

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 966**

51 Int. Cl.:

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2014 PCT/US2014/061841**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15061500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2014 E 14799919 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3060303**

54 Título: **Terapia de ARNm para la deficiencia en síntesis de argininosuccinato**

30 Prioridad:

**22.10.2013 US 201361894294 P**

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

**08.04.2019**

73 Titular/es:

**TRANSLATE BIO, INC. (100.0%)  
29 Hartwell Avenue  
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**HEARTLEIN, MICHAEL;  
DEROSA, FRANK y  
SMITH, LIANNE**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 707 966 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Terapia de ARNm para la deficiencia en síntesis de argininosuccinato

## 5 ANTECEDENTES

[0001] La deficiencia de sintetasa de argininosuccinato (ASD) es un trastorno genético metabólico autosómico recesivo caracterizado por una mutación en el gen de la enzima de sintetasa de argininosuccinato (ASS1), que afecta su capacidad para unirse a la citrulina, aspartato y otras moléculas. Los defectos en la proteína ASS interrumpen el ciclo de la urea y evitan que el hígado procese adecuadamente el exceso de nitrógeno en la urea. Una acumulación de amoníaco y otros subproductos del ciclo de la urea (como la citrulina) es tóxica y, cuando se produce durante los primeros días de vida, puede provocar síntomas como falta de energía (letargo), mala alimentación, vómitos, convulsiones y pérdida de conciencia. Actualmente, no existe cura para la enfermedad y el nivel de atención es a través del manejo de la dieta, minimizando los alimentos que contienen altas cantidades de proteínas y suplementos dietéticos de arginina y fenilacetato. El documento WO 2013/149140 describe lípidos catiónicos ionizables, utilizables en la administración liposomal de ácidos nucleicos. El documento WO 2012/170889 describe lípidos escindibles para uso en la administración liposomal de ARNm. El documento WO 2011/068810 describe métodos de administración intracelular de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm) que son capaces de corregir defectos genéticos existentes y/o proporcionar funciones beneficiosas a una o más células diana.

## 20 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0002] La presente invención se refiere a composiciones mejoradas para el tratamiento de la deficiencia de sintetasa de argininosuccinato (ASD) basada en la terapia de ARNm. La invención se basa en la observación de que la administración de un ARNm optimizado por codón que codifica una proteína ASS1 humana, encapsulada dentro de un liposoma, dio como resultado una producción de proteínas altamente eficiente y sostenida *In Vivo* y una reducción exitosa de los niveles plasmáticos de amoníaco, un marcador de enfermedad clínicamente relevante.

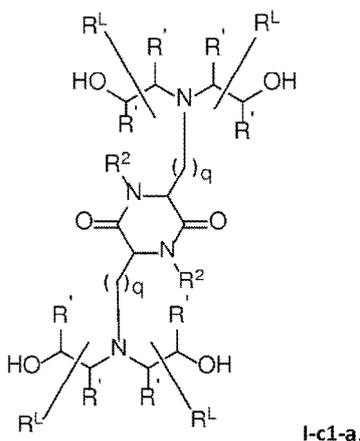
[0003] Específicamente, la presente invención proporciona una composición que comprende un ARNm que codifica sintetasa de argininosuccinato (ASS1) para uso en el tratamiento de ASD, en donde el tratamiento comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento la composición a una dosis efectiva y un intervalo de administración de tal manera que al menos un síntoma o característica de ASD se reduce en intensidad, severidad o frecuencia o se ha retrasado en el inicio. En algunas realizaciones, el ARNm está encapsulado dentro de un liposoma en el que el ARNm tiene una secuencia de nucleótidos al menos el 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15 y el ARNm está optimizado por codones.

[0004] En algunas realizaciones, las composiciones para tratar ASD comprenden un ARNm que codifica ASS1 en una cantidad de dosis eficaz encapsulada dentro de un liposoma.

[0005] En algunas realizaciones, un liposoma adecuado comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, uno o más lípidos basados en colesterol y uno o más lípidos modificados con PEG.

[0006] En algunas realizaciones, uno o más lípidos catiónicos se seleccionan del grupo que consiste en C12-200, MC3, DLinDMA, DLinKC2DMA, cKK-E12, ICE (basado en imidazol), HGT5000, HGT5001, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOGS, DODAP, DODMA y DMDMA, DODAC, DLinDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, HGT4003, y combinaciones de los mismos.

[0007] En algunas realizaciones, uno o más lípidos catiónicos comprenden un compuesto de fórmula I-c1-a:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

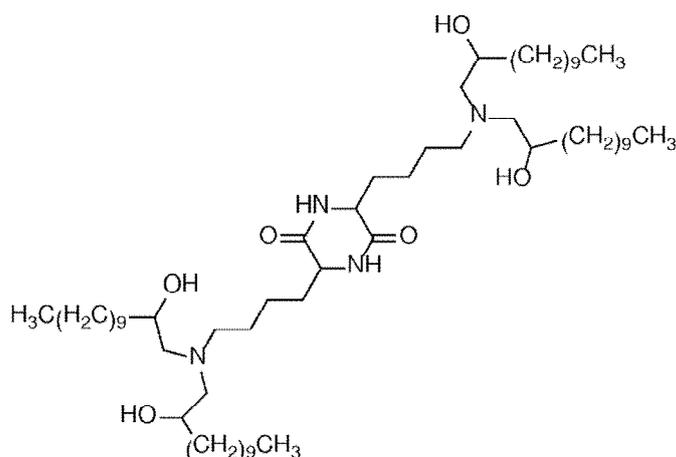
cada R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno o C<sub>1-3</sub> alquilo;

cada q independientemente es de 2 a 6;

cada R' es independientemente hidrógeno o C<sub>1-3</sub> alquilo;

y cada R<sup>L</sup> es independientemente C<sub>8-12</sub> alquilo.

**[0008]** En algunas realizaciones, uno o más lípidos catiónicos comprenden cKK-E12:



**[0009]** En algunas realizaciones, uno o más lípidos no catiónicos adecuados para la invención se seleccionan de DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPC (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfodilcolina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo(1'-rac-glicerol)), y combinaciones de los mismos.

**[0010]** En algunas realizaciones, uno o más lípidos a base de colesterol se seleccionan de colesterol, colesterol PEGilado y DC-Chol(N,N-dimetilo-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-olamino-propilo)piperazina.

**[0011]** En algunas realizaciones, el liposoma comprende además uno o más lípidos modificados con PEG. En algunas realizaciones, uno o más lípidos modificados con PEG comprenden una cadena de poli(etilen)glicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>. En algunas realizaciones, un lípido modificado con PEG es una ceramida derivatizada tal como N-Octanoil-Esfingosina-1-[Succinil(Metoxi Polietilenglicol)-2000]. En algunas realizaciones, un lípido modificado con PEG o PEGilado es colesterol PEGilado o dimiristoilglicerol (DMG)-PEG-2K.

**[0012]** En algunas realizaciones, un liposoma adecuado comprende una combinación seleccionada de cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; o ICE, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K.

**[0013]** En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE y/o HGT4003) constituyen aproximadamente el 30-60% (por ejemplo, aproximadamente el 30-55%, aproximadamente el 30-50%, aproximadamente el 30-45%, aproximadamente 30-40%, aproximadamente 35-50%, aproximadamente 35-45%, o aproximadamente 35-40%) de la relación liposoma por molar. En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE y/o HGT4003) constituyen aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, o aproximadamente el 60% del liposoma por relación molar.

**[0014]** En algunas realizaciones, la relación de lípido(s) catiónico(s) (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE y/o HGT4003) a lípido(s) no catiónico(s) (por ejemplo, DOPE) a base de colesterol los lípidos(s) (por ejemplo, colesterol) a los lípidos(s) PEGilados (por ejemplo, DMG-PEG2K) pueden estar entre aproximadamente 30-60: 25-35: 20-30: 1-15, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación de lípido(s) catiónico(s) (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE y/o HGT4003) a lípido(s) no catiónico(s) (por ejemplo, DOPE) a lípido(s) basado(s) en colesterol (p. ej., colesterol) a lípido(s) PEGilado(s) (p. ej., DMG-PEG2K) es aproximadamente 40: 30: 20: 10, respectivamente. En

algunas realizaciones, la relación de lípido(s) catiónico(s) (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE y/o HGT4003) a lípido(s) no catiónico(s) (por ejemplo, DOPE) a lípido(s) basado(s) en colesterol (por ejemplo, colesterol) a lípido(s) PEGilado(s) (por ejemplo, DMG-PEG2K) es aproximadamente 40:30:25:5, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación de lípido(s) catiónico(s) (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE y/o HGT4003) a lípido(s) no catiónico(s) (por ejemplo, DOPE) a lípido(s) a base de colesterol (por ejemplo, colesterol) a lípido(s) PEGilado(s) (por ejemplo, DMG-PEG2K) es aproximadamente 40:32:25:3, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación de lípido(s) catiónico(s) (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE y/o HGT4003) a lípido(s) no catiónico(s) (por ejemplo, DOPE) a lípido(s) basado(s) en colesterol) (p. ej., colesterol) a los lípidos PEGilados (p. ej., DMG-PEG2K) es aproximadamente 50:25:20:5.

**[0015]** En algunas realizaciones, el tamaño de un liposoma se determina por la longitud del diámetro más grande de la partícula de liposoma. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño inferior a aproximadamente 500 nm, 400 nm, 300 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm o 50 nm. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño inferior a aproximadamente 100 nm, 90 nm, 80 nm, 70 nm o 60 nm.

**[0016]** En algunas realizaciones, el ARNm se administra a una dosis que varía de aproximadamente 0,1 a 5,0 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 4,5, 0,1 a 4,0, 0,1 a 3,5, 0,1 a 3,0, 0,1 a 2,5, 0,1 a 2,0, 0,1 a 1,5, 0,1 a 1,0, 0,1 a 0,5, 0,1 a 0,3, 0,3 a 5,0, 0,3 a 4,5, 0,3 a 4,0, 0,3 a 3,5, 0,3 a 3,0, 0,3 a 2,5, 0,3 a 2,0, 0,3 a 1,5, 0,3 a 1,0, 0,3 a 0,5, 0,5 a 5,0, 0,5 a 4,5, 0,5 a 4,0, 0,5 a 3,5, 0,5 a 3,0, 0,5 a 2,5, 0,5 a 2,0, 0,5 a 1,5, o 0,5 a 1,0 mg/kg de peso corporal y se administra una vez a la semana, dos veces a la semana, dos veces al mes, una vez al mes o una vez cada 14 días. En algunas realizaciones, el ARNm se administra a una dosis de o menos de aproximadamente 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0, 0,8, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 mg/kg de peso corporal.

**[0017]** En algunas realizaciones, la composición proporcionada se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la composición proporcionada se administra por administración pulmonar. En ciertas realizaciones, el suministro pulmonar se realiza por aerosolización, inhalación, nebulización o instilación. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas se formulan como partículas respirables, lípidos nebulizables o polvo seco inhalable.

**[0018]** En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas se administran una vez al día, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas se administran una vez cada 7 días, una vez cada 10 días, una vez cada 14 días, una vez cada 28 días o una vez cada 30 días.

**[0019]** En algunas realizaciones, la proteína ASS1 se expresa en el hígado. En algunas realizaciones, la administración de la composición proporcionada da como resultado la expresión de un nivel de proteína ASS1 igual o superior a aproximadamente 100 ng/mg (por ejemplo, igual o superior a aproximadamente 200 ng/mg, 400 ng/mg, 500 ng/mg, 1000 ng/mg, 2000 ng/mg o 3000 ng/mg) de proteína total en el hígado.

**[0020]** En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un aumento del nivel de proteína ASS1 en suero. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un aumento del nivel de proteína ASS1 en suero en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces en comparación con el nivel basal de proteína ASS1 sérica antes del tratamiento.

**[0021]** En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un nivel de citrulina reducido en el sujeto en comparación con el nivel de citrulina de referencia antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un nivel reducido de citrulina en plasma en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% en comparación a nivel basal de citrulina plasmática antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un nivel reducido de citrulina en plasma a menos de aproximadamente 2.000 µM, 1.500 µM, 1.000 µM, 750 µM, 500 µM, 250 µM, 100 µM, 90 µM, 80 µM, 70 µM, 60 µM, 50 µM, 40 µM, o 30 µM.

**[0022]** En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un nivel de amoníaco reducido en el sujeto en comparación con el nivel de amoníaco de referencia antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la administración de la composición proporcionada da como resultado una reducción de los niveles de amoníaco a aproximadamente 3.000 µmol/L o menos, aproximadamente 2750 µmol/L o menos, aproximadamente 2500 µmol/L o menos, aproximadamente 2250 µmol/L o menos, aproximadamente 2000 µmol/L o menos, aproximadamente 1750 µmol/L o menos, aproximadamente 1500 µmol/L o menos, aproximadamente 1250 µmol/L o menos, aproximadamente 1000 µmol/L o menos, aproximadamente 750 µmol/L o menos, aproximadamente 500 µmol/L o menos, alrededor de 250 µmol/L o menos, alrededor de 100 µmol/L o menos, o alrededor de 50 µmol/L o menos en el plasma o suero. En una realización particular, la administración de la composición proporcionada da como resultado la reducción de los niveles de amoníaco a aproximadamente 50 µmol/L o menos en plasma o suero.

**[0023]** En algunas realizaciones, la administración de la composición proporcionada da como resultado un nivel

reducido de amoníaco en una muestra biológica en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50% al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% en comparación con el nivel inicial de amoníaco antes del tratamiento. La muestra biológica adecuada puede ser sangre entera, suero, plasma u orina.

**[0024]** En algunas realizaciones, el ARNm optimizado por codón tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15 (correspondiente a secuencias de ARNm de ASS1 humano optimizadas por codón). En algunas realizaciones, el ARNm comprende la secuencia 5' UTR de la SEQ ID NO: 4 (correspondiente a la secuencia 5' UTR X). En algunas realizaciones, el ARNm comprende la secuencia 3' UTR de la SEQ ID NO: 5 (que corresponde a una secuencia Y 3' UTR). En algunas realizaciones, el ARNm comprende la secuencia 3' UTR de la SEQ ID NO: 6 (correspondiente a una secuencia Y 3' UTR). En algunas realizaciones, el ARNm optimizado por codón tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 8 (correspondiente a la secuencia del ARNm de ASS1 humano optimizado por codón con las secuencias 5' UTR y 3' UTR).

**[0025]** En algunas realizaciones, el ARNm comprende uno o más nucleótidos modificados. En algunas realizaciones, el uno o más nucleótidos modificados comprenden pseudouridina, N-1-metilo-pseudouridina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metilo adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinilina-citidina, C-5 propinilo-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinilo-uridina, C5-propinilo-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxosadinosina O(6)-metilguanina y/o 2-tiocitidina.

**[0026]** En realizaciones particulares, la presente invención proporciona una composición para tratar ASD que comprende un ARNm que codifica sintetasa de argininosuccinato (ASS1) en una cantidad de dosis efectiva encapsulada dentro de un liposoma, en donde el ARNm comprende la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15, y además en la que el liposoma comprende lípidos catiónicos o no catiónicos, lípidos a base de colesterol y lípidos modificados con PEG.

**[0027]** En realizaciones particulares, la presente invención proporciona una composición para tratar ASD que comprende un ARNm que codifica sintetasa de argininosuccinato (ASS1) en una cantidad de dosis efectiva encapsulada dentro de un liposoma, en donde el ARNm comprende la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 8 y, además, en donde el liposoma comprende lípidos catiónicos o no catiónicos, lípidos a base de colesterol y lípidos modificados con PEG.

**[0028]** Otras características, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada y en los dibujos que siguen. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los dibujos, aunque indican realizaciones de la presente invención, se proporcionan solo a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

**[0029]** Los dibujos tienen fines ilustrativos, pero no limitativos.

La **Figura 1** representa niveles de proteína ASS1 ejemplares detectados mediante ELISA después del tratamiento con nanopartículas lipídicas basadas en cKK-E12 cargadas con ARNm ASS1 humano a varias dosis.

Las **Figuras 2A-2D** representan transferencias de Western de ejemplo que comparan los niveles de proteína ASS1 humana en el hígado en función de la dosis después de una dosis intravenosa única de nanopartículas de lípidos encapsuladas con ARNm de ASS1 humano. Los ratones CD1 se sacrificaron 24 horas después de la administración y los hígados se recolectaron y analizaron como se describe anteriormente. La proteína ASS1 humana se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón 2H8. Se cargaron 50 microgramos de proteína hepática total en cada pocillo. La proteína ASS1 humana recombinante se cargó en cada gel como control positivo (control R5).

