transferencia. Por ejemplo, tales agentes terapéuticos adicionales pueden estar asociados con la superficie del liposoma, puede incorporarse en la bicapa lipídica de un liposoma por inclusión en la formulación de lípidos o carga en liposomas preformados (véanse las patentes de Estados Unidos números 5.194.654 y 5.223.263).

[0054] Hay varios métodos para reducir el tamaño, o "dimensionamiento", de vehículos de transferencia liposomal, y cualquiera de estos métodos se pueden emplear generalmente cuando dimensionamiento se utiliza como parte de la invención. El método de extrusión es un método preferido de dimensionamiento de liposomas. (Hope, M J y otros, Reduction of Liposome Size and Preparation of Unilamellar Vesicles by Extrusion Techniques. In: Liposome Technology (G. Gregoriadis, Ed.) Vol. 1. p 123 (1993). El método consiste en extruir liposomas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o una membrana cerámica asimétrica para reducir los tamaños de los liposomas a una distribución de tamaños relativamente bien definidos. Típicamente, la suspensión se cicla a través de la membrana una o más veces hasta que se logre la distribución deseada del tamaño de los liposomas a través de membranas de poros sucesivamente más pequeños para lograr una reducción gradual en el tamaño de los liposomas.

[0055] Una variedad de métodos alternativos conocidos en la técnica están disponibles para el dimensionamiento de una población de vehículos de transferencia liposomal. Uno de tales métodos de dimensionamiento se describe en la patente de EE.UU. Nº 4.737.323. El sonicado de una suspensión de liposomas, ya sea mediante baño o sonicación con sonda, produce una reducción progresiva de tamaño hasta una ULV menor de aproximadamente 0,05 micrómetros de diámetro. La homogeneización es otro método que depende de la energía de corte para fragmentar los liposomas grandes en los más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, se recirculan MLV a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrómetros. El tamaño de las vesículas liposómicas se puede determinar mediante dispersión de luz cuasi eléctrica (QELS) como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10: 421 - 450 (1981).

El diámetro promedio de los liposomas se puede reducir por sonicación de los liposomas formados. Los ciclos intermitentes de sonicación pueden alternarse con la evaluación QELS para guiar la síntesis eficiente de liposomas.

[0056] La selección del tamaño apropiado de un vehículo de transferencia liposomal debe tomar en consideración el sitio de la célula o tejido diana y, en cierta medida, la aplicación para la que se está haciendo el liposoma. Es deseable limitar la transfección de los ácidos nucleicos a ciertas células o tejidos. El hígado representa el órgano diana para las composiciones de la presente invención en parte debido a su papel central en el metabolismo y producción de proteínas y, por consiguiente, las enfermedades causadas por defectos en productos génicos específicos del hígado (por ejemplo, trastornos del ciclo de la urea) pueden beneficiar desde el direccionamiento específico de las células (p. ej., hepatocitos). Las características estructurales del tejido diana se explotan para dirigir la distribución del vehículo de transferencia liposomal a tales tejidos diana. Para dirigirse a los hepatocitos, un vehículo de transferencia liposomal puede dimensionarse de manera que sus dimensiones sean menores que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos en el hígado; en consecuencia, el vehículo de transferencia liposomal puede penetrar fácilmente tales fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos diana. El tamaño del vehículo de transferencia es inferior a 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o 10 nm.

[0057] Las composiciones de la presente invención se distribuyen en las células y tejidos del hígado para facilitar la entrega y la posterior expresión de los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm) comprendida en la misma por las células y tejidos del hígado (por ejemplo, hepatocitos). Aunque tales composiciones se pueden distribuir preferentemente en las células y tejidos del hígado, los efectos terapéuticos de los ácidos nucleicos expresados no necesitan limitarse a las células y tejidos diana. Por ejemplo, los hepatocitos diana pueden funcionar como una "reserva" o un "depósito" capaz de expresar o producir, y excretar sistémicamente una proteína o enzima funcional. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, el vehículo de transferencia liposomal puede dirigir hepatocitos y/o distribuirse preferentemente a las células y tejidos del hígado y tras la administración. Después de la transfección de los hepatocitos diana, los ácidos nucleicos de ARNm cargados en el vehículo liposomal se traducen y se expresa un producto proteico funcional, se excreta y se distribuye sistémicamente. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención comprenden una o más moléculas adicionales (por ejemplo, proteínas, péptidos, aptámeros u oligonucleótidos) que facilitan la transferencia de los ácidos nucleicos del vehículo de transferencia a un compartimento intracelular de la célula diana. En una realización, la molécula adicional facilita la administración de los ácidos nucleicos en, por ejemplo, el citosol, el lisosoma, la mitocondria, el núcleo, las nucleolas o el proteosoma de una célula diana. También se incluyen agentes que facilitan el transporte de la proteína traducida de interés desde el citoplasma a su ubicación intercelular normal (por ejemplo, en la mitocondria) para tratar deficiencias en ese orgánulo. En algunas realizaciones, el agente se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un péptido, un aptámero y un oligonucleótido.

[0058] Las composiciones de la presente invención facilitan la producción endógena de un sujeto de una o más proteínas funcionales, y en particular la producción de proteínas que demuestran menos inmunogenicidad en relación con sus contrapartidas preparadas de forma recombinante. Tras la distribución de las composiciones a tejidos diana y la posterior transfección de tales células diana, el ARNm exógeno cargado en el vehículo de transferencia liposomal puede traducirse *in vivo* para producir una proteína funcional codificada por el ARNm administrado exógenamente (es decir, una proteína en la que el sujeto es deficiente). Por consiguiente, las

composiciones de la presente invención explotan la capacidad de un sujeto para traducir ARNm preparado exógena o recombinantemente para producir una proteína o enzima traducida endógenamente, y de ese modo producir (y cuando corresponda excretar) una proteína o enzima funcional. Las proteínas o enzimas expresadas o traducidas también se pueden caracterizar por la inclusión *in vivo* de modificaciones postraduccionales nativas que a menudo pueden estar ausentes en proteínas o enzimas preparadas de forma recombinante, reduciendo de ese modo adicionalmente la inmunogenicidad de la proteína o enzima traducida.

[0059] La administración de ARNm que codifica una proteína deficiente o enzima evita la necesidad de entregar los ácidos nucleicos a orgánulos específicos dentro de una célula diana (por ejemplo, las mitocondrias). Más bien, tras la transfección de una célula diana y la entrega de los ácidos nucleicos al citoplasma de la célula diana, los contenidos de ARNm de un vehículo de transferencia pueden traducirse y expresarse una proteína o enzima funcional.

[0060] La presente invención también contempla la focalización discriminatoria de las células diana y tejidos tanto por medios de orientación pasivos y activos. El fenómeno de la orientación pasiva explota los patrones de distribución natural de un vehículo de transferencia *in vivo* sin depender del uso de excipientes adicionales o medios para mejorar el reconocimiento del vehículo de transferencia por las células diana. Por ejemplo, es probable que los vehículos de transferencia que están sujetos a fagocitosis por las células del sistema reticuloendotelial se acumulen en el hígado o el bazo y, en consecuencia, pueden proporcionar medios para dirigir pasivamente la administración de las composiciones a tales células diana.

[0061] Alternativamente, la presente invención contempla la orientación activa, que implica el uso de excipientes adicionales, denominados aquí como "ligandos de orientación" que se pueden unir (ya sea covalentemente o no covalentemente) al vehículo de transferencia para promover la localización de dicha transferencia de vehículo en ciertas células diana o tejidos diana. Por ejemplo, la dirección puede estar mediada por la inclusión de uno o más ligandos de dirección endógenos (por ejemplo, apolipoproteína E) en o sobre el vehículo de transferencia para estimular la distribución a las células o tejidos diana. El reconocimiento del ligando de direccionamiento por los tejidos diana facilita activamente la distribución tisular y la captación celular del vehículo de transferencia y/o su contenido en las células y tejidos diana (por ejemplo, la inclusión de un ligando dirigido a apolipoproteína E en o sobre el vehículo de transferencia alienta el reconocimiento y unión del vehículo de transferencia a receptores de lipoproteína de baja densidad endógenos expresados por hepatocitos). Como se proporciona en este documento, la composición puede comprender un ligando capaz de potenciar la afinidad de la composición a la célula diana. Los ligandos dirigidos se pueden unir a la bicapa externa de la partícula lipídica durante la formulación o la postformulación. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Además, algunas formulaciones de partículas lipídicas pueden emplear polímeros fusogénicos tales como PEAA, hemaglutinina, otros lipopéptidos (véanse las solicitudes de patente de los Estados Unidos números 08/835.281 y 60/083.294) y otras características útiles para la administración *in vivo* y/o intracelular. En otras algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención demuestran eficacias de transfección mejoradas, y/o demuestran selectividad mejorada hacia células o tejidos diana. Por lo tanto, se contemplan composiciones que comprenden uno o más ligandos (por ejemplo, péptidos, aptámeros, oligonucleótidos, una vitamina u otras moléculas) que son capaces de potenciar la afinidad de las composiciones y sus contenidos de ácidos nucleicos por las células o tejidos diana. Los ligandos adecuados pueden unirse opcionalmente o unirse a la superficie del vehículo de transferencia. En algunas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede abarcar la superficie de un vehículo de transferencia o estar encapsulado dentro del vehículo de transferencia. Los ligandos adecuados se seleccionan basándose en sus propiedades físicas, químicas o biológicas (por ejemplo, afinidad selectiva y/o reconocimiento de marcadores o características de la superficie celular diana). Los sitios diana específicos de la célula y su ligando de dirección correspondiente pueden variar ampliamente. Los ligandos de direccionamiento adecuados se seleccionan de modo que se explotan las características únicas de una célula diana, permitiendo así que la composición discrimine entre células diana y no diana. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden llevar marcadores superficiales (p. ej., apolipoproteína B o apolipoproteína E) que mejoran selectivamente el reconocimiento o la afinidad a los hepatocitos (p. ej., mediante el reconocimiento y unión a dichos marcadores de superficie por parte del receptor) Además, se esperaría que el uso de galactosa como ligando de direccionamiento dirigiera las composiciones de la presente invención a hepatocitos parenquimatosos, o alternativamente, se esperaría que el uso de residuos de azúcar que contienen manosa como ligando de direccionamiento dirigiera las composiciones de la presente invención a células endoteliales hepáticas (por ejemplo, manosa que contiene residuos de azúcar que se pueden unir preferentemente al receptor de la asialoglicoproteína presente en los hepatocitos). (Véase Hillery AM, et al. "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc.) La presentación de tales ligandos dirigidos que se han conjugado con restos presentes en el vehículo de transferencia facilita el reconocimiento y la absorción de las composiciones de la presente invención en células y tejidos diana. Los ejemplos de ligandos de direccionamiento adecuados incluyen uno o más péptidos, proteínas, aptámeros, vitaminas y oligonucleótidos.