La **Figura 3** muestra un gráfico ejemplar de los niveles de proteína de sintetasa de argininosuccinato humana (ASS1) acumulados, medidos a través de ELISA. La proteína detectada fue el resultado de su producción a partir del ARNm de ASS1 administrado por vía intravenosa a través de una dosis única de nanopartículas lipídicas (1,0 mg/kg de ARNm de ASS1 encapsulado) a lo largo del tiempo.

Las **Figuras 4A-4E** representan transferencias de Western ejemplares de niveles de proteína ASS1 humana en el hígado a lo largo del tiempo después de una sola dosis intravenosa de nanopartículas de lípidos encapsuladas con ARNm de ASS1 humano (dosis de 1,0 mg/kg).

5 **Las Figuras 5A-5I** representan la detección de ARN mensajero ASS1 humano a través de hibridación *in situ* en los hígados de ratones tratados. El ARNm exógeno es observable durante al menos 7 días después de la administración después de una dosis única (1,0 mg/kg) de nanopartículas lipídicas basadas en cKK-E12 cargadas con ARNm de ASS1. El ARNm de ASS1 humano es detectable en células sinusoidales así como en hepatocitos.

10 **Las Figuras 6A-6I** representan una tinción inmunohistoquímica ejemplar de los niveles de proteína ASS1 en hígado de ratón en diversos puntos de tiempo después de la administración de 1 mg/kg de ARNm de ASS1 que contiene nanopartículas lipídicas cKK-E12. La proteína ASS1 humana es detectable en células sinusoidales así como en hepatocitos. La proteína ASS1 humana es detectable durante al menos una semana después de la administración de una dosis única de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm ASS1.

15 **Las Figuras 7A-7B** representan una tinción inmunohistoquímica de bajo aumento (4x) de los niveles de proteína ASS1 en hígado de ratón 24 horas después de la administración de 1 mg/kg de liposomas cKK-E12 que contienen ARNm ASS1. Una comparación con el hígado de ratón no tratado (izquierda) demuestra la distribución generalizada de la proteína ASS1 humana en todo el hígado.

20 **La Figura 8** representa un gráfico ejemplar de los niveles de proteína de sintetasa de argininosuccinato humana (ASS1) medidos a través de ELISA. La proteína detectada fue el resultado de su producción a partir de ARNm ASS1 administrado por vía intravenosa a través de una dosis única de varias nanopartículas lipídicas.

25 **La Figura 9** representa la incorporación de arginina <sup>14</sup>C en proteínas después de la transfección del ARNm de ASS1 en una línea celular ASS1 KO (SK (-)) en comparación con una línea de células de AS1 positiva que expresa establemente (SK (+), clon #5). El control representa células SK (-) tratadas con lipofectamina solamente.

30 **La Figura 10** muestra los niveles de proteína ASS1 humana en el hígado de rata 24 horas después de la administración de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm ASS1.

**La Figura 11** representa los niveles de amoníaco en plasma en ratones knockout para AAS1 a los que se administró 1,0 mg/kg de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm ASS1 cada 14 días durante 30 días.

## 35 DEFINICIONES

**[0030]** Para que la presente invención se entienda más fácilmente, ciertos términos se definen primero a continuación. Las definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se establecen a lo largo de la especificación.

40 **[0031]** *Alquilo*: como se usa en el presente documento, "alquilo" se refiere a un radical de un grupo hidrocarbonado saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 15 átomos de carbono ("C<sub>1-15</sub> alquilo"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene 1 a 3 átomos de carbono ("C<sub>1-3</sub> alquilo"). Los ejemplos de grupos C<sub>1-3</sub> alquilo incluyen metilo (C<sub>1</sub>), etilo (C<sub>2</sub>), n-propilo (C<sub>3</sub>) e isopropilo (C<sub>3</sub>). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene 8 a 12 átomos de carbono ("C<sub>8-12</sub> alquilo"). Los ejemplos de grupos C<sub>8-12</sub> alquilo incluyen, sin limitación, *n*-octilo (C<sub>8</sub>), *n*-nonilo (C<sub>9</sub>), *n*-decilo (C<sub>10</sub>), *n*-undecilo (C<sub>11</sub>), *n*-dodecilo (C<sub>12</sub>) y similares. El prefijo "n-" (normal) se refiere a grupos alquilo no ramificados. Por ejemplo, *n*-C<sub>8</sub> alquilo se refiere a -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>, *n*-C<sub>10</sub> alquilo se refiere a -(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>, etc.

50 **[0032]** *Aminoácido*: como se usa en el presente documento, el término "aminoácido", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que puede incorporarse en una cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, un aminoácido tiene la estructura general H<sub>2</sub>N-C(H)(R)-COOH. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido natural. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido sintético; en algunas realizaciones, un aminoácido es un d-aminoácido; en algunas realizaciones, un aminoácido es un l-aminoácido. "Aminoácido estándar" se refiere a cualquiera de los veinte aminoácidos estándar que se encuentran comúnmente en los péptidos naturales. "Aminoácido no estándar" se refiere a cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos estándar, independientemente de si se prepara sintéticamente o se obtiene de una fuente natural. Como se usa en este documento, "aminoácido sintético" abarca aminoácidos modificados químicamente, que incluyen, entre otros, sales, derivados de aminoácidos (como amidas) y/o sustituciones. Los aminoácidos, incluidos los aminoácidos carboxi y/o amino terminales en los péptidos, pueden modificarse por metilación, amidación, acetilación, grupos protectores y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la vida media circulante del péptido sin afectar adversamente su actividad. Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. Los aminoácidos pueden comprender una o más modificaciones postraduccionales, como la asociación con una o más entidades químicas (por ejemplo, grupos metilo, grupos acetato, grupos acetilo, grupos fosfato, grupos formilo, grupos isoprenoides, grupos sulfato, grupos polietilenglicol, grupos lipídicos, restos de carbohidratos, restos de biotina, etc.). El término "aminoácido" se usa de manera intercambiable con "residuo de aminoácido", y puede referirse a un aminoácido libre y/o a un residuo de aminoácido de un péptido. Será evidente a partir del contexto en el que se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o un residuo de un péptido.

**[0033] *Animal*:** como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a los humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En ciertas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal manipulado genéticamente y/o un clon.

**[0034] *Aproximadamente o alrededor de*:** como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" o "alrededor de", tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro del 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto (excepto cuando dicho número supere el 100% de un valor posible).

**[0035] *Biológicamente activo*:** como se usa en el presente documento, la frase "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier agente que tenga actividad en un sistema biológico, y particularmente en un organismo. Por ejemplo, un agente que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico en ese organismo, se considera biológicamente activo.

**[0036] *Administración*:** como se usa en el presente documento, el término "administración" abarca tanto la administración local como la sistémica. Por ejemplo, el suministro de ARNm abarca situaciones en las que se envía un ARNm a un tejido diana y la proteína codificada se expresa y retiene dentro del tejido diana (también conocido como "distribución local" o "suministro local") y situaciones en las que se envía un ARNm a un tejido diana y la proteína codificada se expresa y se secreta en el sistema de circulación del paciente (p. ej., suero) y se distribuye de forma sistemática por otros tejidos (también conocida como "distribución sistémica" o "administración sistémica").

**[0037] *Expresión*:** como se usa en el presente documento, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a la traducción de un ARNm en un polipéptido, ensamblar múltiples polipéptidos en una proteína intacta (por ejemplo, enzima) y/o modificación postraduccional de un polipéptido o proteína completamente ensamblada (p. ej., enzima). En esta aplicación, los términos "expresión" y "producción", y su equivalente gramatical, se usan indistintamente.

**[0038] *Funcional*:** como se usa en este documento, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en la que exhibe una propiedad y/o actividad por la cual se caracteriza.

**[0039] *Vida media*:** como se usa en el presente documento, el término "vida media" es el tiempo requerido para que una concentración o actividad de ácido nucleico o proteína caiga a la mitad de su valor medido al comienzo de un período de tiempo.

**[0040] *Mejorar, aumentar o reducir*:** como se usa en este documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores relativos a una medición de referencia, como una medición en el mismo individuo antes de iniciar el tratamiento descrito en este documento, o una medición en un sujeto de control (o sujeto de control múltiple) en ausencia del tratamiento descrito en este documento. Un "sujeto de control" es un sujeto que padece la misma forma de enfermedad que el sujeto que está siendo tratado, que tiene aproximadamente la misma edad que el sujeto que está siendo tratado.

**[0041] *In Vitro*:** como se usa en este documento, el término "*In Vitro*" se refiere a eventos que ocurren en un ambiente artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o vaso de reacción, en un cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular.

**[0042] *In Vivo*:** como se usa en este documento, el término "*In Vivo*" se refiere a eventos que ocurren dentro de un organismo multicelular, como un animal humano y un animal no humano. En el contexto de los sistemas basados en células, el término puede usarse para referirse a eventos que ocurren dentro de una célula viva (en oposición a, por ejemplo, sistemas *In Vitro*).

**[0043] *Aislado*:** como se usa en este documento, el término "aislado" se refiere a una sustancia y/o entidad que ha sido (1) separada de al menos algunos de los componentes con los que estaba asociada cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o o en un entorno experimental), y/o (2) producida, preparada y/o fabricada por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, o más de aproximadamente el 99% de los otros componentes con los que se asociaron

inicialmente. En algunas realizaciones, los agentes aislados son aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente el 99%, o más del 99% de pureza. Como se usa en este documento, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Tal como se usa en el presente documento, el cálculo del porcentaje de pureza de sustancias y/o entidades aisladas no debe incluir excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.).

**[0044]** *Distribución o suministro local*: como se usa en este documento, los términos "distribución local", "suministro local" o equivalente gramatical, se refieren al suministro o distribución específicos del tejido. Típicamente, la distribución o administración local requiere que una proteína (por ejemplo, una enzima) codificada por los ARNm se traduzca y exprese de manera intracelular o con una secreción limitada que evite ingresar al sistema de circulación del paciente.

*ARN mensajero (ARNm)*: como se usa en este documento, el término "ARN mensajero (ARNm)" se refiere a un polinucleótido que codifica al menos un polipéptido. El ARNm como se usa en este documento abarca tanto el ARN modificado como el no modificado. El ARNm puede contener una o más regiones codificantes y no codificantes. El ARNm puede purificarse a partir de fuentes naturales, producirse usando sistemas de expresión recombinantes y opcionalmente purificarse, sintetizarse químicamente, etc. Cuando sea apropiado, por ejemplo, en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, el ARNm puede comprender análogos de nucleósidos tales como análogos que tienen bases o azúcares modificados químicamente, modificaciones del esqueleto, etc. Una secuencia de ARNm se presenta en la dirección 5' a 3' a menos que se indique lo contrario. En algunas realizaciones, un ARNm es o comprende nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, guanosina, citidina, uridina); análogos de nucleósidos (p. ej., 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metilo adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinilo-citidina, C-5 propinilo-uridina, 2-aminoadenosina, C5-Bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinilo-uridina, C5-propinilo-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoadenosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina); bases químicamente modificadas; bases biológicamente modificadas (por ejemplo, bases metiladas); bases intercaladas; azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororibosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces 5'-N-fosforididita).

**[0045]** *Ácido nucleico*: como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que es o puede incorporarse en una cadena de polinucleótido. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que es o puede incorporarse a una cadena de polinucleótido a través de un enlace fosfodiéster. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a residuos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos). En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a una cadena de polinucleótido que comprende residuos de ácido nucleico individuales. En algunas realizaciones, el "ácido nucleico" abarca el ARN, así como el ADN y/o el ADNc de cadena simple y/o de doble cadena.

**[0046]** *Paciente*: como se usa en el presente documento, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier organismo al que se le puede administrar una composición, por ejemplo, con fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos, cosméticos y/o terapéuticos. Los pacientes típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y/o humanos). En algunas realizaciones, un paciente es un humano. Un humano incluye formas pre y post natales.

**[0047]** *Farmacéuticamente aceptable*: el término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación razonable entre beneficio y riesgo.

**[0048]** *Sal farmacéuticamente aceptable*: las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, SM Berge et al., describe sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66: 1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, son sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o utilizando otros métodos utilizados en la técnica, como el intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilo sulfato, malato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, sales de valerato y similares. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio y  $N^+(C_{1-4} \text{alquilo})_4$ . Las sales representativas de metales alcalinos o

alcalinotérricos incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes de amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato y arilsulfonato. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales formadas a partir de la cuaternización de una amina usando un

5 electrófilo apropiado, por ejemplo, un haluro de alquilo, para formar una sal de amino alquilada cuaternizada.  
**[0049] Distribución o administración sistémica:** como se usa en este documento, los términos "distribución sistémica", "administración sistémica" o equivalente gramatical, se refieren a un mecanismo o enfoque de administración o distribución que afecta a todo el cuerpo o un organismo completo. Normalmente, la distribución o el suministro sistémico se realiza a través del sistema de circulación del cuerpo, por ejemplo, el torrente sanguíneo. En comparación con la definición de "distribución o administración local".

10 **[0050] Sujeto:** tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal humano o no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, cerdos, ovejas, caballos o primates). Un humano incluye formas pre y post natales. En muchas realizaciones, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un ser humano que se presenta a un proveedor médico para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término "sujeto" se usa aquí de manera intercambiable con "individual" o "paciente". Un sujeto puede padecer o es susceptible a una enfermedad o trastorno, pero puede o no mostrar síntomas de la enfermedad o trastorno.

20 **[0051] Sustancialmente:** tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de exhibir una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Una persona con experiencia ordinaria en las artes biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, se completan y/o se completan o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible falta de integridad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

25 **[0052] Tejidos diana:** como se usa en el presente documento, el término "tejidos diana" se refiere a cualquier tejido afectado por una enfermedad a tratar. En algunas realizaciones, los tejidos diana incluyen aquellos tejidos que muestran patología, síntoma o característica asociada con la enfermedad.

30 **[0053] Cantidad terapéuticamente eficaz:** como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico significa una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que sufre o es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Los expertos en la técnica apreciarán que una cantidad terapéuticamente eficaz se administra típicamente a través de un régimen de dosificación que comprende al menos una dosis unitaria.

35 **[0054] Tratamiento:** tal como se usa en el presente documento, el término "tratar", "tratamiento" o "tratado" se refiere a cualquier método utilizado para aliviar, mejorar, aliviar, inhibir, prevenir, retrasar, retrasar la aparición, reducir la gravedad de forma parcial o total y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno o afección en particular. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad y/o muestra solo signos tempranos de la enfermedad con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar patología asociada con la enfermedad.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 **[0055]** La presente invención se refiere a composiciones para tratar la deficiencia de sintetasa de argininosuccinato (ASD) basadas en la terapia de ARNm como se expone en las reivindicaciones. La presente descripción proporciona métodos para tratar ASD administrando a un sujeto que necesita tratamiento una composición que comprende un ARNm que codifica sintetasa de argininosuccinato (ASS) a una dosis efectiva y un intervalo de administración tal que al menos un síntoma o característica de ASD se reduce en intensidad, severidad, o frecuencia o retraso en el inicio. En algunos aspectos de la invención, el ARNm está encapsulado dentro de uno o más liposomas. Como se usa en el presente documento, el término "liposoma" se refiere a cualquier vesícula de nanopartículas laminares, multilamelares o sólidas. Típicamente, un liposoma como se usa en el presente documento puede formarse mezclando uno o más lípidos o mezclando uno o más lípidos y polímeros. Por lo tanto, el término "liposoma", como se usa en este documento, abarca nanopartículas basadas tanto en lípidos como en polímeros. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para la presente invención contiene lípido(s) catiónico(s) o no catiónico(s), lípidos(s) basado(s) en colesterol y lípidos modificados con PEG.

### **Deficiencia de sintetasa de argininosuccinato (ASD)**

60 **[0056]** La composición de la presente invención se usa para tratar a un sujeto que padece o es susceptible a la deficiencia de sintetasa de argininosuccinato (ASD). La ASD es un trastorno genético metabólico autosómico recesivo caracterizado por una mutación en el gen de la enzima de sintetasa de argininosuccinato (ASS1). Se han identificado al menos 50 mutaciones que causan ASD de tipo I en el gen ASS1. La mayoría de estas mutaciones involucran sustituciones de aminoácidos individuales. Muchas de las mutaciones en el gen ASS1 probablemente afectan la estructura de la proteína resultante y su capacidad para unirse a la citrulina, el aspartato y otras

moléculas. Algunas de las mutaciones en el gen ASS1 conducen a la producción de una versión anormalmente corta de la enzima que no puede desempeñar efectivamente su papel en el ciclo de la urea.

5 **[0057]** Los defectos en la proteína ASS1 interrumpen el ciclo de la urea e impiden que el hígado procese adecuadamente el exceso de nitrógeno, que se genera cuando la proteína se utiliza para obtener energía, en urea. Una acumulación de amoníaco y otros subproductos del ciclo de la urea (como la citrulina) es tóxica y, cuando se produce durante los primeros días de vida, puede provocar síntomas como falta de energía (letargo), mala alimentación, vómitos, convulsiones y pérdida de conciencia. Estos problemas médicos pueden ser potencialmente mortales en muchos casos.

10 **[0058]** Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar al menos un síntoma o característica de la ASD.

15 ***Sintetasa de argininosuccinato (ASS1)***

**[0059]** La presente invención proporciona composiciones para administrar ARNm que codifica ASS1 a un sujeto para el tratamiento de la deficiencia de sintetasa de argininosuccinato (ASD). Un ARNm de ASS1 adecuado codifica cualquier fragmento, porción o longitud completa de una proteína ASS1 que pueda sustituirse por la actividad de la proteína ASS1 que se produce naturalmente y/o reduce la intensidad, la gravedad y/o la frecuencia de uno o más síntomas asociados con el ASD.

20 **[0060]** La secuencia de ARNm de ASS1 humano natural y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestran en la Tabla 1:

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1. ASS1 humano

5	<p><b>ASS1 humano (ARNm)</b></p> <p>GCCGGCGCGCCCUUGGGAGGGUGAGCCGGCGCCGGGGCCAGGCCCGGACCUGGUGGGAGGC  GGGGGGAGGUGGGGACGAGGCCUUGGGAGGCGGGCCCCGCCAUCUGCAGGUGGCUGUGA  ACGUGAGCGGCUCCAGGCGGGGGCCGGGCCCGGGGGGUCUGUGGCAGCGGUCUCCCG  CCACGUGUCCCCGGUCACCGGCCUUGCCCCGGGGCCUUGUCUUAUAACCUGGGGAUGGGCAC  CCCUGCCAGUCCUGCUCUGCCGCCUGCCACCGCUGCCCGAGCCCGAGUGGUUACUGCAGCUG  UGAAAACAGAUUCCAGACGCCGGGAACUCACGCCUCCAAUCCAGACGCUAUGUCCAGCAAA  GGCUCCGUGGUUUCUGCCUACAGUGGCGGCCUGGACACCUCGUGCAUCCUCGUGUGGCUGA  AGGAACAAGGCUAUGACGUAUUGCCUAUCUGGCCAACAUUGGCCAGAAGGAAGACUUCGA  GGAAAGCCAGGAAGAAGGCACUGAAGCUUGGGGCCAAAAAGGUUUAUUGAGGAUGUCAGC  AGGGAGUUUGUGGAGGAGUUAUCUUGGCCGGCCAUCAGUCCAGCGCACUGUAUGAGGACC  GCUACCUCUGGGCACCUCUCUUGCCAGGCCUGCAUCGCCCGCAAAACAUGGAAAUCGCC  AGCGGGAGGGGGCCAAGUAUGUGUCCACGGCGCCACAGGAAAGGGGAACGAUCAGGUCCG  GUUUGAGCUCAGCUGCUACUCACUUGGCCCCAGAUAAAGGUCAUUGCUCUCCUGGAGGAUG  CCUGAAUUCUACAACCGGUUCAAGGGCCGCAAUGACCUGAUGGAGUACGCAAAGCAACACGG  GAUUCCCAUCCCCGUCACUCCCAAGAACCGUGGAGCAUGGAUGAGAACCUCUACACAUCA  GCUACGAGGCUGGAAUCCUGGAGAACCCCAAGAACCAAGCGCCUCCAGGUCUCUACACGAAG  ACCCAGGACCCAGCCAAAGCCCCAACCCCCUGACAUUCUCGAGAUCGAGUUAACAAAAGGG  GUCCUCUGAAGGUGACCAACGUAAGGAUGGCACCACCCACCAGACCUCCUUGGAGCUCUU  CAUGUACCUGAACGAAGUCGCGGGCAAGCAUGGCGUGGGCCGUUAUUGACAUCGUGGAGAAC  CGCUUCAUUGGAAUGAAGUCCCGAGGUAUCUACGAGACCCAGCAGGCACCAUCCUUUACCA  UGCUCAUUUAGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCCGGGAAGUGCGCAAAAUCAAAACAGGCC  UGGGCUUGAAAUUUGCUGAGCUGGUGUAUACCGGUUUCUGGCACAGCCCUGAGUGUGAAU  UUGUCCGCCACUGCAUCGCCAAGUCCAGGAGCGAGUGGAAGGGAAAGUGCAGGUGUCCGU  CCUCAAGGGCCAGGUGUACAUCUCGCGGGGAGUCCCCACUGUCUCUCUACAAGAGGAGC  UGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGUGAUUAUGAGCCAACUGAUGCCACCGGGUUAUCAACA  CAAUUCUCUAGGCUGAAGGAAUAUCAUCGUCUCCAGAGCAAGGUCACUGCCAAAUGAGCCC  GUGUACAAGAGGAGCUGGGGCCUCCUCAAUUUGCAGAUCCCCCAAGUACAGGCGCUAAUU  GUUGUGAAUUAUUGAAUUGUGACUUGUUCUCCCGGCUUGGACGCGUAGUGGGGCGGCCA  GGCCCCAGCUUUGUUCUCCUGGUCCCCUGAAGCCUGCAAACGUUGUCAUCGAAGGGAAGGG  UGGGGGCAGCUGCGGUGGGGAGCUAUAUUUAGACAAUUAAGAGACACUAGUCUUUU  AUUUCUAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:1)</p>	
45		
50		<p><b>ASS1 humano (secuencia de aminoácidos)</b></p> <p>MSSKGSVVLAYSGLDTSILVWLKEQGYDVIAYLANIGQKEDFEARKKALKLGAKKVFIEDVSREFVE  EFIWPAIQSSALYEDRYLLGTSLARPCIARKQVEIAQREGAKYVSHGATGKGNQVRFELSCYSLAPQIK  VIAPWRMPEFYNRFKGRNDLMEYAKQHGIPIVTPKNPWSMDENLMHISYEAGILENPKNQAPPGL  YTKTQDPAKAPNTPDILEIEFKKGVVKTNVKDGTTHTSLELFMYLNEVAGKHGVRIDIVENRFIG  MKSRGIYETPAGTILYHAHLDIEAFTMDREVRKIKQGLGLKFAELVYTGFWHSPECFVRHICAKSQR  VEGKVQVSVLKGQVYILGRESPLSLYNEELVSMNVQGDYEPTDATGFININSLRLKEYHRLQSKVTAK  (SEQ. ID NO:2)</p>

[0061] En algunas realizaciones, un ARNm adecuado puede ser una secuencia de hASS1 optimizada por codones, tal como la secuencia que se muestra a continuación:

55

60

65

5 AUGAGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGUCUGGCCUACAGCGGCGGCCUGGACACCAGCUGCAUCCUGGUGUGGCU  
 GAAGGAGCAGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUUGGCCAACAUCCGGCCAGAAGGAGGACUUCGAGGAGGCC  
 GCAAGAAGGCCCUGAAGCUGGGCGCCAAGAAGGUGUUAUCAGGAGCUGAGCCGCGAGUUCGUGGAGGAG  
 10 UUCAUCUGGCCCGCCAUCCAGAGCAGCGCCUUGUACGAGGACCGCUACCUUGCUGGGCACCAGCCUGGCCCGC  
 CCCUGCAUCGCCCGCAAGCAGGUGGAGAUCGCCAGCGCGAGGGCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACC  
 GGCAAGGGCAACGACCAGGUGCGCUUCGAGCUGAGCUGCUACAGCCUGGCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCC  
 CCCUGGGCGAUGCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGACCUGAUGGAGUACGCCAAGCAGCAC  
 GGCAUCCCCAUCCCGUGACCCCAAGAACCCUGGAGCAUGGACGAGAACCUGAUGCACAUCAGCUACGAGG  
 CCGGCAUCCUGGAGAACCCCAAGAACCAGGCCCGCCCGGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCGCCAAGGCC  
 15 CCCAACACCCCGACAUCUGGAGAUCGAGUUAAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGUGAAGGAC  
 GGCACCCACCCAGACCAGCCUGGAGCUGUUAUGUACCUAAGGAGGUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGC  
 CGCAUCGACAUCGUGGAGAACCGCUUCAUCGGCAUGAAGAGCCGCGGCAUCUACGAGACCCCGCCGGCACC  
 AUCCUGUACCACGCCACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGCGCAAGAUCAAGCAGGGC  
 CUGGGCCUGAAGUUCGCCGAGCUGGUGUACACCGCCUUCUGGCACAGCCCGAGUGCGAGUUCGUGCGCCA  
 20 CUGCAUCGCCAAGAGCCAGGAGCGCGUGGAGGGCAAGGUGCAGGUGAGCGUGCUGAAGGGCCAGGUGUACA  
 UCCUGGGCCGCGAGAGCCCGUGAGCCUGUACAACGAGGAGCUGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUAC  
 GAGCCACCGACGCCACCGCCUUAUCAACAUCAACAGCCUGCGCCUGAAGGAGUACCACCGCCUGCAGAGCA  
 AGGUGACCGCCAAGUGA (SEQ ID NO:3)

25 **[0062]** Se describen secuencias de ARNm ejemplares adicionales en la sección de Ejemplos a continuación, por ejemplo, la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8, ambas incluyen regiones no traducidas 5' y 3' que enmarcan un ARNm codificado en ASS1 optimizado por codones.

30 **[0063]** En algunas realizaciones, una secuencia de ARNm adecuada puede ser una secuencia de ARNm, un homólogo o un análogo de la proteína ASS1 humana. Por ejemplo, un homólogo o un análogo de la proteína ASS1 humana puede ser una proteína ASS1 humana modificada que contiene una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos, en comparación con una proteína ASS1 humana de tipo silvestre o natural, mientras que se mantiene actividad de la proteína ASS1 sustancial. Un ARNm adecuado para la presente invención codifica una proteína sustancialmente idéntica a la proteína ASS1 humana. Un ARNm adecuado para la presente invención codifica una secuencia de aminoácidos al menos 99% o más idéntica a la SEQ ID NO: 2. Un ARNm adecuado para la presente invención tiene una secuencia de nucleótidos al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntico a la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.

40 **[0064]** En algunas realizaciones, un ARNm adecuado codifica una proteína de fusión que comprende una proteína ASS1 de longitud completa fusionada con otra proteína (por ejemplo, una fusión N o C terminal). En algunas realizaciones, la proteína fusionada al ARNm que codifica una longitud completa, fragmento o porción de una proteína ASS1 codifica una señal o una secuencia de direccionamiento celular.

45 ***Vehículos de administración***

50 **[0065]** Según la presente invención, el ARNm que codifica una proteína ASS1 como se describe en el presente documento puede administrarse como ARN desnudo (sin empaquetar) o mediante vehículos de administración. Como se usa en el presente documento, los términos "vehículo de administración", "vehículo de transferencia", "nanopartícula" o equivalente gramatical, se usan de manera intercambiable.

55 **[0066]** En algunas realizaciones, los ARNm que codifican una proteína ASS1 pueden administrarse a través de un único vehículo de administración. En algunas realizaciones, los ARNm que codifican una proteína ASS1 pueden administrarse a través de uno o más vehículos de administración, cada uno de ellos de una composición diferente. Según diversas formas de realización, los vehículos de administración adecuados incluyen, entre otros, vehículos basados en polímeros, como polietiliminina (PEI), nanopartículas lipídicas y liposomas, nanoliposomas, nanoliposomas que contienen ceramidas, proteoliposomas, exosomas naturales y derivados sintéticamente, cuerpos laminares sintéticos y semisintéticos, nanopartículas, nanopartículas de silicato de fósforo cálcico, nanopartículas de fosfato de calcio, nanopartículas de dióxido de silicio, partículas nanocristalinas, nanopartículas de semiconductores, sistemas de distribución basados en almidón, micelulas, emulsiones, niosomas, polímeros de bloque multi-dominio (polímeros de vinilo, polímeros de ácido polipropilo acrílico, policonjugados dinámicos), formulaciones en polvo seco, plásmidos, virus, nucleótidos de fosfato de calcio, aptámeros, péptidos y otras etiquetas vectoriales.

65 ***Vehículos de entrega liposomal.***

**[0067]** En algunas realizaciones, un vehículo de suministro adecuado es un vehículo de suministro liposomal, por

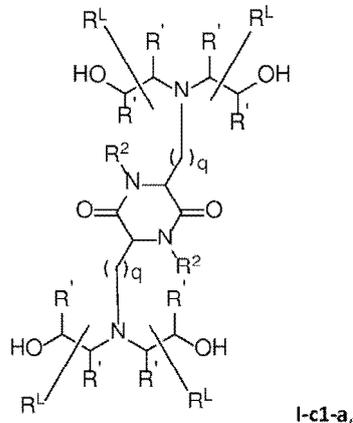
ejemplo, una nanopartícula lipídica. Como se usa en el presente documento, los vehículos de administración liposomal, por ejemplo, nanopartículas lipídicas, se caracterizan generalmente como vesículas microscópicas que tienen un espacio acuático interior secuestrado de un medio exterior por una membrana de una o más bicapas. Las membranas de dos capas de los liposomas están formadas típicamente por moléculas anfifílicas, como los lípidos de origen sintético o natural que comprenden dominios hidrófilos e hidrófobos separados espacialmente (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Las membranas de dos capas de los liposomas también pueden formarse por polímeros anfílicos y surfactantes (por ejemplo, polimerosomas, niosomas, etc.). En el contexto de la presente invención, un vehículo de administración liposomal sirve típicamente para transportar un ARNm deseado a una célula o tejido diana.

Lípidos catiónicos

**[0068]** En algunas realizaciones, los liposomas pueden comprender uno o más lípidos catiónicos. Como se usa en este documento, la frase "lípidos catiónicos" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que tienen una carga neta positiva a un pH seleccionado, como el pH fisiológico. Varios lípidos catiónicos han sido descritos en la literatura, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Los lípidos catiónicos particularmente adecuados para uso en las composiciones de la invención incluyen los descritos en las publicaciones de patentes internacionales WO 2010/053572 (y en particular, C-1 2-200 descritas en el párrafo [00225]) y WO 2012/170930. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención emplean nanopartículas lipídicas que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la solicitud de patente provisional de EE.UU. 61/617.468, presentada el 29 de marzo de 2012, tal como, por ejemplo, (15Z, 18Z)-N,N-dimetilo-6-(9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)tetracosa-15,18-dien-1-amina (HGT5000), (15Z, 18Z)-N,N-dimetilo-6-((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)tetracosa-4,15,18-trien-1-amina (HGT5001) y (15Z, 18Z)-N,N-dimetilo-6-((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)tetracosa-5, 15, 18-trien-1-amina (HGT5002).

**[0069]** En algunas realizaciones, los liposomas proporcionados incluyen un lípido catiónico descrito en el documento WO 2013063468 y en la solicitud provisional de EE.UU. titulada "Lipid Formulations for Delivery of Messenger RNA" presentadas simultáneamente con la presente solicitud en la misma fecha.

**[0070]** En algunas realizaciones, un lípido catiónico comprende un compuesto de fórmula **I-c1-a**:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

cada R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno o C<sub>1-3</sub> alquilo;

cada q independientemente es de 2 a 6;

cada R' es independientemente hidrógeno o C<sub>1-3</sub> alquilo; y

cada R<sup>L</sup> es independientemente C<sub>8-12</sub> alquilo.

**[0071]** En algunas realizaciones, cada R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno, metilo o etilo. En algunas realizaciones, cada R<sup>2</sup> es independientemente hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, cada R<sup>2</sup> es hidrógeno.

**[0072]** En algunas realizaciones, cada q independientemente es de 3 a 6. En algunas realizaciones, cada q independientemente es de 3 a 5. En algunas realizaciones, cada q es 4.