[0062] Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, primates no humanos, roedores, y similares, al que las composiciones de la presente invención son administradas. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en este documento en referencia a un sujeto humano.

[0063] Tal como se utiliza aquí, el término "célula diana" se refiere a una célula o tejido al que se va a dirigir una composición de la invención. En algunas realizaciones, las células diana son deficientes en una proteína o enzima de interés. Ya que se desea administrar un ácido nucleico a un hepatocito, el hepatocito representa la célula diana. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención transfectan las células diana sobre una base discriminatoria (es decir, no transfectan células que no son diana). Las composiciones de la presente invención se preparan para dirigirse preferentemente a los hepatocitos.

[0064] Después de la transfección de una o más células diana por las composiciones y los ácidos nucleicos de la presente invención, la expresión de la proteína codificada por dicho ácido nucleico se pueden estimular preferiblemente y la capacidad de tales células diana para expresar la proteína de interés se mejora. Por ejemplo, la transfección de una célula diana con un ARNm OTC permitirá la expresión del producto de proteína OTC después de la traducción del ácido nucleico.

[0065] Los trastornos metabólicos de ciclo de urea y deficiencias de proteínas generalmente pueden ser susceptibles de tratamiento con las composiciones proporcionadas en el presente documento. Los ácidos nucleicos de las composiciones proporcionadas en la presente memoria codifican una proteína y preferiblemente codifican un producto cuya producción *in vivo* se desea.

[0066] Los trastornos metabólicos de ciclo de urea representan ejemplos de proteínas y deficiencias enzimáticas que pueden ser tratadas utilizando los métodos y composiciones descritas en este documento. Tales trastornos metabólicos del ciclo de la urea incluyen la deficiencia de OTC, deficiencia de sintetasa de arginosuccinato (ASD) y deficiencia de liasa de argininosuccinato (ALD). Por lo tanto, en algunas realizaciones, el ácido nucleico de los métodos y composiciones descritas en la presente memoria codifican una enzima implicada en el ciclo de la urea, que incluye, por ejemplo, transcarbamilasa de ornitina (OTC), sintetasa de fosfato de carbamilo (CPS), sintetasa de arginino-succinato 1 (ASS1) liasa de argininosuccinato (ASL) y arginasa (ARG).

[0067] Cinco trastornos metabólicos que resultan de defectos en la biosíntesis de las enzimas que intervienen en el ciclo de la urea se han descrito, e incluyen transcarbamilasa de ornitina (OTC), sintetasa de fosfato de carbamilo (CPS), sintetasa de argininosuccinato 1 (ASS1), liasa de argininosuccinato (ASL) y arginasa (ARG). De estos cinco trastornos metabólicos, la deficiencia de OTC es la más común y ocurre en aproximadamente uno de cada 80,000 nacimientos.

[0068] OTC es una enzima mitocondrial homotrimérica que se expresa casi exclusivamente en el hígado y que codifica una proteína de OTC precursor que se escinde en dos etapas después de la incorporación en la matriz mitchondrial. (Horwich AL., y col., Cell 1986; 44: 451 - 459). La deficiencia de OTC es un trastorno genético que resulta en una forma mutada y biológicamente inactiva de la enzima de transcarbamilasa de ornitina. La deficiencia de OTC a menudo se vuelve evidente en los primeros días de vida, típicamente después de la ingestión de proteínas. En la forma grave y clásica de la deficiencia de OTC, en los primeros días de vida los pacientes presentan letargo, convulsiones, coma e hiperamonemia grave, lo que conduce rápidamente a un desenlace fatal y en deterioro sin una intervención médica adecuada. (Monish S., et al., Genetics for Pediatricians; Remedica, Cold Spring Harbor Laboratory (2005)). Si se trata incorrectamente o si no se trata, las complicaciones de la deficiencia de OTC pueden incluir retraso en el desarrollo y retraso mental. Los sujetos deficientes en OTC también pueden presentar daño hepático progresivo, lesiones en la piel y cabello quebradizo. En algunas personas afectadas, los signos y síntomas de la deficiencia de OTC pueden ser menos graves y pueden no aparecer hasta más adelante en la vida.

[0069] El gen *OTC*, que se encuentra en el brazo corto del cromosoma X en la banda de Xp21.1, abarca más de 85 kb y está compuesto de 10 exones que codifican una proteína de 1062 aminoácidos. (Lindgren V., y col., Science 1984; 226: 698-7700; Horwich, AL., y col., Science 224: 1068-1074, 1984; Horwich, AL. y col., Cell 44: 451-459, 1986). ; Hata, A., y col., J. Biochem. 100: 717-725, 1986. La enzima OTC cataliza la conversión de ornitina y fosfato de carbamoílo a citrulina. Al estar *OTC* en el cromosoma X, las mujeres son principalmente portadoras mientras que los machos con mutaciones no conservativas rara vez sobreviven más allá de las 72 horas de nacimiento.

[0070] En sujetos sanos, *OTC* se expresa casi exclusivamente en las mitocondrias hepatocelulares. Aunque no se expresa en el cerebro de sujetos sanos, la deficiencia de OTC puede conducir a trastornos neurológicos. Por ejemplo, uno de los síntomas habituales de la deficiencia de OTC, que es heterogéneo en su presentación, es un coma hiperamonémico (Gordon, N., Eur J Paediatr Neurol 2003; 7: 115-121).

[0071] La deficiencia de OTC es muy heterogénea, con más de 200 mutaciones únicas notificadas y grandes deleciones que representan aproximadamente el 10-15% de todas las mutaciones, mientras que el resto generalmente comprende mutaciones de punto sin sentido con un menor número de mutaciones sin sentido, sitio de empalme y deleción pequeña. (Monish A., *et al.)* El fenotipo de la deficiencia de OTC es extremadamente heterogéneo, que puede ir desde el coma agudo hiperamonémico neonatal hasta adultos hemicigóticos asintomáticos. (Gordon N. Eur J Paediatr Neurol 2003; 7: 115 - 121). Aquellas mutaciones que resultan en enfermedad neonatal severa y amenazante se agrupan en dominios estructurales y funcionales importantes en el interior de la proteína en sitios de actividad enzimática o en la superficie de intercadena, mientras que las

mutaciones asociadas con enfermedad de inicio tardío se localizan en la superficie de la proteína (Monish A., *et al.*) Los pacientes con formas leves o parciales de deficiencia de OTC pueden tener la aparición de la enfermedad más adelante en la vida, que puede presentarse como vómitos recurrentes, cambios neuroconductuales o convulsiones asociadas con hiperamonemia.

[0072] Las composiciones de la presente invención, son ampliamente aplicables a la administración de ácidos nucleicos y, en particular ARNm, para tratar una serie de trastornos. Las composiciones de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la deficiencia de proteínas. En una realización, los ácidos nucleicos de la presente invención codifican proteínas o enzimas funcionales que se excretan o secretan por la célula diana en el fluido extracelular circundante (por ejemplo, ARNm que codifica hormonas y neurotransmisores). Alternativamente, en otra realización, los ácidos nucleicos de la presente invención codifican proteínas o enzimas funcionales que permanecen en el citosol de la célula diana (por ejemplo, ARNm que codifica trastornos metabólicos del ciclo de la urea). Otros trastornos para los cuales la presente invención son útiles incluyen trastornos tales como atrofia muscular espinal (SMA) relacionada con SMNI; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); galactosemia relacionada con GALT; Fibrosis quística (CF); Trastornos relacionados con SLC3Al que incluyen cistinuria; trastornos relacionados con COL4A5 que incluyen el síndrome de Alport; deficiencias de galactocerebrosidasa; Adrenoleucodistrofia ligada a X y adrenomieloneuropatía; Ataxia de Friedreich; Enfermedad de Pelícaeus-Merzbacher; TSC1 y esclerosis tuberosa relacionada con TSC2; Síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB); Cistinosis relacionada con CTNS; trastornos relacionados con FMR1 que incluyen el síndrome de X frágil, el síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil y el síndrome de falla de ovario frágil X prematuro; Síndrome de Prader-Willi; telingiectasia hemorrágica hereditaria (AT); Enfermedad de Niemann-Pick tipo C1; enfermedades relacionadas con la lipofuscinosis ceroide neuronal incluyendo la Lipofuscinosis Ceroide Neonatal Juvenil (JNCL), la enfermedad de Batten juvenil, la enfermedad de Santavuori-Haltia, la enfermedad de Jansky-Bielschowsky y las deficiencias de PTT-1 y TPP1; Ataxia infantil EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 y EIF2B5 con hipomielinización del sistema nervioso central/materia blanca desaparecida; CACNA1A y ataxia episódica relacionada con CACNB4 tipo 2; trastornos relacionados con MECP2, incluido el síndrome de Rett clásico, encefalopatía neonatal grave relacionada con MECP2 y síndrome PPM-X; síndrome de Rett atípico relacionado con CDKL5; Enfermedad de Kennedy (SBMA); Arteriopatía cerebral autosómica dominante relacionada con Notch-3 con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); SCN1A y SCN1B relacionados con trastornos convulsivos; los trastornos relacionados con la polimerasa G que incluyen el síndrome de Alpers-Huttenlocher, la neuropatía atáxica sensorial relacionada con POLG, la disartria y la oftalmoparesia, y la oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante y recesiva con deleciones de ADN mitocondrial; Hipoplasia suprarrenal ligada a X; Agammaglobulinemia ligada a X; y la enfermedad de Wilson. En una realización, los ácidos nucleicos, y en particular ARNm, de la presente invención pueden codificar proteínas o enzimas funcionales. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden incluir ARNm que codifica eritropoyetina, α1-antitripsina, carboxipeptidasa N u hormona de crecimiento humana.

[0073] Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden codificar anticuerpos de longitud completa o anticuerpos más pequeños (por ejemplo, tanto las cadenas ligeras como pesadas) para conferir inmunidad a un sujeto. Aunque una realización de la presente invención se refiere a composiciones útiles para conferir inmunidad a un sujeto (por ejemplo, mediante la traducción de ácidos nucleicos de ARNm que codifican anticuerpos funcionales), las invenciones descritas en la presente y contempladas en la presente son ampliamente aplicables. En una realización alternativa, las composiciones de la presente invención codifican anticuerpos que pueden usarse para efectuar de manera transitoria o crónica una respuesta funcional en sujetos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de ARNm de la presente invención pueden codificar un anticuerpo monoclonal o policlonal funcional, que tras la traducción (y según corresponda, la excreción sistémica de las células diana) puede ser útil para dirigir y/o inactivar un objetivo biológico (por ejemplo, una citoquina estimuladora tal como el factor de necrosis tumoral). De manera similar, los ácidos nucleicos de ARNm de la presente invención pueden codificar, por ejemplo, anticuerpos funcionales anti-factor nefríticos útiles para el tratamiento de glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II o síndrome urémico hemolítico agudo, o alternativamente pueden codificar factor de crecimiento endotelial anti-vascular (VEGF). Anticuerpos útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por VEGF, tales como el cáncer.

[0074] Las composiciones de la presente invención se pueden administrar a un sujeto. En algunas realizaciones, la composición se formula en combinación con uno o más ácidos nucleicos adicionales, vehículos, ligandos de direccionamiento o reactivos de estabilización, o en composiciones farmacológicas donde se mezcla con excipientes adecuados. Por ejemplo, en una realización, las composiciones de la presente invención se pueden preparar para administrar ARNm que codifica dos o más proteínas o enzimas distintas. Alternativamente, las composiciones de la presente invención se pueden preparar para administrar un único ácido nucleico y dos o más poblaciones o tales composiciones se pueden combinar en una única forma de dosificación o coadministrarse a un sujeto. Las técnicas para formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., Última edición.

[0075] Las composiciones de la presente invención se pueden administrar y dosificar de acuerdo con la práctica médica actual, habida cuenta de la condición clínica del sujeto, el sitio y método de administración, la programación de administración, la edad, el sexo, el peso del cuerpo y otros factores relevantes para los expertos en la técnica en la técnica. La "cantidad efectiva" para los fines del presente documento puede determinarse mediante consideraciones relevantes que son conocidas por los expertos en la investigación clínica experimental, las técnicas

farmacológicas, clínicas y médicas. En algunas realizaciones, la cantidad administrada es eficaz para lograr al menos cierta estabilización, mejora o eliminación de síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas del progreso, la regresión o la mejora de la enfermedad por los expertos en la materia. Por ejemplo, una cantidad adecuada y un régimen de dosificación es uno que causa al menos una expresión transitoria del ácido nucleico en la célula diana.

[0076] En una realización, las composiciones de la presente invención se formulan de tal manera que son adecuadas para la liberación prolongada de los ácidos nucleicos contenidos en ella. Dichas composiciones de liberación prolongada se pueden administrar convenientemente a un sujeto a intervalos de dosificación extendidos. Por ejemplo, en una realización, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces al día, diariamente o cada dos días. En una realización preferida, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces por semana, una vez a la semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, o más preferiblemente cada cuatro semanas, una vez al mes, cada seis semanas., cada ocho semanas, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis meses, cada ocho meses, cada nueve meses o anualmente. Preferiblemente, los medios de liberación prolongada empleados se combinan con modificaciones hechas al ácido nucleico para mejorar la estabilidad.

[0077] Mientras que ciertas composiciones de la presente invención se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar las composiciones de la invención y no están destinados a limitar la misma.

[0078] Los artículos "un" y "una" tal como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, debe entenderse que incluyen los referentes en plural. Las descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, empleados o relevantes para un producto o proceso determinado, a menos que así lo indique el contrario o de otra manera evidente del contexto.
Cuando los elementos se presentan como listas, (por ejemplo, en el grupo Markush o en un formato similar) debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se revela, y cualquier elemento puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se hace referencia a la invención, o aspectos de la invención, que comprenden elementos particulares, características, etc., ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente de, tales elementos, características, etc. Con fines de simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto específicamente en todos los casos aquí en tantas palabras.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación general de vehículos de transferencia mediante la técnica de dilución con disolvente

[0079] En este ejemplo se ilustra en general un proceso para la fabricación de pequeñas formulaciones liposomales (<100 nm) que contienen ARNm y los medios para evaluar la cantidad de ARNm de encapsulado. Los parámetros que pueden modificarse para optimizar aún más la eficacia de la transfección incluyen, pero no se limitan a, la selección de lípidos, la relación de lípidos, la relación molar del lípido que contiene PEG, la longitud del anclaje lipídico del lípido que contiene PEG y el tamaño de los vehículos de transferencia liposomal.

[0080] Se pesaron cantidades apropiadas de lípidos (por ejemplo, DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG2000-Cer) para construir un vehículo de transferencia de una relación de lípidos deseada (por ejemplo, una relación molar de 31: 40: 25: 4) disuelta en etanol absoluto a 70°C para obtener las proporciones y concentraciones de lípidos deseadas. Con el fin de controlar el lípido, se añadió rutinariamente una pequeña cantidad (típicamente 0,05% molar) de rodamina-dioleoilfosfatidiletanolamina (Rh-PE) a la solución lipídica.

[0081] El ARNm, por ejemplo, que codifica para GFP, OTC o Luciferasa se desnaturalizó por calentamiento durante 10 minutos a 70°C, seguido de enfriamiento en hielo. Esta solución se analizó para confirmar la concentración de ARNm antes de la formulación. Se diluyó una alícuota de ARNm con agua, y luego se combinó con un volumen igual de tampón citrato 10 mM pH 5,0 de manera que el contenido final de citrato después de la adición de lípidos (del disolvente) fue de 4 mM.

[0082] Las soluciones ARNm/tampón de citrato se calentaron a 90°C durante 5 minutos para desnaturalizar completamente el ARNm. Mientras que se agitaba o se agitaba vorticialmente el ARNm desnaturalizado, se añadió la solución de lípido etanólico (a 70°C) al ARNm para generar vesículas multilaminares (MLV). Los MLV se enfriaron luego a 70°C antes de la extrusión. Para muestras preparadas a altas concentraciones de disolvente (> 20%), las MLV se diluyeron con tampón de citrato 5 mM pH 5,0 (a 70°C) para producir una concentración de disolvente del 20% antes de la extrusión para generar vesículas unilaminares grandes (LUY).

[0083] MLVs se extruyeron a 70°C a través de 3 filtros de policarbonato apilados de 80 nm, usando un extrusor de termo-encamisado. Se usaron rutinariamente cinco pases para generar vesículas unilaminares grandes (LUV) del

intervalo de tamaño deseado. Después de la extrusión, las formulaciones se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm para eliminar pequeñas cantidades de material en partículas que tendían a interferir con la determinación del tamaño de la vesícula.

[0084] El ARNm que no estaba asociado con los liposomas o estaba asociado con la superficie exterior de los liposomas que contenían DODAP se eliminó mediante intercambio aniónico, de forma que todo el ARNm asociado restante se encapsuló en los liposomas. Dos métodos adecuados incluyen el uso de intercambio aniónico usando unidades Acrodisc con membranas MUSTANG Q (Pall Life Sciences), o intercambio aniónico usando DEAE-SEPHACEL (Sigma-Aldrich, suspensión en 20% de etanol). Estas técnicas permitieron la eliminación eficiente de ARNm no encapsulado sin una dilución significativa de las formulaciones.

[0085] Después de la eliminación del ARNm externa, el tampón puede ser intercambiado por el uso de columnas de filtración en gel PD-10 (SEPHA- DEX G-25, GE Healthcare) usando un protocolo de giro, que permite constituyentes de bajo peso molecular (tales como disolvente y borato) en la formulación del liposoma que se retendrá en el gel y se reemplazará por el tampón de equilibrado, sin una dilución significativa de la muestra. Alternativamente, en algunos experimentos, el disolvente puede eliminarse e intercambiarse el tampón usando un cartucho de diafiltración Spectrum 500.000 MWCO. Las muestras se ultrafiltraron a 2-10 ml, luego se diafiltraron contra 10 volúmenes de lavado del tampón final deseado para eliminar el disolvente e intercambiar el tampón. La muestra a veces se concentró aún más por ultrafiltración después del proceso de diafiltración.