**[0073]** En algunas realizaciones, cada R' es independientemente hidrógeno, metilo o etilo. En algunas realizaciones, cada R' es independientemente hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, cada R' es independientemente

hidrógeno.

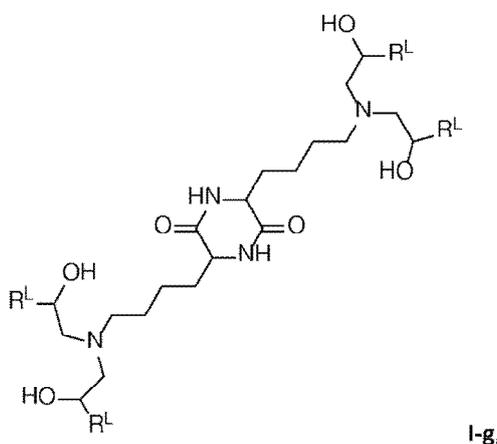
**[0074]** En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $C_{8-12}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $n-C_{8-12}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $C_{9-11}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $n-C_{9-11}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $C_{10}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $n-C_{10}$  alquilo.

**[0075]** En algunas realizaciones, cada  $R^2$  es independientemente hidrógeno o metilo; cada  $q$  independientemente es de 3 a 5; cada  $R'$  es independientemente hidrógeno o metilo; y cada  $R^L$  es independientemente  $C_{8-12}$  alquilo.

**[0076]** En algunas realizaciones, cada  $R^2$  es hidrógeno; cada  $q$  independientemente es de 3 a 5; cada  $R'$  es hidrógeno; y cada  $R^L$  es independientemente  $C_{8-12}$  alquilo.

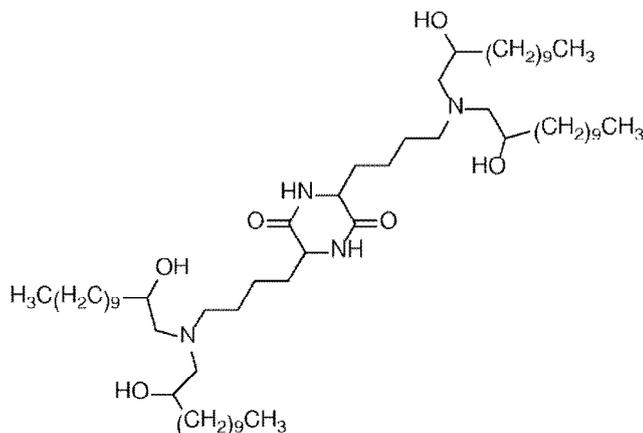
**[0077]** En algunas realizaciones, cada  $R^2$  es hidrógeno; cada  $q$  es 4; cada  $R'$  es hidrógeno; y cada  $R^L$  es independientemente  $C_{8-12}$  alquilo.

**[0078]** En algunas realizaciones, un lípido catiónico comprende un compuesto de fórmula **I-g**:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada  $R^L$  es independientemente  $C_{8-12}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $n-C_{8-12}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $C_{9-11}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $n-C_{9-11}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es independientemente  $C_{10}$  alquilo. En algunas realizaciones, cada  $R^L$  es  $n-C_{10}$  alquilo.

**[0079]** En realizaciones particulares, los liposomas proporcionados incluyen un lípido catiónico cKK-E12, o (3,6-bis(4-(bis(2-hidroxi-dodecilo)amino)butilo)piperazina-2,5-diona). La estructura de cKK-E12 se muestra a continuación:



**[0080]** En algunas realizaciones, uno o más lípidos catiónicos pueden ser cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propilo]-N,N,N-trimetilamonio o "DOTMA". (Feigner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); Patente de EE.UU. N° 4.897.355). DOTMA puede formularse solo o puede combinarse con el lípido neutro, dioleoilfosfatidilo-etanolamina o

"DOPE" u otros lípidos catiónicos o no catiónicos en un vehículo de transferencia liposomal o una nanopartícula lipídica, y tales liposomas se pueden usar para mejorar el suministro de ácidos nucleicos a las células diana. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, 5-carboxispermilgliciniotadecilamida o "DOGS", 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetilo-l-propanaminio o "DOSPA" (Behr y otros, Proc. Nat'l. Acad. Sci. 86, 6982 (1989); Patente de EE.UU. N° 5.171.678; Patente de EE.UU. N° 5.334.761), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-Propano o "DODAP", 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano o "DOTAP".

**[0081]** Los lípidos catiónicos ejemplares adicionales también incluyen 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DODMA", 1, 2-dilinoileloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLenDMA", cloruro de N-dioleil-N,N-dimetilamonio o "DODAC", bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio o "DDAB", bromuro de amonio de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-ilo)-N,N-dimetilo-N-hidroxietil o "DMRIE", 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-l-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetilo l-(cis,cis-9', 12'-octadecadienoxi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetilo-3,4-dioliloxibencilamina o "DMOBA", 1, 2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-Dilinoileloxi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-Dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-Dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometilo-[1,3]-dioxolano o "DLinDMA", 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA", y 2-(2,2-di((9Z, 12Z)-octadeca-9,1 2-dien-1-ilo)-l, 3-dioxolan-4-ilo)-N,N-dimetiletanamina (DLin-KC2-DMA)) (Ver, WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), o mezclas de los mismos. (Heyes, J., et al., J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., Et al., Nat. Biotechnol. 23 (8): 1003-1007 (2005); Publicación PCT WO2005/121348A1). En algunas realizaciones, uno o más de los lípidos catiónicos comprenden al menos uno de un resto imidazol, dialquilamino o guanidinio.

**[0082]** En algunas realizaciones, uno o más lípidos catiónicos se pueden elegir entre XTC (2,2-Dilinoileil-4-dimetilaminatil-[1,3]-dioxolano), MC3 (((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilamino)butanoato), ALNY-100 ((3aR, 5s, 6aS)-N,N-dimetilo-2,2-di((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienilo)tetrahydro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina)), NC98-5 (4,7,13-tris(3-oxo-3-(undecilamino)propilo)-N1,N16-diundecilo-4,7,10,13-tetraazahexadecano-1,16-diamida), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), HGT4003 (WO 2012/170889), ICE (WO 2011/068810), HGT5000 (Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 61/617.468) o HGT5001 (cis o trans) (Solicitud de Patente Provisional N° 61/617.468), lipídoides de aminoalcohol como los descritos en el documento WO2010/053572, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetil-amonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenilo-3-trimetilamonio propano), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" J. Contr. Rel. 2005, 107. 276-287), DLin-KC2-DMA (Semple, SC et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" Nature Biotech. 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love, KT et al. "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" PNAS 2010, 107. 1864-1869).

**[0083]** En algunas realizaciones, el porcentaje de lípido catiónico en un liposoma puede ser mayor que 10%, mayor que 20%, mayor que 30%, mayor que 40%, mayor que 50%, mayor que 60% o mayor que 70%. En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos constituyen uno o más 30-50% (por ejemplo, aproximadamente 30-45%, aproximadamente 30-40%, aproximadamente 35-50%, aproximadamente 35-45% o aproximadamente 35-40%) del liposoma en peso. En algunas realizaciones, el lípido catiónico (por ejemplo, cKK-E12) constituye aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, o aproximadamente el 50% de la relación liposómica por molar.

#### 45 Lípidos no catiónicos/auxiliares

**[0084]** En algunas realizaciones, los liposomas proporcionados contienen uno o más lípidos no catiónicos ("auxiliares"). 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 el presente documento, la frase "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que llevan una carga neta negativa en un H seleccionado, como el pH fisiológico. Lípidos no catiónicos incluyen, pero no se limitan a, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-l-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidilo etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), distearoilfosfatidilo-etanolamina (DSPE), 16-O-monometilo PE, 18-1-trans-PE, l-estearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), o una mezcla de los mismos.

**[0085]** En algunas realizaciones, tales lípidos no catiónicos se pueden usar solos, pero se usan preferiblemente en combinación con otros excipientes, por ejemplo, lípidos catiónicos. En algunas realizaciones, el lípido no catiónico puede comprender una relación molar de aproximadamente 5% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 10% a aproximadamente 70% del lípido total presente en un liposoma. En algunas realizaciones, un lípido no catiónico es un lípido neutro, es decir, un lípido que no lleva una carga neta en las condiciones en las que se formula y/o administra la composición. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípido no catiónico en un liposoma puede ser mayor que 5%, mayor que 10%, mayor que 20%, mayor que 30% o mayor que 40%.

Lípidos a base de colesterol

5 **[0086]** En algunas realizaciones, los liposomas proporcionados comprenden uno o más lípidos basados en colesterol. Por ejemplo, los lípidos catiónicos adecuados basados en colesterol incluyen, por ejemplo, DC-Choi (N,N-dimetilo-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilamino-propilo)piperazina (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); Patente de EE.UU. N° 5.744.335), o ICE. En algunas realizaciones, el lípido a base de colesterol puede comprender una ración molar de aproximadamente 2% a aproximadamente 30%, o aproximadamente 5% a aproximadamente 20% del lípido total presente en un liposoma. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípidos a base de colesterol en la nanopartícula lipídica puede ser mayor que 5%, 10%, mayor que 20%, mayor que 30% o mayor que 40%.

Lípidos PEGilados

15 **[0087]** En algunas realizaciones, los liposomas proporcionados comprenden uno o más lípidos PEGilados. Por ejemplo, el uso de fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG) y lípidos derivados como ceramidas derivatizadas (PEG-CER), que incluyen N-Octanoil-Esfingosina-1-[Succinilo(Metoxi Polietilenglicol)-2000] (C8 PEG-2000 Ceramida) también está contemplado por la presente invención en combinación con uno o más de los catiónicos y, en algunas realizaciones, otros lípidos juntos que comprenden el liposoma. Los lípidos modificados con PEG contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud  $C_6$ - $C_{20}$ . En algunas realizaciones, un lípido modificado con PEG o PEGilado es colesterol PEGilado o PEG-2K. La adición de dichos componentes puede prevenir la agregación compleja y también puede proporcionar un medio para aumentar la vida útil de la circulación y aumentar el suministro de la composición de lípido-ácido nucleico a la célula diana, (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), o pueden seleccionarse para intercambiar rápidamente fuera de la formulación *In Vivo* (ver la patente estadounidense n.º 5.885.613).

20 **[0088]** En algunas realizaciones, los lípidos intercambiables particularmente útiles son PEG-ceramidas que tienen cadenas de acilo más cortas (por ejemplo,  $C_{14}$  o  $C_{18}$ ). El fosfolípido modificado con PEG y los lípidos derivados para uso con la presente invención pueden comprender una relación molar de aproximadamente 0% a aproximadamente 15%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, o aproximadamente el 2% del total de lípidos presentes en el liposoma.

30 **[0089]** De acuerdo con diversas realizaciones, la selección de lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y/o lípidos modificados con PEG que comprenden la nanopartícula lipídica, así como la relación molar relativa de tales lípidos entre sí, se basa en las características de los lípidos seleccionados, la naturaleza de las células diana deseadas, las características del ARNm que se administrará. Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena de alquilo, así como el tamaño, carga, pH, pKa, fusogenicidad y toxicidad de los lípidos seleccionados. Por lo tanto, las relaciones molares se pueden ajustar en consecuencia

Polímeros

35 **[0090]** En algunas realizaciones, un vehículo de suministro adecuado se formula usando un polímero como vehículo, solo o en combinación con otros vehículos que incluyen diversos lípidos descritos en el presente documento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los vehículos de administración liposomal, como se usan en el presente documento, también abarcan nanopartículas que contienen polímeros. Los polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliácridatos, polialquialcanoacrilatos, polilactida, copolímeros de polilactida-poliglicolida, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas, protamina, protamina PEGilada, PLL, PLL PEGilada y polietilenimina (PEI). Cuando PEI está presente, puede ser PEI ramificado de un peso molecular que varía de 10 a 40 kDa, por ejemplo, PEI ramificado de 25 kDa (Sigma # 408727).

40 **[0091]** Un liposoma adecuado para la presente invención puede incluir uno o más de cualquiera de los lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos, lípidos de colesterol, lípidos PEGilados y/o polímeros descritos en el presente documento en diversas proporciones. Como ejemplos no limitantes, una formulación de liposoma adecuada puede incluir una combinación seleccionada de cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; o ICE, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K.

45 **[0092]** En diversas realizaciones, los lípidos catiónicos (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE y/o HGT4003) constituyen aproximadamente el 30-60% (por ejemplo, aproximadamente el 30-55%, aproximadamente el 30-50%, aproximadamente el 30-45%, aproximadamente 30-40%, aproximadamente 35-50%, aproximadamente 35-45%, o aproximadamente 35-40%) de la relación liposoma por molar. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípidos catiónicos (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, ICE y/o HGT4003) es o es mayor que aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, o aproximadamente el 60% de la relación liposoma por molar.

50 **[0093]** En algunas realizaciones, la relación de lípido(s) catiónico(s) a lípido(s) no catiónico(s) a lípido(s) a base de

colesterol a lípido(s) PEGilado(s) puede estar entre aproximadamente 30-60: 25-35: 20-30: 1-15, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación de lípido(s) catiónico(s) a lípido(s) no catiónico(s) a lípido(s) a base de colesterol a lípido(s) PEGilado(s) es de aproximadamente 40:30:20:10, respectivamente. En algunas realizaciones, la proporción de lípido(s) catiónico(s) a lípido(s) no catiónico(s) a lípido(s) a base de colesterol a lípido(s) PEGilado(s) es de aproximadamente 40:30:25:5, respectivamente. En algunas realizaciones, la proporción de lípido(s) catiónico(s) a lípido(s) no catiónico(s) a lípido(s) a base de colesterol a lípido(s) PEGilado(s) es de aproximadamente 40:32:25:3, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación de lípido(s) catiónico(s) a lípido(s) no catiónico(s) a lípido(s) a base de colesterol a lípido(s) PEGilado(s) es de aproximadamente 50:25:20:5.

#### 10 *Síntesis de ARNm*

**[0094]** Los ARNm de acuerdo con la presente invención se pueden sintetizar de acuerdo con cualquiera de una variedad de métodos conocidos. Por ejemplo, los ARNm de acuerdo con la presente invención pueden sintetizarse mediante transcripción *In Vitro* (TIV). En resumen, la TIV se realiza típicamente con una plantilla de ADN lineal o circular que contiene un promotor, un conjunto de trifosfatos de ribonucleótido, un sistema de tampón que puede incluir DTT e iones de magnesio, y una polimerasa de ARN apropiada (por ejemplo, polimerasa de ARN T3, T7 o SP6), ADNasa I, pirofosfatasa e/o inhibidor de ARNasa. Las condiciones exactas variarán según la aplicación específica.

**[0095]** En algunas realizaciones, para la preparación de ARNm de acuerdo con la invención, una plantilla de ADN se transcribe *In Vitro*. Una plantilla de ADN adecuada tiene típicamente un promotor, por ejemplo un promotor T3, T7 o SP6, para la transcripción *In Vitro*, seguido por la secuencia de nucleótidos deseada para el ARNm deseado y una señal de terminación.

**[0096]** La secuencia o secuencias de ARNm deseadas de acuerdo con la invención pueden determinarse e incorporarse en una plantilla de ADN utilizando métodos estándar. Por ejemplo, a partir de una secuencia de aminoácidos deseada (por ejemplo, una secuencia de enzima), se realiza una traducción inversa virtual basada en el código genético degenerado. Los algoritmos de optimización se pueden usar para seleccionar los codones adecuados. Por lo general, el contenido de G/C se puede optimizar para lograr el contenido de G/C más alto posible, por un lado, teniendo en cuenta de la mejor manera posible la frecuencia de los ARNt de acuerdo con el uso del codón por otro lado. La secuencia de ARN optimizada puede establecerse y mostrarse, por ejemplo, con la ayuda de un dispositivo de visualización adecuado y compararse con la secuencia original (tipo salvaje). También se puede analizar una estructura secundaria para calcular las propiedades de estabilización y desestabilización o, respectivamente, las regiones del ARN.