[0086] Para cuantificar ARNm en muestras con relaciones bajas lípido:ARNm, una curva estándar de ARNm se preparó diluyendo la solución madre con agua para obtener las normas en el intervalo de 0-200 µg/mL. Las muestras se diluyeron (en función de las concentraciones esperadas de ARNm) con el tampón apropiado para producir concentraciones de ARNm dentro del intervalo estándar. Se combinaron alícuotas de 180 µL de los estándares o muestras con 300 µL de SDS al 5% y 120 µL de etanol. Las muestras se incubaron durante 10 min. a 50°C para disolver el lípido. Después de enfriarse, las muestras se transfirieron por duplicado (alícuotas de 250 µL) a los pocillos de una microplaca transparente a los rayos UV. Se midió la absorbancia a 260 nm y se calculó la concentración de ARNm en las muestras a partir de la curva estándar. En las muestras en las que la relación lípido: ARNm (peso: peso) era 10: 1 (relación diana) o inferior, la interferencia de los lípidos con la absorbancia a 260 nm era relativamente baja y podía ignorarse.

[0087] En las muestras en las que la relación de lípido: ARNm (peso: peso) era mayor que 10: 1, la interferencia de lípidos se hizo más significativa como la cantidad de lípido aumentado, y por lo tanto el lípido tuvo que ser retirado con el fin de cuantificar con precisión el ARNm contenido. Se preparó una curva estándar de ARNm diluyendo la solución madre con agua para obtener patrones en el rango de 0-250 µg/ml. Las muestras a evaluar se diluyeron (en función de las concentraciones esperadas de ARNm) con el tampón apropiado para producir concentraciones de ARNm dentro del rango estándar. 180 µL de los estándares o muestras se combinaron con 20 µL de borato de sodio 0,1 M (para aumentar el pH, neutralizando así la carga en el DODAP en las muestras de liposomas y haciendo que el ARNm se disocie del DODAP). Se añadieron 600 µL de cloroformo: metanol (1: 2, v: v) a cada estándar o muestra y las muestras se agitaron en vórtice. Se añadieron 200 µL de cloroformo con agitación vorticial seguido de la adición de 200 µL de agua. Las muestras se agitaron vorticialmente vigorosamente y luego se centrifugaron durante 2 min. a 1000xg para separar las fases. Partes alícuotas de 250 µL de la fase superior (acuosa) se transfirieron (por duplicado) a los pocillos de una microplaca transparente a UV y se midió la absorbancia a 260 nm. La concentración de ARNm en las muestras se calculó a partir de la curva estándar. Obsérvese que para muestras de liposomas que contienen DOTAP (o cualquier otro lípido catiónico que no puede neutralizarse mediante incubación a pH alto), este ensayo no es adecuado para determinar la concentración de ARNm ya que el ARNm no se puede disociar del DOTAP y una proporción del ARNm tiende a ser extraída en la fase de disolvente ($CHCl_3$) junto con el lípido.

[0088] La encapsulación de ARNm se determinó por separación de las muestras en columnas de DEAE-SEPHACEL del siguiente modo (gel de intercambio aniónico). Usando pipetas Pasteur de vidrio de 2 mL tapadas con lana de vidrio, se vertieron columnas de DEAE-SEPHACEL y se equilibraron con 5 volúmenes (~ 10 mL) de cloruro de sodio 145 mM-tampón de borato 10 mM, pH 8,0. Se cargaron 0,5 mL de muestra en una columna y se recogió el eluato. Las columnas se lavaron con alícuotas de 7x0,5 mL de cloruro de sodio 145 mM-tampón de borato 10 mM, pH 8, 0, recogiendo cada fracción eluida por separado. La muestra inicial y cada alícuota se analizaron para determinar el ARNm y el lípido como se describió anteriormente. El % de encapsulación se calculó mediante 100 x (ARNm/lípido) de material eluido de la columna/(ARNm/lípido) de la muestra inicial). En base a la concentración de ARNm calculada a partir de los análisis de extracción descritos anteriormente, las muestras de ARNm liposómico se diluyeron a una concentración de ARNm deseada (1 µg) en un volumen total de 5 µL (es decir, 0,2 mg/mL).

Ejemplo 2

Preparación de ceramida DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG-2000 (relación molar de 31: 40: 25: 4)/ARNm de luciferasa de Renilla (Formulación 1)

[0089] La formulación 1 se preparó disolviendo las masas apropiadas de DSPC, CHOL, DODAP y ceramida C8-PEG-2000 en etanol absoluto, luego añadiéndolas a una solución de ARNm de luciferasa de *Renilla* en tampón para

producir MLV a 10,8 mg/mL de lípido, 250 µg/ml de ARNm, disolvente al 20%. Los MLV se extruyeron para producir LUV, y luego se pasaron a través de un filtro de 0,2 µm. El pH se incrementó al combinarse con un volumen igual de NaCl 100 mM-borato 50 mM pH 8,0 y el ARNm externo se eliminó mediante intercambio aniónico usando el método de centrifugación DEAE-Sephacel, como se describe en el Ejemplo 1. El disolvente se eliminó, el tampón externo se intercambió y la muestra concentrada por diafiltración/ultrarfiltración. La muestra concentrada se pasó luego a través de un filtro de 0,2 µm y las alícuotas se transfirieron a viales y se almacenaron a 2-8°C.

Ejemplo 3

Preparación de ceramida DSPC/CHOL/DOTAP/C8-PEG-2000 (relación molar de 31: 40: 25: 4)/ARNm de luciferasa de Renilla (Formulación 2)

[0090] La formulación 2 se preparó usando una metodología similar a la Formulación 1 con cambios menores. En resumen, las masas apropiadas de DSPC, CHOL, DOTAP y ceramida C8-PEG-2000 se disolvieron en etanol absoluto y luego se añadieron a una solución de ARNm de luciferasa *Renilla* en tampón para producir MLV a 10,8 mg/mL de lípido, 250 µg/mL de ARNm, 20% de disolvente. Los MLV fueron extruidos para producir LUV. Al utilizarse DOTAP en esta formulación, el ARNm externo no pudo eliminarse eficazmente mediante intercambio aniónico y, por lo tanto, esta etapa se omitió. El disolvente se eliminó, el tampón externo se intercambió y la muestra se concentró por diafiltración/ultrafiltración. La muestra concentrada se pasó luego a través de un filtro de 0,2 µm y las alícuotas se transfirieron a viales y se almacenaron a 2-8°C.

Ejemplo 4

Preparación de ceramida DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG-2000 (relación molar de 31: 40: 25: 4) ARNm de Luciferasa de luciérnaga (Formulación 3)

[0091] Para preparar la Formulación 3 las masas apropiadas de DSPC, CHOL, DODAP y ceramida C8-PEG-2000 se disolvieron en etanol absoluto, después se añadió a una solución de luciferasa de luciérnaga ARNm en tampón para producir MLVs a 10,8 mg/mL de lípidos, ARNm de 250 µg/ml, disolvente al 20%. Los MLV se extruyeron para producir LUV, y luego se pasaron a través de un filtro de 0,2 µm. Se aumentó el pH combinando con 0,1 volúmenes de borato de sodio 0,1 M y se eliminó el ARNm externo mediante intercambio aniónico usando el método de columna DEAE-Sephacel descrito en el Ejemplo 1. Se eliminó el disolvente, se cambió el tampón externo y se concentró la muestra mediante diafiltración/ultrafiltración. La muestra concentrada se pasó luego a través de un filtro de 0,2 µm y las alícuotas se transfirieron a viales y se almacenaron a 2-8°C.

Ejemplo 5

Preparación de ceramida DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG-2000 (relación molar de 31: 40: 2: 4) ARNm de lMurina OTC (Formulación 4)

[0092] La formulación 4 se preparó disolviendo la masa apropiada de DSPC, CHOL, DODAP y ceramida C8-PEG-2000 en etanol absoluto, luego añadiéndola a una solución de ARNm de OTC murino en tampón para producir MLV a 10,8 mg/mL de lípido, ARNm de 250 µg/ml, disolvente al 20%. Los MLV se extruyeron para producir LUV, y luego se pasaron a través de un filtro de 0,2 µm. El pH se aumentó combinando con 0,1 volúmenes de borato de sodio 0,1 M y el ARNm externo se eliminó mediante intercambio aniónico usando el método de columna DEAE-Sephacel como se describe en el Ejemplo 1. El disolvente se eliminó, el tampón externo se intercambió y la muestra se concentró por diafiltración/ultrafiltración. La muestra concentrada se pasó luego a través de un filtro de 0,2 µm y las alícuotas se transfirieron a viales y se almacenaron a 2-8°C.

Ejemplo 6

Preparación y caracterización del lípido éster de colesterol imidiazol (3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-dimetilo-17-((R)-6-metilheptan-2-ilo)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenanten-3-ilo 3-(1H-imidazol-4-ilo)propanoato; Imidazol Colesterol Ester (ICE)

[0093] La FIG. 1 representa el esquema de reacción para la síntesis de ICE. Una mezcla de tritilo-deamino-histidina (**1**), (1,97 g, 5,15 mmol), colesterol (**2**), (1,97 g, 5,1 mmol), diciclohexilcarbodiimida (**DCC**), (2,12 g, 5,2 mmol) y dimetilamino-piridina (**DMAP**), (0,13 g, 1,0 mmol) en benceno anhidro (100 ml) se agitó a temperatura ambiente durante dos días. La suspensión resultante se filtró a través de Celite y el filtrado se eliminó a presión reducida. La espuma resultante se secó a alto vacío durante la noche para proporcionar el éster en bruto (3) que se usó en la siguiente etapa sin purificación.

[0094] El éster en bruto (**3**) se disolvió en diclorometano anhidro (**DCM**), (200 ml) y ácido trifluoroacético (**TFA**), (50 ml) se añadió a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió $NaHCO_3$ saturado acuoso (250 ml) cuidadosamente, seguido de Na_2CO_3 sólido hasta que fue ligeramente básico.

[0095] Las fases se separaron y la capa acuosa se extrajo con DCM (200 ml). Las fases orgánicas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron (Na_2SO_4) y se filtraron. El filtrado resultante se evaporó y el residuo se secó a alto vacío durante la noche. La purificación por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, cloroformo de metanol al 0-10%) proporcionó el producto puro deseado (**4**) (1,07 g, rendimiento del 37% para dos etapas) como un sólido blanco (mp: 192-194ºC).
^{1}H RMN ($CDCl_3$): δ 0,66 (s, 3H), 0,84-1,64 (m, 33H), 1,76-2,05 (m, 5H), 2,29 (d, 2H), 2,63 (t, 2H), 2,90 (t, 2H), 4,61 (m, 1 H), 5,36 (d, 1 H), 6,80 (s, 1 H), 7,53 (s, 1 H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ 11,9, 18,8, 19,4, 21,1, 21,6, 22,6, 22,9, 23,9, 24,4, 27,8, 28,1, 28,3, 31,9, 34,5, 35,9, 36,3, 36,7, 37,0, 38,2, 39,6, 39,8, 42,4, 50,1, 56,2, 56,8, 74,1, 122,8, 134,7, 139,6, 173,4. APCI(+)-MS (m/z): Calc. 509, Encontrado 509. Elem. Anal. (C,H,N): Calc. 77.90, 10,30, 5,51; Encontrado 77,65, 10,37, 5,55.

Ejemplo 7

Protocolo de formulación

[0096] Un mensajero ARN de luciferasa de luciérnaga optimizado por codones representado por SEQ ID NO: 1 (FFL ARNm) se sintetizó por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN de plásmido que codifica el gen, que fue seguido por la adición de una estructura de tapa 5' (Cap1) y una cola de poli(A) de 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud determinada por electroforesis en gel. (Véase, *por ejemplo,* Fechter, P. y col., J. Gen. Virology, 86, 1239-1249 (2005).)

Las regiones 5' y 3' no traducidas presentes en el producto de ARNm de FFL están subrayadas (SEQ ID NO: 1).
[0097] Vehículos de transferencia en forma de nanopartículas se formaron a través de métodos de inyección de etanol estándar. (Véase, *por ejemplo,* Ponsa, M., y col., Int. J. Pharm. 95, 51-56 (1993)). Las soluciones stock etanólicas de los lípidos se prepararon previamente con una concentración de 50 mg/mL y se almacenaron a -20°C. El ARNm de FFL se almacenó en agua a una concentración final de 1 mg/mL a -80°C hasta el momento del uso.

[0098] Todas las concentraciones ARNm se determinaron mediante el ensayo Ribogreen (Invitrogen). La encapsulación del ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1%. Se determinaron los tamaños de partículas (dispersión dinámica de la luz (DLS)) y los potenciales zeta utilizando un instrumento Malvern Zetasizer en 1x PBS y soluciones ImM KCl, respectivamente.

[0099] Se mezclaron alícuotas de 50 mg/mL de soluciones etanólicas de un lípido de éster de colesterol de imidazol (ICE), DOPE y DMG-PEG-2000 y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 mL. La relación molar del vehículo de transferencia preparado ICE: DOPE: DMG-PEG-2000 fue de 70: 25: 5. Por separado, una solución acuosa tamponada (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de FFL ARNm se preparó a partir de una reserva de 1 mg/mL. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8°C. La concentración final fue igual a 1,73 mg/mL de ARNm de CO-FF (encapsulado), la Z_{ave} fue igual a 68,0nm (con un $Dv_{(50)}$ de 41,8nm, y una $Dv_{(90)}$ de 78,0nm) y el potencial Zeta fue igual a +25,7 mV.

Análisis de biodistribución

[0100] Todos los estudios se realizaron usando ratones CD-1 hembra de aproximadamente 3 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Las muestras se introdujeron mediante una única inyección en bolo-vena de cola de una dosis total equivalente de 200 µg de ARNm de FFL encapsulado. Cuatro horas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y perfundieron con solución salina.

[0101] Se recogió el hígado y el bazo de cada ratón, repartidos en tres partes, y se almacenan en cualquiera de (i) 10% formalina tamponada neutra, (ii) congelados instantáneamente y almacenados a -80°C para el análisis de bioluminiscencia (véase a continuación), o para estudios de hibridación *in situ*, o (iii) secciones de hígado se aislaron en baño de isopentano (2-metilbutano), se mantuvieron a -35°C, se enjuagaron con 1x PBS y se golpearon ligeramente con kimwipe para eliminar cualquier exceso de líquido. colocado en el baño durante aproximadamente 5-7 minutos, después de lo cual se extrajo el hígado, se envolvió en papel de aluminio y se almacenó en una bolsa de plástico estéril pequeña a -80°C hasta que estuvo lista para el ensayo.

[0102] El ensayo de bioluminiscencia se realizó usando un sistema de ensayo de luciferasa Promega (artículo nº E1500 Promega). La preparación tisular se realizó de la siguiente manera: Se descongelaron porciones de la muestra de tejido deseada (congelada instantáneamente), se lavaron con agua RODI y se colocaron en un tubo de homogeneización de perlas de cerámica. El tejido se trató con tampón de lisis y se homogeneizó. Tras someterse a cinco ciclos de congelación/descongelación seguidos de centrifugación a 4ºC, el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de microcentrífuga. Se repiten y se almacenan extractos de tejidos a -80°C.

[0103] El reactivo de ensayo de luciferasa se preparó añadiendo 10mL de tampón de ensayo de luciferasa a sustrato de ensayo de luciferasa y se mezcla a través de vórtice. 20 uL muestras de homogeneizado se cargó en

una placa de 96 pocillos seguido de 20 µL de control de la placa para cada muestra. Por separado, se cargaron 120 µL de reactivo de ensayo de luciferasa (preparado como se describió anteriormente) en cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos. Cada placa se insertó en las cámaras apropiadas utilizando un instrumento Molecular Device Flex Station y se midió la luminiscencia (medida en unidades relativas de luz (RLU)).

Hibridación in situ

Preparación de portaobjetos de tejidos

[0104] La preparación y el análisis de portaobjetos se realizaron de la siguiente manera: cada hígado se congeló a -35ºC de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Los hígados congelados se cortaron en secciones de 6 micrómetros y se montaron en portaobjetos de microscopio de vidrio. Antes de la hibridación *in situ*, las secciones se fijaron en formaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se trataron con anhídrido trienttanolamina/acético y se lavaron y deshidrataron a través de una serie de soluciones de etanol.

Preparación de la sonda de ARNc

[0105] Plantillas de ADN fueron diseñadas consistiendo de pBSKII + vector conteniendo sitios de restricción de EcoRI y XbaI para la generación de hebras antisentido y sentido, respectivamente. Los transcritos de ARNc se sintetizaron a partir de estas plantillas de ADN (cadenas antisentido y sentido, cada una de 700 pb) con polimerasa ARN T3 y T7, respectivamente. Las plantillas se validaron mediante síntesis de sonda fría de ARN antes de hacer ribosondas con ^{35}S-UTP. Tanto las ribosondas radiomarcadas antisentido como las de sentido se sintetizaron *in vitro* según el protocolo del fabricante (Ambion) y se marcaron con 35S-UTP (>1.000Ci/mmol).

Hibridación y procedimientos de lavado

[0106] Las secciones se hibridaron durante la noche a 55°C en formamida desionizada, NaCl 0,3 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, $Na_2HPO_4$10 mM, 10% de sulfato de dextrano, reactivo de Denhardt 1X, 50 µg/ml ARN de levadura total y 50-80,000 cpm/µL 35S sonda marcada de ARNc. Los tejidos se sometieron a un lavado riguroso a 65°C en formamida al 50%, 2X SSC, DTT 10 mM y se lavaron en PBS antes del tratamiento con 20 µg/ml de ARNasa A a 37°C durante 30 minutos. Después de lavados en 2X SSC y 0,1X SSC durante 10 minutos a 37°C, los portaobjetos se deshidrataron y se expusieron a la película de rayos X Kodak BioMaxMR durante 90 minutos y luego se sometieron a autorradiografía en emulsión durante 11 y 24 horas de exposición.

Imágenes de secciones de hígado

[0107] El desarrollo fotográfico se llevó a cabo en Kodak D-19. Las secciones se contratiñeron ligeramente con violeta de cresilo y se analizaron mediante campo claro y microscopio de campo oscuro. Las ribosondas de sentido (control) establecieron el nivel de señal de fondo.

Resultados de bioluminiscencia in vivo

[0108] Los animales fueron inyectados por vía intravenosa con una sola dosis de 200 µg de ARNm encapsulado y se sacrificaron después de cuatro horas. La actividad de la proteína de luciferasa de luciérnaga expresada en hígados y bazos se determinó en un ensayo de bioluminiscencia. Como se demuestra en la FIG. 2, se observó señal detectable sobre la línea de base en cada animal probado. La presencia de una señal luminiscente sobre el fondo infiere la expresión de la proteína luciferasa de luciérnaga a partir del ARNm exógeno. La luminiscencia observada en el hígado se mejoró sobre señales similares observadas en el bazo.