#### 35 ARNm modificado

**[0097]** En algunas realizaciones, el ARNm de acuerdo con la presente invención se puede sintetizar como un ARNm sin modificar o modificado. Normalmente, los ARNm se modifican para mejorar la estabilidad. Las modificaciones del ARNm pueden incluir, por ejemplo, modificaciones de los nucleótidos del ARN. Un ARNm modificado de acuerdo con la invención puede incluir, por ejemplo, modificaciones de la estructura principal, modificaciones de azúcar o modificaciones de bases. En algunas realizaciones, los ARNm pueden sintetizarse a partir de nucleótidos naturales y/o análogos de nucleótidos (nucleótidos modificados) que incluyen, entre otros, purinas (adenina (A), guanina (G)) o pirimidinas (timina (T), citosina (C), uracilo (U)), y como análogos de nucleótidos modificados o derivados de purinas y pirimidinas, como por ejemplo 1-metilo-adenina, 2-metilo-adenina, 2-metiltio-N6-isopendenilo-adenina, N6-metilo-adenina, N6-isopentenilo-adenina, 2-tio-citosina, 3-metilo-citosina, 4-acetilo-citosina, 5-metilo-citosina, 2,6-diaminopurina, 1-metilo-guanina, 2-metilo-guanina, 2,2-dimetilo-guanina, 7-metilo-guanina, inosina, 1-metilo-inosina, pseudouracilo (5-uracilo), dihidro-uracilo, 2-tio-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-carboximetilaminometilo-2-tio-uracilo, 5-(carboxihidroximetilo)-uracilo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-carboximetilaminometilo-uracilo, 5-metilo-2-tio-uracilo, 5-metilo-uracilo, metilo éster del ácido N-uracil-5-oxiacético, 5-metilaminometilo-uracilo, 5-metoxiaminometilo-2-tio-uracilo, 5'-metoxicarbonilmétilo-uracilo, 5-metoxi-uracilo, metilo éster del ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético (v), 1-metilo-pseudouracilo, queosina, β-D-manosilo-queosina, wybutoxosina y fosforamidatos, fosforotioatos, nucleótidos peptídicos, metilfosfonatos, 7-deazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina. La preparación de tales análogos es conocida por un experto en la técnica, por ejemplo, de la patente de EE.UU. N° 4.373.071, Patente de EE.UU. N° 4.401.796, Patente de EE.UU. N° 4.415.732, Patente de EE.UU. N° 4.458.066, Patente de EE.UU. N° 4.500.707. Patente de EE.UU. N° 4.668.777. Patente de EE.UU. N° 4.973.679, Patente de EE.UU. N° 5.047.524, Patente de EE.UU. N° 5.132.418, Patente de EE.UU. N° 5.153.319, Patente de EE.UU. N° 5.262.530 y 5.700.642.

**[0098]** En algunas realizaciones, los ARNm (por ejemplo, los ARNm que codifican ASS1) pueden contener modificaciones de la cadena principal de ARN. Típicamente, una modificación del esqueleto es una modificación en la que los fosfatos del esqueleto de los nucleótidos contenidos en el ARN se modifican químicamente. Las modificaciones de la columna vertebral a modo de ejemplo típicamente incluyen, pero no se limitan a, modificaciones del grupo que consiste en metilfosfonatos, metilfosforamidatos, fosforamidatos, fosforotioactivos (por ejemplo, citidina 5'-O-(1-tiofosfato), boranofosfatos, grupos guanidinio cargados positivamente etc., lo que significa reemplazar el enlace fosfodiéster por otros grupos aniónicos, catiónicos o neutros.

**[0099]** En algunas realizaciones, los ARNm (por ejemplo, los ARNm que codifican ASS1) pueden contener modificaciones de azúcar. Una modificación típica del azúcar es una modificación química del azúcar de los nucleótidos que contiene, incluidas, entre otras, modificaciones del azúcar elegidas del grupo que consiste en 2'-desoxi-2'-fluoro-oligorribonucleótido (2'-fluoro-2'-deoxicidina 5'-trifosfato, 2'-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato), 2'-deoxi-2'-deamina-oligorribonucleótido (2'-amino-2'-deoxicidina 5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato), 2'-O-alquiloligorribonucleótido, 2'-desoxi-2'-C-alquilol-oligorribonucleótido (2'-O-metilcitidina 5'-trifosfato, 2'-metiluridina 5'-trifosfato), 2'-C-alquiloligorribonucleótido y sus isómeros (2'-aracitidina 5'-trifosfato, 2'-arauridina 5'-trifosfato), o azidotrifosfatos (2'-azido-2'-deoxicidina 5'-trifosfato, 2'-azido-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato).

**[0100]** En algunas realizaciones, los ARNm (por ejemplo, los ARNm que codifican ASS1) pueden contener modificaciones de las bases de nucleótidos (modificaciones de la base). Un nucleótido modificado que contiene una modificación de base también se denomina nucleótido modificado de base. Los ejemplos de dichos nucleótidos modificados con bases incluyen, pero no se limitan a, 2-amino-6-cloropurina ribósido 5'-trifosfato, 2-aminoadenosina 5'-trifosfato, 2-tiocitidina 5'-trifosfato, 2-tiouridina 5'-trifosfato, 4-tiouridina 5'-trifosfato, 5-aminoalilcitidina 5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina 5'-trifosfato, 5-bromocitidina 5'-trifosfato, 5-bromouridina 5'-trifosfato, 5-yodocitidina 5'-trifosfato, 5-yodouridina 5'-trifosfato, 5-metilcitidina 5'-trifosfato, 5-metiluridina 5'-trifosfato, 6-azacitidina 5'-trifosfato, 6-azauridina 5'-trifosfato, 6-cloropurina ribósido 5'-trifosfato, 7-deazaadenosina 5'-trifosfato, 7-deazaguanosina 5'-trifosfato, 8-azaadenosina 5'-trifosfato, 8-azidoadenosina 5'-trifosfato, benzimidazole ribósido 5'-trifosfato, N1-metiladenosina 5'-trifosfato, N1-metilguanosina 5'-trifosfato, N6-metiladenosina 5'-trifosfato, O6-metilguanosina 5'-trifosfato, pseudouridina 5'-trifosfato, puomicina 5'-trifosfato o xantosina 5'-trifosfato.

**[0101]** Típicamente, la síntesis de ARNm incluye la adición de una "tapa" en el extremo N-terminal (5'), y una "cola" en el extremo C-terminal (3'). La presencia de la tapa es importante para proporcionar resistencia a las nucleasas que se encuentran en la mayoría de las células eucarióticas. La presencia de una "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación de la exonucleasa.

**[0102]** De este modo, en algunas realizaciones, los ARNm (por ejemplo, los ARNm que codifican ASS1) incluyen una estructura de tapa 5'. Una tapa 5' se agrega típicamente de la siguiente manera: primero, una fosfatasa terminal de ARN elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido 5', dejando dos fosfatos terminales; El trifosfato de guanosina (GTP) se agrega luego a los fosfatos terminales a través de una transferasa de guanililo, produciendo un enlace 5'5'5' trifosfato; y el 7-nitrógeno de la guanina se metila luego por una metiltransferasa. Los ejemplos de estructuras de tapa incluyen, pero no se limitan a, m7G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G.

**[0103]** En algunas realizaciones, los ARNm (por ejemplo, los ARNm que codifican ASS1) incluyen una estructura de cola poli(A) 3'. Una cola poli-A en el extremo 3' del ARNm generalmente incluye aproximadamente 10 a 300 nucleótidos de adenosina (SEQ ID NO: 9) (por ejemplo, aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de adenosina, aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de adenosina, aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de adenosina, aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de adenosina, o aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de adenosina). En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una estructura de cola poli(C) 3'. Una cola poli-C adecuada en el extremo 3' del ARNm incluye típicamente de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de citosina (SEQ ID NO: 10) (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de citosina, de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citosina, de 20 a 70 citosina) nucleótidos, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de citosina, o aproximadamente 10 a 40 nucleótidos de citosina). La cola de poli-C se puede agregar a la cola de poli-A o puede sustituir a la cola de poli-A.

**[0104]** En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una región no traducida 5' y/o 3'. En algunas realizaciones, una región 5' no traducida incluye uno o más elementos que afectan la estabilidad o traducción de un ARNm, por ejemplo, un elemento sensible al hierro. En algunas realizaciones, una región no traducida 5' puede tener una longitud de aproximadamente 50 a 500 nucleótidos.

**[0105]** En algunas realizaciones, una región 3' no traducida incluye una o más de una señal de poliadenilación, un sitio de unión para proteínas que afectan la estabilidad de la ubicación de un ARNm en una célula, o uno o más sitios de unión para los ARNm. En algunas realizaciones, una región 3' no traducida puede tener una longitud de entre 50 y 500 nucleótidos o más.

#### Estructura de tapa

**[0106]** En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una estructura de tapa 5'. Una tapa 5' se agrega típicamente de la siguiente manera: primero, una ARN fosfatasa terminal elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido 5', dejando dos fosfatos terminales; el trifosfato de guanosina (GTP) se agrega luego a los fosfatos terminales a través de una transferasa de guanililo, produciendo un enlace 5'5'5' trifosfato; y el 7-nitrógeno de la guanina se metila luego por una metiltransferasa. Los ejemplos de estructuras de tapa incluyen, pero no se limitan a, m7G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G.

**[0107]** Las estructuras de los tapa naturales comprenden una 7-metilguanosina que está unida mediante un puente trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, lo que da como resultado una tapa de dinucleótido de

m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')N, donde N es cualquier nucleósido. *In Vivo*, la tapa se añade enzimáticamente. La tapa se agrega en el núcleo y es catalizada por la enzima transferasa de guanililo. La adición de la tapa al extremo 5' terminal del ARN se produce inmediatamente después del inicio de la transcripción. El nucleósido terminal es típicamente una guanosina, y está en la orientación inversa a todos los otros nucleótidos, es decir, G(5')ppp(5')GpNpNp.

**[0108]** Una tapa común para el ARNm producido por transcripción *In Vitro* es m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G, que se ha usado como la tapa dinucleótido en la transcripción con polimerasa de ARN T7 o SP6 *In Vitro* para obtener ARN que tienen una estructura de tapa en sus 5'-terminales. El método predominante para la síntesis *In Vitro* de ARNm bloqueado emplea un dinucleótido preformado de la forma m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G ("m<sup>7</sup>GpppG") como iniciador de la transcripción.

**[0109]** Hasta la fecha, una forma habitual de una tapa de dinucleótido sintético usado en experimentos de traducción *In Vitro* es el análogo de tapa anti-inverso ("ARCA") o ARCA modificado, que generalmente es un análogo de tapa modificado en el que el grupo OH 2' o 3 se sustituye por -OCH<sub>3</sub>.

**[0110]** Los análogos de tapa adicionales incluyen, pero no se limitan a, estructuras químicas seleccionadas del grupo que consiste en m<sup>7</sup>GpppG, m<sup>7</sup>GpppA, m<sup>7</sup>GpppC; análogos de tapa no metilados (por ejemplo, GpppG); análogo de tapa dimetilada (por ejemplo, m<sup>2,7</sup>GpppG), análogo de tapa trimetilada (por ejemplo, m<sup>2,2,7</sup>GpppG), análogos de tapa simétricos dimetilados (por ejemplo, m<sup>7</sup>Gpppm<sup>7</sup>G), o análogos de tapa inversa (por ejemplo, ARCA; m<sup>7,2'Ome</sup>GpppG, m<sup>7,2'd</sup>GpppG, m<sup>7,3'Ome</sup>GpppG, m<sup>7,3'd</sup>GpppG y sus derivados de tetrafosfato) (ver, por ejemplo, Jemielity, J. et al., "Nuevos análogos de tapa" anti-inversos "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003)).

**[0111]** En algunas realizaciones, una tapa adecuada es un 7-metilo guanilato ("m<sup>7</sup>G") unido a través de un puente trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, dando como resultado m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')N, donde N es cualquier nucleósido. Una realización preferida de una tapa m<sup>7</sup>G utilizada en realizaciones de la invención es m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G.

**[0112]** En algunas realizaciones, la tapa es una estructura Tapa0. Las estructuras de Tapa0 carecen de un residuo 2'-O-metilo de la ribosa unida a las bases 1 y 2. En algunas realizaciones, la tapa es una estructura de Tapa1. Las estructuras de Tapa1 tienen un residuo 2'-O-metilo en la base 2. En algunas realizaciones, la tapa es una estructura de Tapa2. Las estructuras de Tapa2 tienen un residuo 2'-O-metilo unido a ambas bases 2 y 3.

**[0113]** En la técnica se conoce una variedad de análogos de cap de m<sup>7</sup>G, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Estos incluyen los m<sup>7</sup>GpppG descritos anteriormente, así como los análogos de tapa ARCA 3'-OCH<sub>3</sub> y 2'-OCH<sub>3</sub> (Jemielity, J. et al., RNA, 9: 1108-1122 (2003)). Los análogos de tapa adicionales para uso en realizaciones de la invención incluyen análogos de tetrafosfato de dinucleósido bencilado en N7 (descritos en Grudzien, E. et al., RNA, 10: 1479-1487 (2004)), análogos de tapa de fosforotioato (descritos en Grudzien-Nogalska, E., et al., RNA, 13: 1745-1755 (2007)), y análogos de tapa (incluidos análogos de tapa biotinilados) descritos en las patentes de EE.UU. Números 8.093.367 y 8.304.529.

#### Estructura de cola

**[0114]** Típicamente, la presencia de una "cola" sirve para proteger al ARNm de la degradación de la exonucleasa. Se cree que la cola poli A estabiliza los mensajeros naturales y el ARN de sentido sintético. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se puede agregar una larga cola poli A a una molécula de ARNm, lo que hace que el ARN sea más estable. Las colas de poli A se pueden agregar utilizando una variedad de técnicas reconocidas por el arte. Por ejemplo, pueden agregarse colas largas de poli A al ARN transcrito sintético o *In Vitro* usando polimerasa de poli A (Yokoe, et al. Nature Biotechnology, 1996; 14: 1252-1256). Un vector de transcripción también puede codificar largas colas de poli A. Además, las colas de poli A se pueden agregar mediante transcripción directamente de los productos de PCR. La poli A también se puede ligar al extremo 3' de un ARN sentido con ARN ligasa (ver, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª edición, ed. Por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: edición de 1991)).

**[0115]** En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una estructura de cola poli(A) 3'. Típicamente, la longitud de la cola de poli A puede ser al menos aproximadamente 10, 50, 100, 200, 300, 400 al menos 500 nucleótidos (SEQ ID NO: 11). En algunas realizaciones, una cola poli-A en el extremo 3' del ARNm típicamente incluye aproximadamente 10 a 300 nucleótidos de adenosina (SEQ ID NO: 9) (por ejemplo, aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de adenosina, aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de adenosina, aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de adenosina, aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de adenosina, o aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de adenosina). En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una estructura de cola poli(C) 3'. Una cola poli-C adecuada en el extremo 3' del ARNm incluye típicamente de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de citosina (SEQ ID NO: 10) (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de citosina, de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citosina, de 20 a 70 citosina) nucleótidos, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de citosina, o aproximadamente 10 a 40 nucleótidos de citosina). La cola de poli-C se puede agregar a la cola de poli-A o puede sustituir a la cola de poli-A.

**[0116]** En algunas realizaciones, la longitud de la cola de poli A o poli C se ajusta para controlar la estabilidad de

una molécula de ARNm de sentido modificado para uso con la invención y, por lo tanto, la transcripción de proteína. Por ejemplo, dado que la longitud de la cola de poli A puede influir en la vida media de una molécula de ARNm con sentido, la longitud de la cola de poliA se puede ajustar para modificar el nivel de resistencia del ARNm a las nucleasas y así controlar el curso del tiempo de la expresión de polinucleótidos y/o la producción de polipéptidos en una célula diana.

#### Región no traducida de 5' y 3'

**[0117]** En algunas realizaciones, los ARNm incluyen una región no traducida 5' y/o 3'. En algunas realizaciones, una región 5' no traducida incluye uno o más elementos que afectan la estabilidad o traducción de un ARNm, por ejemplo, un elemento sensible al hierro. En algunas realizaciones, una región no traducida 5' puede tener una longitud de aproximadamente 50 a 500 nucleótidos.

**[0118]** En algunas realizaciones, una región 3' no traducida incluye una o más de una señal de poliadenilación, un sitio de unión para proteínas que afectan la estabilidad de la ubicación de un ARNm en una célula, o uno o más sitios de unión para los ARNm. En algunas realizaciones, una región 3' no traducida puede tener una longitud de entre 50 y 500 nucleótidos o más.

Las secuencias UTR 3' y/o 5' ejemplares pueden derivarse de moléculas de ARNm que son estables (por ejemplo, globina, actina, GAPDH, tubulina, histona o enzimas del ciclo del ácido cítrico) para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm sentido. Por ejemplo, una secuencia UTR 5' puede incluir una secuencia parcial de un gen CMV inmediato-temprano 1 (IE1), o un fragmento del mismo para mejorar la resistencia a la nucleasa y/o mejorar la vida media del polinucleótido. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona de crecimiento humana (hGH), o un fragmento de la misma en el extremo 3' o región no traducida del polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para estabilizar aún más el polinucleótido. En general, estas modificaciones mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, la vida media) del polinucleótido en relación con sus homólogos no modificados, e incluyen, por ejemplo, modificaciones realizadas para mejorar la resistencia de tales polinucleótidos a la digestión con nucleasas *In Vivo*.

#### **Formación de liposomas**

**[0119]** Los vehículos de transferencia liposomal para uso en las composiciones de la invención pueden prepararse mediante diversas técnicas que se conocen actualmente en la técnica. Los liposomas para uso en composiciones proporcionadas pueden prepararse mediante diversas técnicas que se conocen actualmente en la técnica. Por ejemplo, las vesículas multilamelares (MLV) se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales, como depositar un lípido seleccionados 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 por secado por pulverización. Luego se puede agregar una fase acuosa al recipiente con un movimiento de vórtice que da como resultado la formación de MLV. Las vesículas unilamelares (ULV) pueden entonces formarse por homogeneización, sonicación o extrusión de las vesículas multilamelares. Además, las vesículas unilamelares pueden formarse mediante técnicas de eliminación de detergentes.

**[0120]** En ciertas realizaciones, las composiciones proporcionadas comprenden un liposoma en el que el ARNm está asociado tanto en la superficie del liposoma como encapsulado dentro del mismo liposoma. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, los liposomas catiónicos pueden asociarse con el ARNm a través de interacciones electrostáticas. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, los liposomas catiónicos pueden asociarse con el ARNm a través de interacciones electrostáticas.

**[0121]** En algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden ARNm encapsulado en un liposoma. En algunas realizaciones, una o más especies de ARNm pueden estar encapsuladas en el mismo liposoma. En algunas realizaciones, una o más especies de ARNm pueden encapsularse en diferentes liposomas. En algunas realizaciones, el ARNm está encapsulado en uno o más liposomas, que difieren en su composición lipídica, relación molar de componentes lipídicos, tamaño, carga (potencial Zeta), ligandos dirigidos y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, uno o más liposomas pueden tener una composición diferente de lípidos catiónicos, lípidos neutros, lípidos modificados con PEG y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, uno o más liposomas pueden tener una relación molar diferente de lípido catiónico, lípido neutro, colesterol y lípido modificado con PEG usado para crear el liposoma.

**[0122]** El proceso de incorporación de un ARNm deseado en un liposoma a menudo se denomina "carga". Los métodos ejemplares se describen en Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992. Los ácidos nucleicos incorporados en el liposoma se pueden ubicar completa o parcialmente en el espacio interior del liposoma, dentro de la membrana bicapa del liposoma, o asociarse con la superficie exterior de la membrana del liposoma. La incorporación de un ácido nucleico en liposomas también se denomina en este documento "encapsulación" en la que el ácido nucleico está completamente contenido dentro del espacio interior del liposoma. El propósito de incorporar un ARNm en un vehículo de transferencia, como un liposoma, a menudo es proteger el ácido nucleico de un entorno que puede contener enzimas o sustancias químicas que degradan los ácidos nucleicos y/o sistemas o receptores

que causan la rápida excreción de ácidos nucleicos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un vehículo de suministro adecuado es capaz de mejorar la estabilidad del ARNm contenido en el mismo y/o facilitar el suministro de ARNm a la célula o tejido diana.

#### 5 *Tamaño del liposoma*

5 [0123] Los liposomas adecuados de acuerdo con la presente invención se pueden fabricar en varios tamaños. En algunas realizaciones, los liposomas pueden hacerse más pequeños que los liposomas de encapsulación de ARNm conocidos anteriormente. En algunas realizaciones, el tamaño reducido de los liposomas se asocia con un  
10 suministro más eficaz de ARNm. La selección de un tamaño de liposoma apropiado puede tomar en consideración el sitio de la célula o tejido diana y hasta cierto punto la aplicación para la cual se está realizando el liposoma.

15 [0124] En algunas realizaciones, se selecciona un tamaño apropiado de liposoma para facilitar la distribución sistémica del anticuerpo codificado por el ARNm. En algunas realizaciones, puede ser deseable limitar la transfección del ARNm a ciertas células o tejidos. Por ejemplo, para apuntar a los hepatocitos, un liposoma puede tener un tamaño tal que sus dimensiones sean más pequeñas que las ventanillas de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos en el hígado; en tales casos, el liposoma podría penetrar fácilmente en tales fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos diana.

20 [0125] Alternativa o adicionalmente, un liposoma puede dimensionarse de manera que las dimensiones del liposoma sean de un diámetro suficiente para limitar o evitar expresamente la distribución en ciertas células o tejidos. Por ejemplo, un liposoma puede dimensionarse de manera tal que sus dimensiones sean mayores que las fenestraciones de la capa endotelial que recubren los sinusoides hepáticos para limitar así la distribución de los liposomas a los hepatocitos.

25 [0126] En algunas realizaciones, el tamaño de un liposoma se determina por la longitud del diámetro más grande de la partícula de liposoma. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño no mayor que aproximadamente 250 nm (por ejemplo, no mayor que aproximadamente 225 nm, 200 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm o 50 nm). En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño que varía de aproximadamente 10 a 250 nm (por ejemplo, que varía de aproximadamente 10 a 225 nm, de 10 a 200 nm, de 10 a 175 nm, de 10 a 150 nm, de 10 a 125 nm, de 10 a 100 nm, 10 a 75 nm, o 10 a 50 nm). En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño que varía de aproximadamente 100 - 250 nm (por ejemplo, que varía de aproximadamente 100 - 225 nm, 100 - 200 nm, 100 - 175 nm, 100 - 150 nm). En algunas realizaciones, un liposoma adecuado tiene un tamaño que varía de aproximadamente 10 a 100 nm (por ejemplo, que varía de aproximadamente 10 a 90 nm, 10 a 80 nm, 10 a 70 nm, 10 a 60 nm o 10 a 50 nm).

35 [0127] Una variedad de métodos alternativos conocidos en la técnica están disponibles para dimensionar una población de liposomas. Uno de tales métodos de dimensionamiento se describe en la patente de EE.UU. N° 4.737.323. La sonicación de una suspensión de liposomas, ya sea por baño o sonda, produce una reducción progresiva del tamaño hasta un ULV pequeño de menos de aproximadamente 0,05 micrones de diámetro. La homogenización es otro método que se basa en la energía de cizallamiento para fragmentar los liposomas grandes en otros más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las MLV se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrones. El tamaño de los liposomas puede determinarse por dispersión de luz casi eléctrica (QELS) como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10: 421-150 (1981). El diámetro promedio de los liposomas puede reducirse por sonicación de los liposomas formados. Los ciclos de sonicación intermitentes se pueden alternar con la evaluación QELS para guiar la síntesis de liposomas eficiente.

#### 50 *Composiciones farmacéuticas*

[0128] Para facilitar la expresión de ARNm *In Vivo*, los vehículos de administración, como los liposomas, se pueden formular en combinación con uno o más ácidos nucleicos adicionales, portadores, ligandos dirigidos o reactivos estabilizantes, o en composiciones farmacológicas donde se mezcla con excipientes adecuados. Las técnicas para la formulación y administración de medicamentos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, última edición.

60 [0129] Siempre que los ARNm encapsulados en liposomas o asociados, y las composiciones que los contienen, se puedan administrar de acuerdo con la práctica médica actual, teniendo en cuenta el estado clínico del sujeto, el sitio y el método de administración, la programación de la administración, la edad del sujeto, el sexo, el peso corporal y otros factores relevantes para los clínicos de habilidad ordinaria en la técnica. La "cantidad efectiva" para los fines de este documento puede determinarse por las consideraciones relevantes que conocen los expertos en investigación clínica experimental, farmacológica, clínica y médica. En algunas realizaciones, la cantidad administrada es eficaz para lograr al menos cierta estabilización, mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas de progreso, regresión o 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 la producción de proteínas transitorias (por ejemplo, enzimas).

**[0130]** Las vías de administración adecuadas incluyen la administración intravenosa.

**[0131]** Como alternativa o adicionalmente, los ARNm encapsulados en liposomas y las composiciones de la invención pueden administrarse de manera local más que sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en un tejido específico, preferiblemente en una formulación de liberación sostenida. Las composiciones de la presente invención se pueden inyectar en el sitio de manifestación de la enfermedad, por ejemplo.

**[0132]** Los métodos proporcionados de la presente descripción contemplan administraciones únicas y múltiples de una cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes terapéuticos (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína ASS1) descritos en el presente documento. Los agentes terapéuticos se pueden administrar a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, la gravedad y el alcance de la afección del sujeto (por ejemplo, ASD). En algunos aspectos, una cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes terapéuticos (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína ASS1) de la presente descripción puede administrarse por vía intratecal periódicamente a intervalos regulares (por ejemplo, una vez al año, una vez cada seis meses, una vez cada cinco meses, una vez cada tres meses, bimestral (una vez cada dos meses), mensual (una vez cada mes), quincenal (una vez cada dos semanas), una vez cada 30 días, una vez cada 28 días, una vez cada 14 días, una vez cada 10 días, una vez cada 7 días, semanales, diarios o continuos).

**[0133]** En algunas realizaciones, los liposomas y/o composiciones proporcionados se formulan de modo que sean adecuados para la liberación prolongada del ARNm contenido en los mismos. Dichas composiciones de liberación prolongada pueden administrarse convenientemente a un sujeto a intervalos de dosificación prolongados. 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, una vez cada 7 días, una vez cada 10 días, una vez cada 14 días, una vez cada 28 días, una vez cada 30 días, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o más preferiblemente una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada seis meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses o anualmente. También se contemplan composiciones y liposomas que están formulados para la administración de depósitos (por ejemplo, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intravítrea) para liberar un ARNm durante períodos prolongados de tiempo. Preferiblemente, los medios de liberación prolongada empleados se combinan con modificaciones hechas al ARNm para mejorar la estabilidad.

**[0134]** Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se determina en gran medida basándose en la cantidad total del agente terapéutico contenido en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para lograr un beneficio significativo para el sujeto (por ejemplo, tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar el ASD). Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado. En general, la cantidad de un agente terapéutico (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína ASS1) administrada a un sujeto que lo necesite dependerá de las características del sujeto. Tales características incluyen la afección, la gravedad de la enfermedad, la salud general, la edad, el sexo y el peso corporal del sujeto. Un experto habitual en la técnica podrá determinar fácilmente las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores relacionados. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos objetivos y subjetivos para identificar los intervalos de dosificación óptimos.

**[0135]** Una cantidad terapéuticamente eficaz se administra comúnmente en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una dosis unitaria apropiada dentro de un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad terapéuticamente efectiva específica (y/o la dosis unitaria) para cualquier paciente en particular puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína específica empleada; la duración del tratamiento; y como factores bien conocidos en las artes médicas.

**[0136]** En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz varía de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 500 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 400 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 300 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 200 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 90 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 80 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 70 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 60 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 40 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente

0,005 mg/kg de peso corporal a 30 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 25 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 20 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,005 mg/kg de peso corporal a 15 mg/kg de peso corporal, desde alrededor de 0,005 mg/kg G  
 5

**[0137]** En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz es mayor que aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 1,0 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 3 mg/kg de cuerpo corporal peso, mayor que aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 30 mg/kg de cuerpo peso, mayor que aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 70 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 80 mg/kg de cuerpo peso, mayor que aproximadamente 90 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 250 mg/kg de cuerpo peso, mayor que aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 350 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 450 m g/kg de peso corporal, mayor que aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal.

**[0138]** También se contemplan en el presente documento composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden uno o más de los liposomas descritos en el presente documento y métodos relacionados para el uso de tales composiciones como se describe, por ejemplo, en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/494.882, presentada el 8 de junio de 2011. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas liofilizadas de acuerdo con la invención pueden reconstituirse antes de la administración o pueden reconstituirse *In Vivo*. Por ejemplo, una composición farmacéutica liofilizada se puede formular en una forma de dosificación apropiada (por ejemplo, una forma de dosificación intradérmica, como un disco, varilla o membrana) y se puede administrar de manera tal que la forma de dosificación se rehidrate con el tiempo *In Vivo* por los fluidos corporales del individuo.

**[0139]** Los liposomas y composiciones proporcionadas pueden administrarse a cualquier tejido deseado. En algunas realizaciones, el ARNm administrado por liposomas o composiciones proporcionadas se expresa en el tejido en el que se administraron los liposomas y/o las composiciones. En algunas realizaciones, el ARNm administrado se expresa en un tejido diferente del tejido en el que se administraron los liposomas y/o las composiciones. Los tejidos ejemplares en los cuales el ARNm administrado puede administrarse y/o expresarse incluyen, entre otros, hígado, riñón, corazón, bazo, suero, cerebro, músculo esquelético, ganglios linfáticos, piel y/o líquido cefalorraquídeo.

**[0140]** De acuerdo con la presente invención, una dosis terapéuticamente eficaz, cuando se administra regularmente, da como resultado un aumento de los niveles de ASS1 hepático. En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz, cuando se administra regularmente, da como resultado un nivel reducido de citrulina en suero en comparación con el nivel de referencia de citrulina antes del tratamiento. En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz, cuando se administra regularmente, da como resultado un nivel reducido de amoníaco en el suero en comparación con el nivel basal de amoníaco antes del tratamiento.

**[0141]** En algunas realizaciones, la administración de la composición proporcionada da como resultado un aumento de la expresión de la proteína ASS1 en el hígado en comparación con los niveles de referencia antes del tratamiento. En alguna realización, la administración de las composiciones proporcionadas da como resultado un nivel de proteína ASS1 en o por encima de aproximadamente 3.000 ng/mg, en o por encima de aproximadamente 2.000 ng/mg, en o por encima de aproximadamente 1.000 ng/mg, en o por encima de aproximadamente 500 ng/mg, en o por encima de aproximadamente 400 ng/mg, en o por encima de aproximadamente 200 ng/mg o en o por encima de aproximadamente 100 ng/mg de proteína total en el hígado. En una realización particular, la administración de las composiciones proporcionadas da como resultado un nivel de proteína ASS1 en o por encima de 120 ng/mg de proteína total en el hígado.

**[0142]** En algunas realizaciones, la administración de la composición proporcionada da como resultado un aumento en el nivel de proteína ASS1 en plasma o suero en comparación con el nivel de referencia antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la administración de la composición proporcionada resulta en un aumento del nivel de proteína ASS1 en plasma o suero en al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95% en comparación con el nivel de referencia antes del tratamiento.

**[0143]** En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado niveles reducidos de citrulina y/o amoniaco en el sujeto en comparación con los niveles de referencia antes del tratamiento. Normalmente, los niveles de referencia se miden inmediatamente antes del tratamiento. Típicamente, los niveles de citrulina y/o amoniaco se miden en una muestra biológica. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, por ejemplo, sangre completa, plasma, suero, orina o líquido cefalorraquídeo.

**[0144]** En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un nivel reducido de citrulina en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de suero, plasma u orina) en al menos

aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% en comparación con el nivel de referencia de citrulina inmediatamente antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un nivel reducido de citrulina en plasma a menos de aproximadamente 2.000  $\mu\text{M}$ , 1.500  $\mu\text{M}$ , 1.000  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 90  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , o 30  $\mu\text{M}$ .

**[0145]** En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado niveles reducidos de amoníaco en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de suero, plasma u orina) en al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 15%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 35%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 45%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 55%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% en comparación con el nivel inicial inmediatamente antes del tratamiento.