Resultados de la hibridación In situ

[0109] Los estudios de hibridación se llevaron a cabo *in situ* en hígado tomado de dos animales diferentes de entre el grupo de los ratones tratados con el uso de un vehículo de transferencia ICE: DOPE:DMG-PEG-2000 (preparado como se describe anteriormente) y un hígado de control desde el grupo no tratado de ratones. La autorradiografía de película de rayos X se empleó para la detección de ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado para codones a través de riboondas marcadas con ^{35}S-U. (Véase, Wilcox, J.N. J. Histochem. Cytochem. 41, 1725 - 1733 (1993)). FIG. 3 muestra tanto iluminación de campo claro (contratinción de violeta de cresilo) como iluminación de campo oscuro de hígados de control e tratados bajo aumento bajo (2X). El ARNm de luciferasa CO-FF se detectó en hígados tratados (B1 y B2, flechas delgadas) pero no en el hígado control (Ct) cuando se usó la ribosonda antisentido (FIG. 38). Se observó un marcado de ARNm de alto nivel en la banda de tejido marginal hepático (flecha grande). No se detectó señal en ningún hígado cuando se aplicaba la ribosonda de control (sentido) (FIG. 3C).

[0110] Bajo un campo oscuro, la iluminación etiquetada con ARNm de FFL se detectó como puntos brillantes (aumento de 100X) en los hígados de animales inyectados mediante hibridación de una sonda antisentido de ARNm de FFL (FIG. 4A), mientras que el mismo hígado mostró pocos puntos brillantes cuando se usó una sonda de cadena sentido de ARNm de FFF para la hibridación (FIG. 4C). Un hígado de control tomado de un animal que no

recibió ninguna nanopartícula por inyección no produjo ninguna señal significativa bajo la iluminación del campo oscuro cuando las sondas antisentido (FIG. 4E) o sentido (FIG. 4G) se usaron para la hibridación.

Ejemplo 8

Resultados del análisis inmunohistoquímico

[0111] El ARNm FFL fue empaquetado y entregado a través de una formulación de vehículo de transferencia de lípidos que consiste en colesterol, DOPE, DLinDMA, y DMG-PEG2000 de una manera similar a la descrita *supra.*

[0112] La traducción del ARNm de FFL en su respectiva proteína se ha identificado con éxito a través de análisis inmunohistoquímico (FIG. 5). Usando un anticuerpo anti-luciérnaga, se puede observar la detección de la proteína de la luciérnaga expresada en los hepatocitos de los ratones tratados (FIGS. 5B y 5C). El análisis de ratones de control tratados con 1x PBS demostró que no se detectaba proteína de luciérnaga (FIG. 5A).

Discusión

[0113] Un mensajero sintético ARN encapsulado en materiales basados en lípidos se puede usar para la administración y expresión de genes *in vivo* en hígado incluyendo heptocitos. Se usaron mezclas de lípidos catiónicos, no catiónicos y modificados con PEG para expresar una molécula de proteína indicadora. El ICE de lípidos catiónicos basado en imidazol dio como resultado el suministro enriquecido de ARNm al hígado frente al bazo *in vivo*. La observación de una señal bioluminiscente demuestra que se tradujo una molécula informadora de proteína del ARNm exógeno que se suministró en una nanopartícula lipídica in vivo. Los estudios de hibridación *in situ* demostraron la detección directa del ARNm exógeno a través del marcaje de ribosondas ^{35}S-U. La autorradiografía de emulsión produjo una señal que puede usarse para localizar el ARNm en tejido hepático y más específicamente en hepatocitos presentes en los hígados de animales tratados (véanse las Figuras 3 y 4). El ARNm de FFL no se detectó en los hígados de ratones de control no tratados.

[0114] La entrega exitosa de tal ARNm en el hígado y en particular a los hepatocitos apoya la conclusión de que las formulaciones y composiciones de la presente invención se pueden usar para el tratamiento y la corrección de errores inherentes de metabolismo que se localizan en el hígado. Por ejemplo, enfermedades tales como ASD, ARO, CPS, ASS1 y OTC, así como otros trastornos pueden tratarse a través de la terapia de reemplazo de ARNm de un gen faltante o que no funciona bien. La zonación metabólica del ciclo de la urea a hepatocitos significa que la sustitución de la actividad enzimática faltante en estas células debería mejorar en gran medida el procesamiento bioquímico normal en sujetos afectados por una deficiencia enzimática y, en particular, en sujetos afectados por un trastorno del ciclo de la urea.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0115]

<110> TERAPIAS GENÉTICAS HUMANAS SHIRE

<120> ENTREGA DEL ARNm PARA LA AUMENTACIÓN DE PROTEÍNAS Y ENZIMAS EN ENFERMEDADES GENÉTICAS HUMANAS

<130> SHIR-004-WO1

<140> PCT/US2010/058457
<141> 2010-11-30

<150> 61/265,653
<151> 2009-12-01

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1672
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> CO-FF ARNm de luciferasa

<400> 1

gggauccuac cauggaagau gccaaaaaca uuaagaaggg cccagcgcca uucuacccac 60
ucgaagacgg gaccgccggc gagcagcugc acaaagccau gaagcgcuac gcccuggugc 120
ccggcaccau cgccuuuacc gacgcacaua ucgaggugga cauuaccuac gccgaguacu 180
ucgagaugag cguucggcug gcagaagcua ugaagcgcua ugggcugaau acaaaccauc 240
ggaucguggu gugcagcgag aauagcuugc aguucuucau gcccguguug ggugcccugu 300
ucaucggugu ggcuguggcc ccagcuaacg acaucuacaa cgagcgcgag cugcugaaca 360
gcaugggcau cagccagccc accgucguau ucgugagcaa gaaagggcug caaaagaucc 420
ucaacgugca aaagaagcua ccgaucauac aaaagaucau caucauggau agcaagaccg 480
acuaccaggg cuuccaaagc auguacaccu ucgugacuuc ccauuugcca cccggcuuca 540
acgaguacga cuucgugccc gagagcuucg accgggacaa aaccaucgcc cugaucauga 600
acaguagugg caguaccgga uugcccaagg gcguagcccu accgcaccgc accgcuugug 660
uccgauucag ucaugcccgc gaccccaucu ucggcaacca gaucaucccc gacaccgcua 720
uccucagcgu ggugccauuu caccacggcu ucggcauguu caccacgcug ggcuacuuga 780
ucugcggcuu ucgggucgug cucauguacc gcuucgagga ggagcuauuc uugcgcagcu 840
ugcaagacua uaagauucaa ucugcccugc uggugcccac acuauuuagc uucuucgcua 900
agagcacucu caucgacaag uacgaccuaa gcaacuugca cgagaucgcc agcggcgggg 960
cgccgcucag caaggaggua ggugaggccg uggccaaacg cuuccaccua ccaggcaucc 1020
gccagggcua cggccugaca gaaacaacca gcgccauucu gaucaccccc gaaggggacg 1080
acaagccugg cgcaguaggc aagguggugc ccuucuucga ggcuaaggug guggacuugg 1140
acaccgguaa gacacugggu gugaaccagc gcggcgagcu gugcguccgu ggccccauga 1200
ucaugagcgg cuacguuaac aaccccgagg cuacaaacgc ucucaucgac aaggacggcu 1260
ggcugcacag cggcgacauc gccuacuggg acgaggacga gcacuucuuc aucguggacc 1320
ggcugaagag ccugaucaaa uacaagggcu accagguagc cccagccgaa cuggagagca 1380
uccugcugca acaccccaac aucuucgacg ccggggucgc cggccugccc gacgacgaug 1440
ccggcgagcu gcccgccgca gucgucgugc uggaacacgg uaaaaccaug accgagaagg 1500
agaucgugga cuauguggcc agccagguua caaccgccaa gaagcugcgc gguguguug 1560
uguucgugga cgaggugccu aaaggacuga ccggcaaguu ggacgcccgc aagauccgcg 1620
agauucucau uaaggccaag aagggcggca agaucgccgu guaauuugaa uu 1672

<210> 2
<211> 157
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> 5' Secuencia de CMV

<400> 2

uaauacgacu cacuauagga cagaucgccu ggagacgcca uccacgcugu uuugaccucc 60

auagaagaca ccgggaccga uccagccucc gcggccggga acggugcauu ggaacgcgga 120

uuccccgugc caagagugac ucaccguccu ugacacg 157

<210> 3
<211> 100
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia 3' hGH

<400> 3

cggguggcau cccugugacc ccuccccagu gccucuccug gcccuggaag uugccacucc 60

agugcccacc agccuugucc uaauaaaauu aaguugcauc 100

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar una enfermedad en un sujeto que resulta de una deficiencia de proteína, la composición farmacéutica que comprende:

un vehículo de transferencia y al menos una molécula de ARNm que codifica dicha proteína,
el vehículo de transferencia que comprende uno o más lípido(s) catiónico(s), uno o más lípido(s) no catiónico(s) y uno o más lípido(s) modificado(s) con PEG, el vehículo de transferencia es un liposoma y el tamaño del vehículo de transferencia es inferior a 100 nm,
en donde la composición farmacéutica se distribuye preferentemente en las células hepáticas después de la administración al sujeto y la proteína codificada se expresa en las células hepáticas del sujeto.