**[0146]** En algunas realizaciones, la administración de la composición proporcionada da como resultado niveles reducidos de amoníaco en plasma o suero en comparación con el nivel basal de amoníaco inmediatamente antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la administración de la composición proporcionada da como resultado niveles reducidos de amoníaco en plasma o suero en comparación con el nivel de amoníaco en sujetos que no están tratados. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado la reducción de los niveles de amoníaco a aproximadamente 3.000  $\mu\text{mol/L}$  o menos, aproximadamente 2.750  $\mu\text{mol/L}$  o menos, aproximadamente 2.500  $\mu\text{mol/L}$  o menos, aproximadamente 2.250  $\mu\text{mol/L}$  o menos, aproximadamente 2.000  $\mu\text{mol/L}$  o menos, alrededor de 1.750  $\mu\text{mol/L}$  o menos, alrededor de 1.500  $\mu\text{mol/L}$  o menos, alrededor de 1.250  $\mu\text{mol/L}$  o menos, alrededor de 1.000  $\mu\text{mol/L}$  o menos, alrededor de 750  $\mu\text{mol/L}$  o menos, alrededor de 500  $\mu\text{mol/L}$  o menos, aproximadamente 250  $\mu\text{mol/L}$  o menos, aproximadamente 100  $\mu\text{mol/L}$  o menos o aproximadamente 50  $\mu\text{mol/L}$  o menos en el plasma o suero. En una realización particular, la administración de la composición da como resultado la reducción de los niveles de amoníaco a aproximadamente 50  $\mu\text{mol/L}$  o menos en el plasma o suero.

**[0147]** De acuerdo con diversas realizaciones, el tiempo de expresión de los ARNm administrados puede ajustarse para adaptarse a una necesidad médica particular. En algunas realizaciones, la expresión de la proteína codificada por el ARNm administrado es detectable 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y/o 96 horas después de la administración de los liposomas y/o composiciones proporcionados. En algunas realizaciones, la expresión de la proteína codificada por el ARNm administrado es detectable 1 semana, 2 semanas y/o 1 mes después de la administración.

## EJEMPLOS

**[0148]** Aunque ciertas composiciones de la presente invención se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar las composiciones de la invención y no pretenden limitarlas.

### ***Ejemplo 1. Formulaciones de liposomas ejemplares para la administración y expresión de ARNm de ASS1***

**[0149]** Este ejemplo proporciona formulaciones de liposomas a modo de ejemplo para el suministro y la expresión eficaces de ARNm de ASS1 *In Vivo*.

#### *Materiales lipídicos*

**[0150]** Las formulaciones descritas en este documento incluyen una mezcla de lípidos de múltiples componentes de proporciones variables que emplean uno o más lípidos catiónicos, lípidos auxiliares (por ejemplo, lípidos catiónicos y/o lípidos a base de colesterol) y lípidos PEGilados diseñados para encapsular ARNm que codifica proteína ASS1. Los lípidos catiónicos pueden incluir (pero no exclusivamente) DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenilo-3-trimetilamonio propano), DLinDMA (Heyes, J.; Palmer, L.; Bremner, K.; MacLachlan, I. "Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids" *J. Contr. Rel.* 2005, 107, 276- 287), DLin-KC2-DMA (sem., SC et al. "Rational Design of Cationic Lipids for siRNA Delivery" *Nature Biotech.* 2010, 28, 172-176), C12-200 (Love, KT et al. "Lipid-like materials for low-dose in vivo gene silencing" *PNAS* 2010, 107, 1864-1869), cKK-E12 (3,6-bis(4-(bis(2-hidroxi-dodil)amino)butilo)piperazina-2, 5-diona), HGT5000, HGT5001, HGT4003, ICE, a base de dialquilamino, a base de imidazol, a base de guanidinio, etc. Los lípidos pueden incluir (pero no exclusivamente) DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoethanolamina), DOPC (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfotidilcolina) DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-) fosfoetanolamina), DOPG (2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfos (1'-rac-glicerol), colesterol, etc. Los lípidos PEGilados pueden incluir (pero no exclusivamente) una cadena de poli(etileno)glicol de hasta 5 kDa de longitud covalentemente unidos a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud  $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ .

**[0151]** El ARN mensajero de sintetasa de argininosuccinato (ASS1) humano optimizado con codón se sintetizó

mediante transcripción *In Vitro* de una plantilla de ADN plasmídica que codifica el gen, que fue seguida por la adición de una estructura de tapa 5' (Tapa 1) (Fechter, P.; Brownlee, GG "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249) y una cola 3' de poli(A) de aproximadamente 250 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 12) según lo determinado por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas en 5' y 3' presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente, y se definen como se indica (vide infra).

*ARNm de sintetasa de argininosuccinato humano (ASS1) ejemplar optimizado en codón*

10 *Diseño de construcciones:*

**[0152]**

X - SEQ ID NO: 3 - Y;

X - SEQ ID NO: 13 - Y;

X-SEQ ID NO: 14 - Y; y

X - SEQ ID NO: 15 - Y.

*Secuencias UTR 5' y 3'*

**[0153]**

X (secuencia UTR 5') =

GGACAGAUCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUC  
CGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG [SEQ  
ID NO.:4]

Y (secuencia 3' UTR) =

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAG  
CCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU [SEQ ID NO.:5]

OR

GGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGC  
CUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ ID NO.:6)

**[0154]** Las secuencias de ARNm de ASS1 humano optimizadas en codón ejemplares incluyen la SEQ ID NO: 3 descrita en la sección de descripción detallada, y la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 15 a continuación:

SEQ ID NO: 13

ES 2 707 966 T3

5 AUGAGCUCAAAGGGGAUCUGUGGGUGCUGGCAUACUCGGGGGGAUUGGACACUUCAUGCAUACUUGUCUGGU  
UGAAGGAACAGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUGGCUAACAUCGGUCAAAGGAGGACUUCGAGGAGGCC  
CGGAAGAAGGCCCUGAAGCUGGGCGCGAAGAAAGUGUUAUCGAGGACGUGUCCCCGGGAUUUGUGGAAG  
10 AGUUAUCUGGGCCCGCAUCCAAAGCAGCGCACUGUACGAGGAUAGAUACCUCCUCGGAACAUCCCUUGCCC  
GGCCAUGUAUUGCCAGGAAACAGGUGGAAAUCGCCAGCGGGAAGGAGCCAAAUACGUGUCCACGGGGCG  
ACGGAAAGGGGAACGACCAAGUGCGCUUCGAGCUGUCGUGCUACUCCUGGCACCGCAGAUUAAGGUCAU  
15 CGCGCCGUGGAGAAUGCCUGAAUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGAUCUGAUGGAAUACGCCAAGCA  
GCACGGCAUCCCGAUCCCCGUGACCCCUAAGAACCCUUGGUCAAUGGACGAGAAUCUGAUGCACAUCAGCUA  
CGAAGCGGGCAUCCUGGAGAACCCCAAGAAUCAAGCUCGCCCGGACUGUACACUAAGACUCAGGAUCCCGC  
20 UAAGGCGCCCAACACUCCUGAUUUUUUGGAAUUCGAAUUAAGAAGGGUGUCCAGUGAAGGUCACCAACG  
UGAAGGACGGCACUACCCACCAGACCUCGCUUGAACUGUUUAUGUAUCUGAACGAGGUGGCCGGCAAACAU  
GGAGUCGGCAGAAUCGAUUAUUGUGGAGAACCGCUUUUAUUGGCAUGAAGUCCAGGGGGAUUAUGAAACCC  
25 CGGCCGGAACCAUCCUCUACCACGCCAUUCGACAUUGAAGCGUUCACCAUGGACCGCGAGGUCCGCAAGA  
UUAAGCAGGGCCUGGGACUCAAGUUCGCCGAGCUCGUGUACACCGGUUUCUGGCAUUCGCCGAAUGCGAA  
UUCGUGCGACACUGCAUUGCCAAGAGCCAGGAGCGGGUGGAAGGAAAGGUCCAGGUGUCCGUGCUGAAGG  
30 GUCAAGUGUACAUCCUGGGGCGGGAGUCCCCUCUUUCCUGUACAACGAAGAACUGGUGUCGAUGAACGUG  
CAGGGAGACUACGAGCCGACCGACGCCACGGUUUCAUUAACAUCAAUUCUCCUGAGACUGAAGGAGUACCAC  
CGGCUCCAGUCCAAAGUCACCGCUAAGUGA (SEQ ID NO:13),

SEQ ID NO: 14

35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

ES 2 707 966 T3

5 AUGAGCUCAAAAGGAUCCGGUUGGUGCUGGCAUACUCGGGAGGAAUUGGACACUUCAUGUAUUUCUUGUCUGGC  
UCAAGGAACAGGGCUACGACGUCAUUGCCUACCUUGGCCAACAUCCGGUCAGAAAGAGGACUUCGAGGAAGCCA  
GAAAGAAGGCCUGAAGCUGGGAGCCAAGAAGGUGUUCAUCGAGGACGUGUCCCGCAAUUUGUGGAAGA  
10 AUUCAUCUGGCCUGCCAUCUAAUCCUCCGCGCUCUACGAGGAUCGGUACCUUCUGGGAACUUCUUGGCUC  
GCCCGUGCAUCGCCGAAACAAGUGGAGAUUGCACAGCGGGAAGGAGCUAAGUACGUGUCCACGGGGCC  
ACUGGAAAGGGCAACGAUCAAGUGCGCUUCGAGCUGUCCUGCUACUCCUGGGCGCCACAGAUCAAGGUCAUC  
15 GCGCCGUGGGCGGAUGCCCGAGUUCUAUAACCGCUUCAAGGGACGGAACGAUCUGAUGGAGUACGCCAAGCA  
GCACGGCAUUCGGAUACCCGUGACCCCAAGAACCCUUGGAGCAUGGACGAGAACCUGAUGCAUAUCUCUUA  
CGAAGCCGGGAUUCUCGAAAACCCUAAGAAUCAGGCGCCGCCUGGCCUGUACACCAAAACCCAGGACCCCGCC  
20 AAGGCGCCGAACACGCCCGACAUCUUCGAAAUCGAGUUCAAGAAGGGGGUGCCAGUGAAGGUCACCAACGUG  
AAGGACGGAACCAUCAAGACCUACUGGAACUCUUCAUGUACCUCAACGAGGUCGCGAGGGAAGCACGGC  
GUGGGGAGAAUCGACAUCGUGGAAAACAGGUUCAUCGGCAUGAAGUCCCGGGAAUCUACGAAACACCCGC  
25 CGGGACUAUCCUCUACACGCCACCUGGACAUUGAGGCCUUCACCAUGGAUAGAGAAGUGCGCAAGAUUA  
GCAGGGUCUGGGUCUGAAGUUCGCCGAGUUGGUCUACACCGGAUUCUGGCAUUCUUUGAAUUGCGAAUUC  
GUGCGCCACUGCAUUGCCAAGAGCCAGGAAAGAGUGGAGGGCAAAGUCCAAGUGUCGGUGCUGAAGGGCCA  
30 AGUGUACAUCUUGGGAAGGGAAAGCCCGCUCUCCUGUACAACGAGGAACUGGUGUCGAUGAACGUCCAGG  
GCGAUUAUGAGCCGACUGACGCCACUGGUUUUAUCAAUUCAACAGCCUGCGACUGAAGGAGUACACCCGG  
CUGCAGUCCAAGGUCACCGCUAAGUAG (SEQ ID NO:14),

35 SEQ ID NO: 15

40 AUGAGCUCGAAAGGAUCCGUGGUUUUGGCAUACUCCGGUUGGACUUGACACUUCAUGCAUUUUGGUUUUGGC  
UCAAGAAGAGGGCUACGAUGUGAUCGCCUACCUUGGCCAACAUCCGGACAGAAAGAGGACUUGAAGAGGCC  
CGCAAGAAGGCACUGAAGCUGGGUGCCAAGAAAGUGUUUAUCGAGGAUGUGUCGAGAGAAUUCGUGGAAG  
45 AAUUCAUUUGGCCAGCCAUCUAAAGCUCGCGCUGUACGAGGACAGAUACCUCCUGGCACCUACUGGCC  
GCCUUGCAUCGCGCGCAAACAGGUCGAGAUUCGCUAAAGAGAAGGAGCUAAAUACGUGUCACACGGCGCCA  
CCGGAAGGGAAUUGACCAAGUCCGCUUCGAGCUGUCUUGCUACUCACUCGCUCCGCAAUUAAGGUCAUCG  
50 CACCGUGGAGGAUGCCCGAGUUCUACAACCGGUUCAAGGGGCGGAACGACCUGAUGGAGUACGCGAAGCAG  
CACGGUAUCCCGAUCCUGUACCCCAAGAACCCUGGAGCAUGGACGAAAUCUGAUGCACAUCAGCUAC  
GAAGCAGGAAUCCUGGAGAACCCGAAAAUUAAGCACCUCUUGGACUGUACACUAAGACCCAGGACCCAGCCA

55

60

65

## ES 2 707 966 T3

5 AGGCCCCGAAUACCCCGGACAUCUUGGAAAUCGAGUUCAAGAAGGGGGUGCCAGUGAAGGUUACCAAUGUC  
AAGGAUGGGACCACUCACCAAACUAGCCUGGAACUGUUAUGUACCUGAACGAAGUGGCUGGAAAACAUGG  
CGUGGGGAAGAAUCGAUAUCGUGGAGAACCUCUUCUACUGGCAUGAAGUCAAGGGGAAUCUACGAAACUCCGG  
CCGGGACGAUACUGUAUCAUGCGCAUCUCGACAUUGAAGCCUUUACUAUGGAUCGGGAAGUCCGAAAGAU  
10 AAACAGGGCUUGGGCCUCAAGUUUGCCGAGCUGGUGUACACGGGAUUCUGGCACUCGCCGGAAUGCGAAU  
CGUGCGCCACUGUAUUGCGAAGUCCAGGAGCGCGUGGAAGGGAAGGUCCAAGUCUCCGUGCUCAAAGGAC  
AGGUCUACAUCUUGGACGGGAGUCGCCCCUGUCGUCUACAACGAAGAACUGGUGUCGAUGAACGUGCAG  
15 GGAGACUAUGAACCAACGGAUGCUACUGGUUUAUCAACAUAUUCGUCGCGGCUUAAGGAGUACCAUCG  
CGUCGAGUCCAAGGUCACCGCGAAGUAG (SEQ ID NO:15).

20 **[0155]** Una secuencia ejemplar de ARN mensajero de sintetasa de argininosuccinato humana (ASS1) optimizada en codón de longitud completa se muestra a continuación:

25 GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCAUAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUC  
CGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCGCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUG  
AGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGCUGGCCUACAGCGGGCCUGGACACCAGCUGCAUCCUGGUGUGGCUGAA  
30 GGAGCAGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUUGGCCAACAUCCGCCAGAAGGAGGACUUCGAGGAGGCCCGCAA  
GAAGGCCCUGAAGCUGGGCGCCAAGAAGGUGUUAUCGAGGACGUGAGCCGCGAGUUCGUGGAGGAGUUC  
AUCUGGCCCGCCAUCCAGAGCAGCGCCUGUACGAGGACCGCUACCUUGCUGGGCACCCAGCCUGGCCCGCCCCU  
35 GCAUCGCCCCGAAGCAGGUGGAGAUCCGCCAGCGGAGGGCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACCGGCA  
AGGGCAACGACCAGGUGCGCUUCGAGCUGAGCUGCUACAGCCUGGCCCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCCCCU  
GGCGCAUGCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGACCUGAUGGAGUACGCCAAGCAGCACGGCA  
40 UCCCCAUCCCCGUGACCCCCAAGAACCCUUGGAGCAUGGACGAGAACCUGAUGCACAUCAGCUACGAGGCCGG  
CAUCCUGGAGAACCCCAAGAACCAGGCCCCCCCGGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCGCCAAGGCCCCCA  
ACACCCCGACAUCUGGAGAUUCGAGUUCAAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGUGAAGGACGGCA  
45 CCACCCACCAGACCAGCCUGGAGCUGUUAUGUACCUGAACGAGGUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGCCGCA  
UCGACAUCGUGGAGAACCGCUUCAUCGGCAUGAAGAGCCGCGGAUCUACGAGACCCCGCCGGCACCAUCC  
UGUACCACGCCACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGCGCAAGAUCAAGCAGGGCCUGG  
50 GCCUGAAGUUCGCCGAGCUGGUGUACACCGGCUUCUGGCACAGCCCCGAGUGCGAGUUCGUGCGCCACUGC  
AUCGCCAAGAGCCAGGAGCGGUGGAGGGCAAGGUGCAGGUGAGCGUGCUAAGGGCCAGGUGUACAUCU  
GGGCCGCGAGAGCCCCUGAGCCUGUACAACGAGGAGCUGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUACGAGC  
55 CCACCGACGCCACCGGCUUCAUCAACAUAACAGCCUGCGCCUGAAGGAGUACCACCGCCUGCAGAGCAAGGU  
GACCGCCAAGUGACGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUC  
60 CAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ ID NO:7).