2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que uno o más lípidos catiónicos se seleccionan de ICE, DOTMA, DC-Chol, DOGS, DOSPA, DODAP, DOTAP, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLinDMA, DODAC, DDAB, DMRIE, CLinDMA, CplindDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLindDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, Dlin-K-DMA, y/o Dlin-K-XTC2-DMA.

3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o más lípidos no catiónicos se seleccionan entre DSPC, DOPC, DOPG, DPPC, DPPG, DOPE, POPC, POPE, DOPE-mal, DPPE, DMPE, DSPE o SOPE.

4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el vehículo de transferencia comprende uno o más lípido(s) catiónico(s) basado(s) en colesterol.

5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el lípido modificado con PEG es un lípido modificado con PEG que comprende una cadena de PEG de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud C_6-C_{20}, un fosfolípido modificado con PEG o ceramida modificada con PEG.

6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o más lípido(s) modificado(s) con PEG está/están presentes en una relación molar entre 0% y 20% del lípido total presente en el vehículo de transferencia.

7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el (los) uno o más lípidos catiónicos está(n) presente(s) en una relación molar de 20% a 70% del lípido total presente en el vehículo de transferencia.

8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la molécula de ARNm comprende una o más de las modificaciones que confiere una estabilidad aumentada o potenciada en relación con su contraparte natural no modificada.

9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la una o más modificaciones se seleccionan de: incorporación de enlaces no nucleotídicos o nucleótidos modificados; una alteración de la región 5' o 3' no traducida; inclusión de una cola de poli A o una cola de poli A más larga; inclusión de una estructura Cap1; o una modificación química de una base de nucleótidos.

10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el ARNm se modifica mediante la incorporación de pseudouridinas.

11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el ARNm tiene un peso molecular de al menos 1 kDa, 1.5 kDa, 2 kDa, 2,5 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa., 25 kDa, 30 kDa o más.

12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el ARNm codifica dos o más proteínas distintas.

13. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proteína es una hormona, una enzima, un receptor o un anticuerpo.

14. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la enfermedad está causada por defectos en un producto génico específico del hígado.

15. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde la enfermedad es un trastorno metabólico del ciclo de la urea, opcionalmente en donde la proteína se selecciona de transcarbamilasa de ornitina (OTC), sintetasa de fosfato de carbamilo (CPS), sintetasa de argininosuccinato 1 (ASS 1), liasa de argininosuccinato (ASL) y arginasa (ARG).

16. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que la proteína se excreta o secreta por las células hepáticas en el fluido extracelular circundante, opcionalmente en el que la proteína se distribuye sistémicamente después de la excreción.

17. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que la proteína permanece en el citosol de las células hepáticas.

18. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición farmacéutica se administra al sujeto por vía intravenosa.

19. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición farmacéutica se administra al sujeto dos veces por semana, una vez a la semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas o una vez al mes.

20. Una composición farmacéutica que comprende:

un vehículo de transferencia, un excipiente farmacéuticamente aceptable y al menos una molécula de ARNm que codifica una proteína, el vehículo de transferencia que comprende uno o más lípido(s) catiónico(s), uno o más lípido(s) no catiónico(s) y uno o más lípido(s) modificado(s) por PEG, en donde el vehículo de transferencia es un liposoma y el tamaño del vehículo de transferencia es menor que 100 nm.

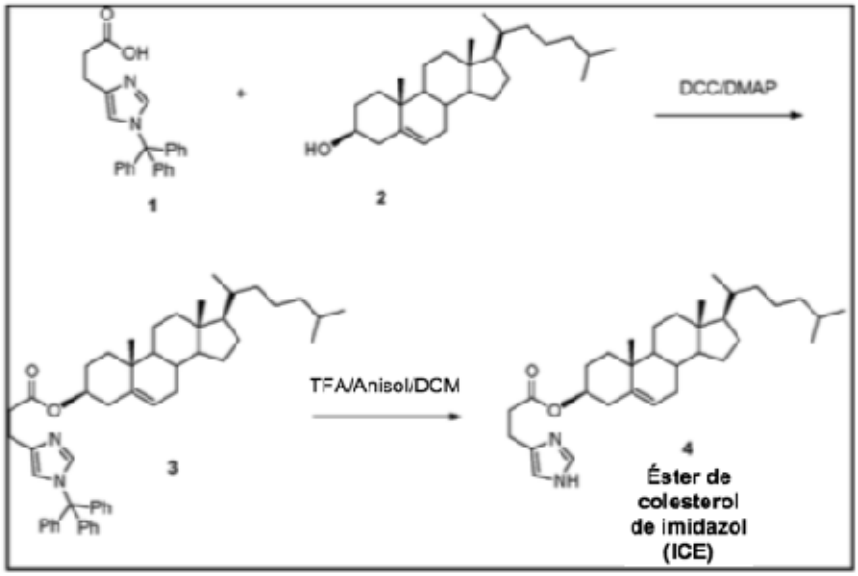

DCC/DMAP
TFA/Anisol/DCM
1
2
3
4
Éster de colesterol de imidazol (ICE)

FIG. 1

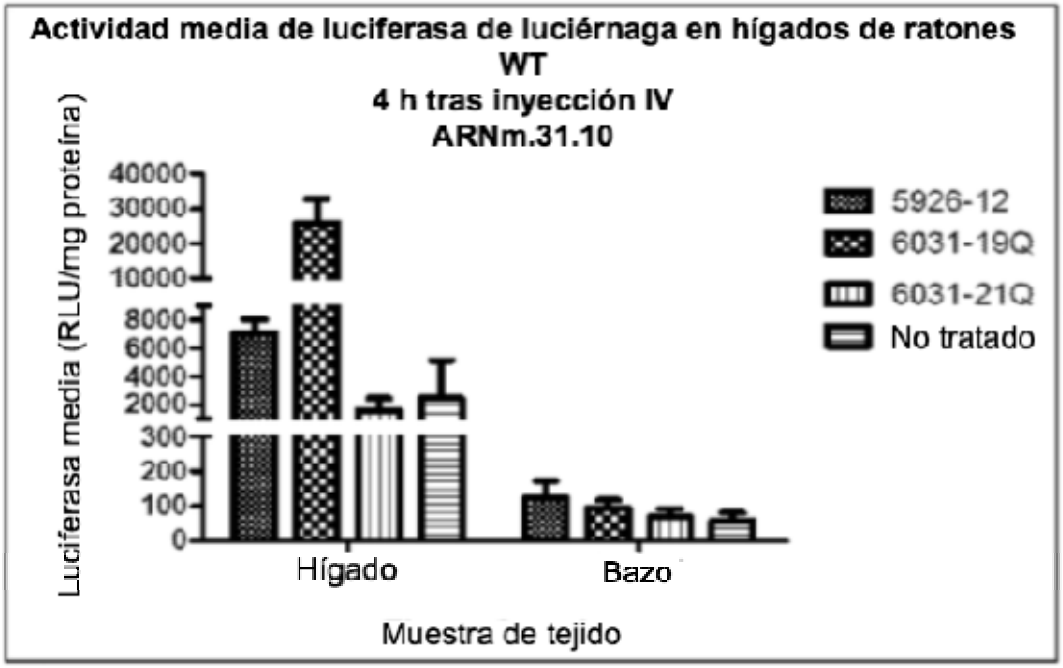

Actividad media de luciferasa de luciérnaga en hígados de ratones WT
4 h tras inyección IV
ARNm.31.10
Luciferasa media (RLU/mg proteína)
40000
30000
20000
10000
8000
6000
4000
2000
300
200
100
0
5926-12
6031-19Q
6031-21Q
No tratado
Hígado
Bazo
Muestra de tejido

FIG. 2

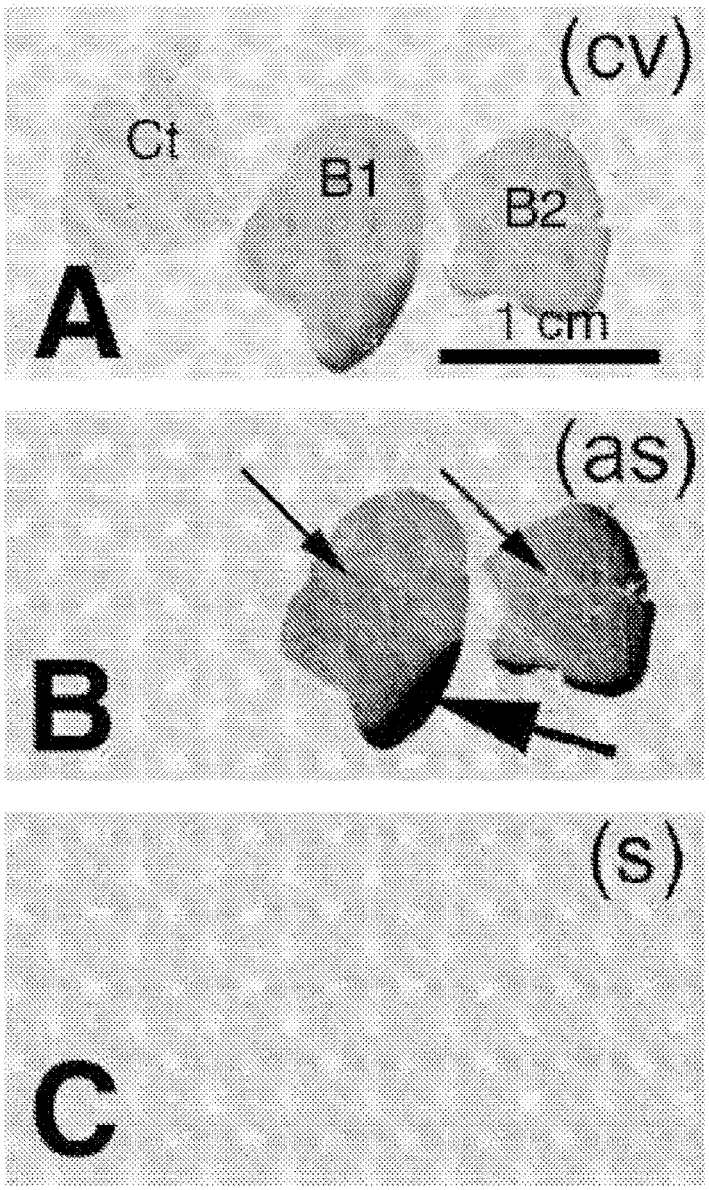


FIG. 3

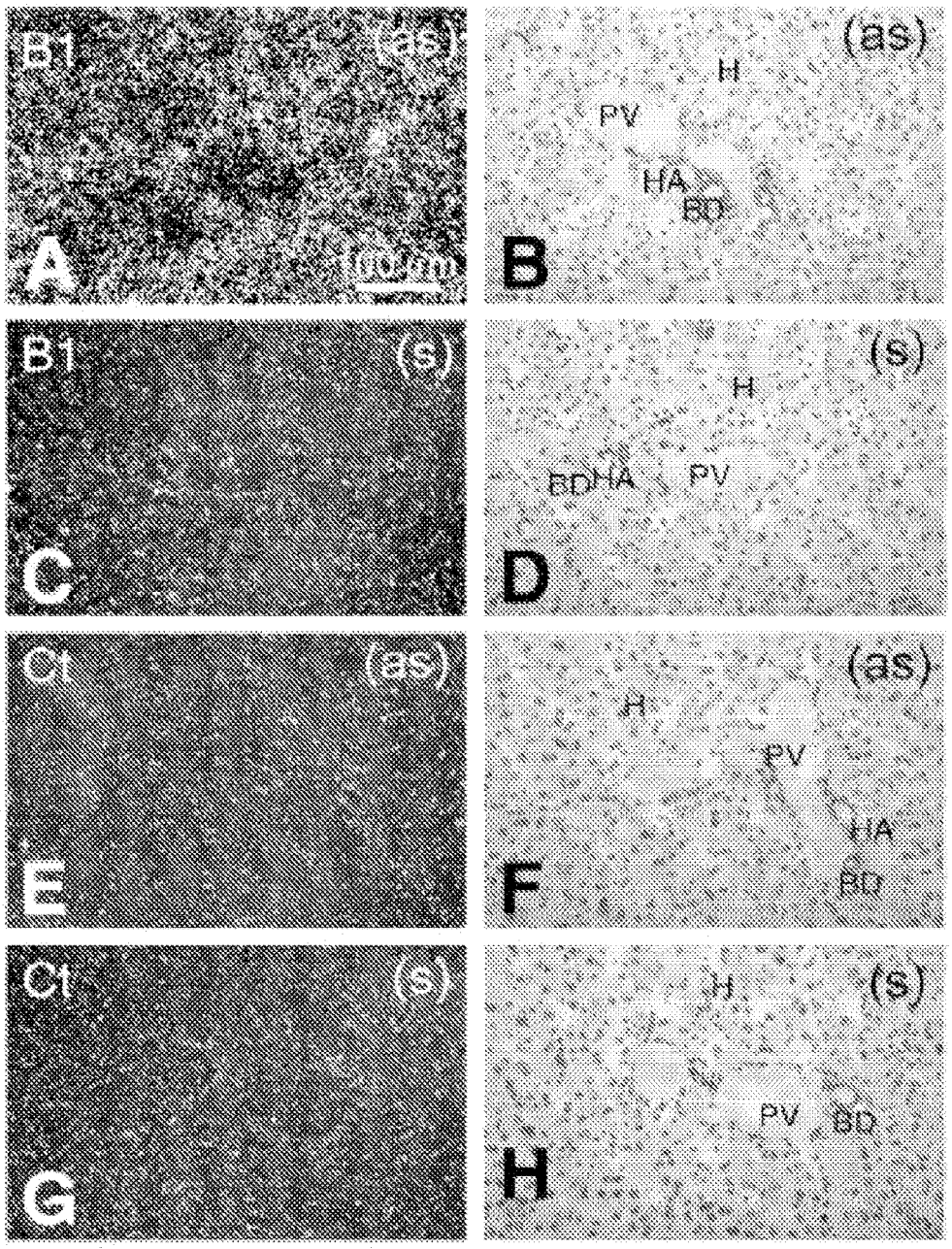

B1
(as)
A
100 µm
(as)
H
PV
HA
BD
B
B1
(s)
C
(s)
H
BD
HA
PV
D
C1
(as)
E
(as)
H
PV
HA
BD
F
C1
(s)
G
H
(s)
PV
BD
H

FIG. 4

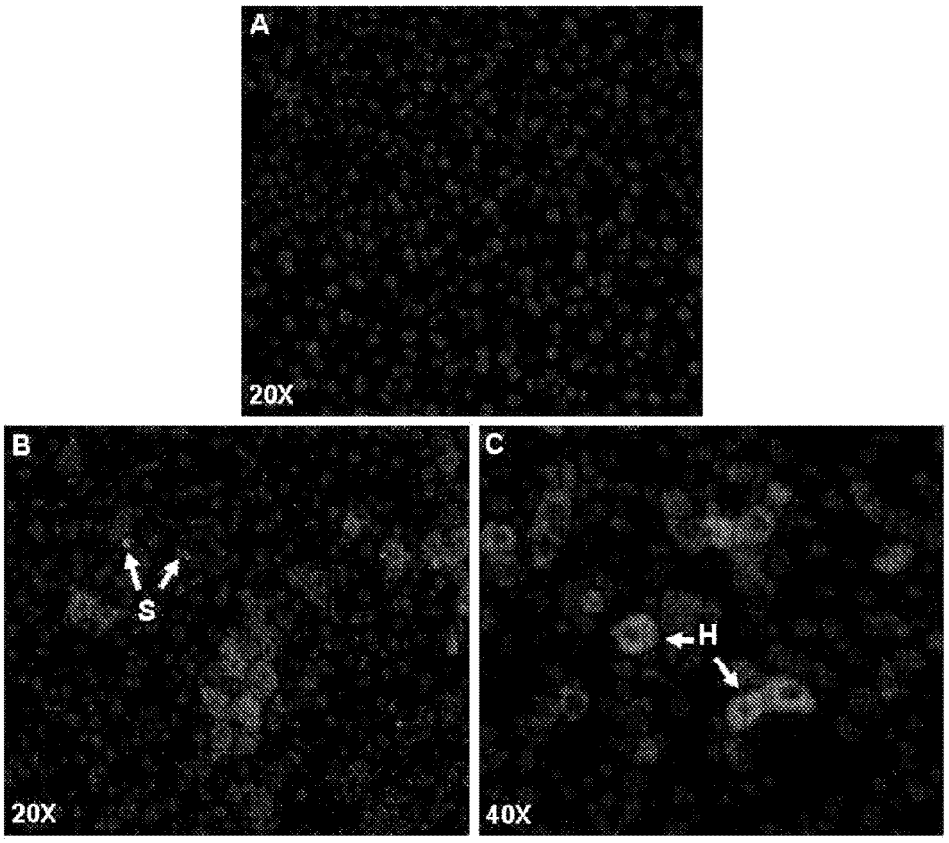


FIG. 5

ARNm de luciferasa CO-FF:

GGGAUCCUACCAUGGAAGAUGCCAAAAACAUUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACC
CACUCGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCC
UGGUGCCCGGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUACG
CCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGA
AUACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUCAUGCCCG
UGUUGGGUGCCCUGUUCAUCGGUGUGGCUGUGGCCCCAGCUAACGACAUCUACAACG
AGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCCACCGUCGUAUUCGUGAGCA
AGAAAGGGCUGCAAAAGAUCCUCAACGUGCAAAAGAAGCUACCGAUCAUACAAAAGA
UCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUACACCUUCG
UGACUUCCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGCCCGAGAGCUUCG
ACCGGGACAAAACCAUCGCCCUGAUCAUGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCA
AGGGCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGCGACC
CCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCCUCAGCGUGGUGCCAUUUC
ACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACGCUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGUCG
UGCUCAUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGA
UUCAAUCUGCCCUGCUGGUGCCCACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCA
UCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCACGAGAUCGCCAGCGGCGGGGCGCCGCUCA
GCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAAACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGG
GCUACGGCCUGACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUCACCCCCGAAGGGGACGACA
AGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGG
ACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCCA
UGAUCAUGAGCGGCUACGUUAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGACAAGG
ACGGCUGGCUGCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCA
UCGUGGACCGGCUGAAGAGCCUGAUCAAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCG
AACUGGAGAGCAUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGGUCGCCGGCC
UGCCCGACGACGAUGCCGGCGAGCUGCCCGCCGCAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUA
AAACCAUGACCGAGAAGGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCA
AGAAGCUGCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCA
AGUUGGACGCCCGCAAGAUCCGCGAGAUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGA
UCGCCGUGUAAUUUGAAUU (SEQ ID NO: 1)

FIG. 6

Secuencia 5' CMV:

UAAUACGACUCACUAUAGGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUG
UUUUGACCUCCAUAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGG
GAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGU
CCUUGACACG (SEQ ID NO: 2)

Secuencia 3' hGH:

CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUGGAA
GUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCA
UC (SEQ ID NO: 3)

FIG. 7