**[0156]** En otro ejemplo, a continuación se muestra una secuencia de ARN mensajero de sintetasa de argininosuccinato humana (ASS1) optimizada en codón de longitud completa:

65

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUC  
 CGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUG  
 AGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGCUGGCCUACAGCGGCGGCCUGGACACCAGCUGCAUCCUGGUGUGGCUGAA  
 GGAGCAGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCGUGGCAACAUCGGCCAGAAGGAGGACUUCGAGGAGGCCCGCAA  
 GAAGGCCUGAAGCUGGGCGCCAAGAAGGUGUUAUCGAGGACGUGAGCCGCGAGUUCGUGGAGGAGUUC  
 AUCUGGCCCGCCAUCCAGAGCAGCGCCUGUACGAGGACCGCUACCGUGCGGCCACCAGCCUGGCCCGCCCCU  
 GCAUCGCCCGCAAGCAGGUGGAGAUCCGCCAGCGGAGGGCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACCGGCA  
 AGGGCAACGACCAGGUGCGCUUCGAGCUGAGCUGCUACAGCCUGGCCCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCCCCCU  
 GGCGCAUGCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCGCAACGACCUGAUGGAGUACGCCAAGCAGCACGGCA  
 UCCCCAUCCCCGUGACCCCAAGAACCAGGCCCGCCCGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCGCCAAGGCCCCCA  
 CAUCCUGGAGAACCCCAAGAACCAGGCCCGCCCGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCGCCAAGGCCCCCA  
 ACACCCCGGACAUCUGGAGAUCGAGUUCAAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGUGAAGGACGGCA  
 CCACCCACCAGACCAGCCUGGAGCUGUUAUGUACCUGAACGAGGUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGCCGCA  
 UCGACAUCGUGGAGAACCUCUUAUCGGCAUGAAGAGCCGCGGCAUCUACGAGACCCCGCCGGCACCAUCC  
 UGUACCACGCCACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGCGCAAGAUCAAGCAGGGCCUGG  
 GCCUGAAGUUCGCCGAGCUGGUGUACACCGGCUUCUGGCACAGCCCGAGUGCGAGUUCGUGCGCCACUGC  
 AUCGCCAAGAGCCAGGAGCGGUGGAGGGCAAGGUGCAGGUGAGCGUGCUGAAGGGCCAGGUGUACAUCUCCU  
 GGGCCGCGAGAGCCCCUGAGCCUGUACAACGAGGAGCUGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUACGAGC  
 CCACCGACGCCACCGGCUUCAUCAACAUCAACAGCCUGCGCCUGAAGGAGUACCACCGCCUGCAGAGCAAGGU  
 GACCGCCAAGUGAGGGUGGCAUCCUGUGACCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCACUCC  
 AGUGCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ ID NO:8).

40 *Protocolos de formulación ejemplares*

*A. cKK-E12*

45  
50

**[0157]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm ASS1 a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa 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. Concentración final = 0,64 mg/ml de ARNm ASS1 (encapsulado).  $Z_{ave} = 78$  nm ( $Dv_{(50)} = 46$  nm;  $Dv_{(90)} = 96$  nm).

*B. C12-200*

55  
60

**[0158]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm ASS1 a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa 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. Concentración final = 0,82 mg/ml de ARNm ASS1 (encapsulado).  $Z_{ave} = 86$  nm ( $Dv_{(50)} = 50$  nm;  $Dv_{(90)} = 101$  nm).

*C. HGT4003*

65

**[0159]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm ASS1 a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución

lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa 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. Concentración final = 0,82 mg/ml de ARNm ASS1 (encapsulado).  $Z_{ave} = 86$  nm ( $Dv_{(50)} = 50$  nm;  $Dv_{(90)} = 101$  nm).

5

#### D. ICE

**[0160]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de ICE, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm ASS1 a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa 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. Concentración final = 0,91 mg/ml de ARNm ASS1 (encapsulado).  $Z_{ave} = 81$  nm ( $Dv_{(50)} = 48$  nm;  $Dv_{(90)} = 96$  nm).

10

15

#### E. HGT5001

**[0161]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT5001, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm ASS1 a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa 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. Concentración final = 0,20 mg/ml ARNm ASS1 (encapsulado).  $Z_{ave} = 87,0$  nm ( $Dv_{(50)} = 75$  nm;  $Dv_{(90)} = 103$  nm).

20

25

#### F. HGT5000

**[0162]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT5000, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm ASS1 a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa 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. Concentración final = 0,20 mg/ml ARNm ASS1 (encapsulado).  $Z_{ave} = 81$  nm ( $Dv_{(50)} = 67$  nm;  $Dv_{(90)} = 97$  nm).

30

35

#### G. DLinKC2DMA

**[0163]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de DLinKC2DMA, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm ASS1 a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa 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. Concentración final = 0,20 mg/ml ARNm ASS1 (encapsulado).  $Z_{ave} = 78$  nm ( $Dv_{(50)} = 60$  nm;  $Dv_{(90)} = 92$  nm).

40

45

#### H. DODAP

**[0164]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de DODAP, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm ASS1 a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa 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. Concentración final = 0,20 mg/ml ARNm ASS1 (encapsulado).  $Z_{ave} = 84$  nm ( $Dv_{(50)} = 62$  nm;  $Dv_{(90)} = 92$  nm).

50

55

#### I. DODMA

**[0165]** Se mezclaron partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de DODMA, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, una solución acuosa tamponada (citato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) del ARNm ASS1 se preparó a partir de una reserva de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución de ARNm acuosa 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. Concentración final = 0,20 mg/ml ARNm ASS1 (encapsulado).  $Z_{ave} = 86$  nm ( $Dv_{(50)} = 69$  nm;  $Dv_{(90)} = 98$  nm).

60

65

### **Ejemplo 2. Administración de nanopartículas de liposomas cargadas con ARNm ASS1**

**[0166]** Este ejemplo ilustra métodos ejemplares de administración de nanopartículas de liposomas cargados con ARNm ASS1 y métodos para analizar proteínas expresadas en varios tejidos diana *In Vivo*.

5 **[0167]** Todos los estudios se realizaron utilizando ratones machos CD-1 de aproximadamente 6-8 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Las muestras se introdujeron mediante una inyección única en la vena de la cola de un bolo de una dosis total equivalente de 1,0 mg/kg (o especificado de lo contrario) de ARNm ASS1 encapsulado. Los ratones se sacrificaron y se perfundieron con solución salina en los puntos de tiempo designados.

10 **[0168]** Los tejidos como el hígado, el bazo, el riñón y el corazón de cada ratón se recolectaron, se repartieron en partes separadas y se almacenaron en formalina neutra al 10% neutralizada o se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80°C para su análisis.

15 **[0169]** Todos los animales se sometieron a eutanasia por asfixia con CO<sub>2</sub> en los puntos de tiempo designados después de la administración de la dosis ( $\pm$  5%), seguidos de una toracotomía y una extracción terminal de sangre cardíaca. La sangre completa (volumen máximo obtenible) se recogió mediante punción cardíaca en animales sacrificados en tubos separadores de suero, se dejó coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, se centrifugó a 22°C  $\pm$  5°C a 9.300 g durante 10 minutos, y se extrajo el suero. Para las recolecciones de sangre provisionales, se recolectaron aproximadamente 40-50  $\mu$ l de sangre completa mediante punción de la vena facial o corte de cola. Las muestras recogidas de animales sin tratamiento se utilizaron como niveles basales de ASS1 para la comparación con los animales de estudio.

*Análisis de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)- ELISA ASS1 humano*

25 **[0170]** Se siguieron los procedimientos ELISA estándar empleando IgG anti-ASS1 2D1-2E12 de ratón como anticuerpo de captura con IgG anti-ASS1 #3285 de conejo como anticuerpo secundario (detección) (Shire Human Genetic Therapies). Se utilizó IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para la activación de la solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). La reacción se detuvo utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N después de 20 minutos. La detección se controló mediante absorción (450 nm) en un instrumento Molecular Device SpectraMax. Se utilizaron suero y órganos de ratón no tratados y proteína ASS1 humana como controles negativo y positivo, respectivamente.

**Ejemplo 3. Expresión de proteína ASS1 eficiente In Vivo**

35 **[0171]** Este ejemplo demuestra que la administración de ARNm ASS1 da como resultado la producción exitosa de proteínas y la eficacia clínica *In Vivo*.

40 **[0172]** La producción de la proteína ASS1 humana a través de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de hASS1 optimizadas en codón se ensayó en ratones CD-1 como una inyección intravenosa única en bolo. La Figura 1 representa la cantidad de proteína ASS1 humana detectada a través de ELISA cuando los ratones se trataron con nanopartículas lipídicas basadas en cKK-E12 cargadas con ARNm ASS1 humano a diversas dosis. Los ratones se sacrificaron veinticuatro horas después de la inyección y los órganos se recogieron (como se describe anteriormente).

45 **[0173]** Como se muestra en la Figura 1, se logró una respuesta clara a la dosis al medir los niveles hepáticos de la proteína ASS1 humana. El intervalo de dosificación fue de 0,10 a 2,0 mg/kg de ARNm ASS1 humano encapsulado. Estos datos demuestran la capacidad de las nanopartículas lipídicas para acumularse en el hígado y liberar la carga útil del ARNm y el hígado para procesar este ARNm exógeno a través de la traducción para producir la proteína ASS1 humana. Los valores crudos de la proteína ASS1 humana medidos mediante análisis ELISA (como se muestra en la Figura 1) se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Dosis de ARNm ASS1 encapsulado (mg/kg)	Proteína ASS1 Humana (proteína total ng/mg)
0,10	BLD
0,30	BLD
0,60	546
1,0	1388
2,0	3371

65 El ARNm de ASS1 humano optimizado en codón se administró a través de nanopartículas lipídicas basadas en cKK-E12. Las dosis se basan en el ARNm de ASS1 encapsulado. Los valores se representan como nanogramos de

proteína ASS1 humana por miligramo de proteína total en el hígado. BLD = Por debajo del límite de detección para ELISA.

5 **[0174]** Mientras que la sensibilidad del ELISA tiene limitaciones a valores más bajos, el análisis de transferencia Western permite una visualización clara de la proteína ASS1 humana a dosis más bajas (0,30 mg/kg) (Figuras 2A-2D).

10 **[0175]** Para comprender mejor la capacidad de las nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm ASS1 para facilitar el suministro de ARNm a órganos seleccionados (hígado), se realizó un estudio farmacocinético que controla los niveles de proteína ASS1 humana en el hígado durante un período de una semana. La Figura 3 representa la cantidad de proteína ASS1 humana detectada en el hígado en varios puntos de tiempo después de la administración de nanopartículas lipídicas cargadas con ASS1 (cKK-E12). Esto se logró como una dosis única (1,0 mg/kg de ARNm encapsulado) administrada por vía intravenosa.

15 **[0176]** En este caso, observamos un nivel sérico máximo de proteína ASS1 humana aproximadamente a las 24-48 horas después de la administración. Se observaron niveles medibles de proteína 1 semana después de la administración, según lo determinado por ELISA y transferencia Western (Figuras 3 y 4A-4E, respectivamente).

20 **[0177]** La detección directa del ingrediente farmacéutico activo (ARNm de ASS1) en los hígados de los ratones tratados se logró utilizando métodos basados en hibridación *in situ* (ISH). Como se demuestra en las Figuras 5A-5I, el ARN mensajero ASS1 humano exógeno se pudo detectar en niveles altos en el punto de tiempo más temprano ensayado (30 minutos) y la señal permaneció fuerte durante 48 horas después de la dosificación. Además, el ARNm de ASS1 humano todavía era detectable 7 días después de la administración.

25 **[0178]** Además de ISH, la detección de la proteína ASS1 humana resultante se logró utilizando medios inmunohistoquímicos (IHC). Usando un anticuerpo monoclonal de ratón (02D2-2E12) para la unión específica, observamos fácilmente la proteína ASS1 humana diana en el citoplasma de hepatocitos de hígados tratados. La señal se observó por primera vez en los hígados tratados, ligeramente dentro de los 30 minutos, pero claramente dentro de las 3 horas posteriores a la administración. Las Figuras 6A-6I muestran la tinción de la proteína ASS1 humana en hígados de ratón tratados en función del tiempo después de la administración.

30 **[0179]** Además, se observa una distribución generalizada en todo el hígado con una fuerte detección de la proteína ASS1 humana tanto en las células sinusoidales como en las células diana de hepatocitos. Las Figuras 7A-7B representan una representación de bajo aumento de la tinción de IHC positiva para la proteína ASS1 humana 24 horas después de la administración.

35 **[0180]** La administración de ARNm de ASS1 humano y la producción de proteína posterior no se limita a un único sistema de nanopartículas lipídicas. Se exploraron varios sistemas de nanopartículas catiónicas basadas en lípidos para determinar su capacidad para administrar ARNm y producir la proteína deseada. Se investigó un cribado de 10 sistemas lipídicos catiónicos diferentes utilizando ARNm ASS1 humano como el analito de elección. El componente lipídico catiónico para cada formulación se enumera en la Tabla 2, así como se muestra en la Figura 8. Se administraron inyecciones únicas por vía intravenosa y se tomaron muestras de hígado 24 horas después de la administración.

40 **[0181]** Las dosis de formulaciones fueron todas de 1,0 mg/kg basadas en ARNm encapsulado. Los valores se basan en muestras de hígado 24 horas después de la administración.

Tabla 2

50

Componente de lípidos catiónico/ionizable	Dosis (mg/kg)	Proteína Humana ASS1 (proteína total ng/mg)
cKK-E12 (1)	1,0	2.028
cKK-E12 (2)	1,0	911
ICE	1,0	663
C12-200	1,0	385
HGT4003	1,0	100

55

60 Los valores sin procesar de la proteína ASS1 humana para varios sistemas de nanopartículas catiónicas basadas en lípidos se miden mediante un análisis ELISA (como se muestra en la Figura 9). Todas las dosis se administraron por vía intravenosa a 1,0 mg/kg. Los valores de proteína se representan como nanogramos de proteína ASS1 humana por miligramo de proteína hepática total. cKK-E12 (1) tiene un porcentaje menor de lípidos PEG que cKK-E12 (2) (3% frente a 5% de lípidos PEG).

65 **[0182]** Mientras que la producción de proteína a través de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm se puede

detectar, se determinó además si la proteína resultante está activa y puede funcionar correctamente. Con este fin, se realizaron estudios de actividad *In Vitro* que midieron la incorporación de arginina <sup>14</sup>C en proteínas celulares a través de la suplementación con citrulina <sup>14</sup>C. La citrulina radiactiva se convirtió en argininosuccinato <sup>14</sup>C, y posteriormente en arginina <sup>14</sup>C, en presencia de la proteína ASS1 activa. Al comparar las células transfectadas con ARNm ASS1 humano frente a las células no tratadas, podríamos evaluar la actividad de la proteína ASS1 derivada de ARNm exógena respectiva. La Figura 9 representa los recuentos radiactivos por minuto de la incorporación de arginina <sup>14</sup>C en proteínas celulares. La transfección de las células SK (-) (línea celular knockout de la proteína ASS1) con el ARNm ASS1 humano expuesto a medios agotados (sin arginina o leucina) produjo un aumento en la radioactividad observada en comparación con las células SK no tratadas (-). La actividad medida en estas células transfectadas fue comparable a una línea celular ASS1 positiva transfectada de manera estable (SK (+)).

#### **Ejemplo 4. Niveles de proteína ASS1 humana después del tratamiento con nanopartículas lipídicas ASS1 cargadas con ARNm**

**[0183]** Este ejemplo demuestra que la administración de ARNm ASS1 da como resultado la producción exitosa de proteína ASS1 en el hígado.

**[0184]** A los ratones CD-1 machos se les administró una dosis única de 1,0 mg/kg de nanopartículas lipídicas (Nanopartículas lipídicas basadas en cKK-E12 cargadas con ARNm ASS1) por vía intravenosa o sin tratar (es decir, control), como se describió anteriormente en el Ejemplo 2. Los ratones se sacrificaron y los órganos se recogieron 24 horas después de la administración. Los niveles de proteína de sintetasa de argininosuccinato humana (ASS1) en el hígado se midieron mediante ELISA. Estos datos demuestran que se detectaron niveles elevados de proteína ASS1 en relación con el control y que la proteína producida resultó del ARNm ASS1 administrado por vía intravenosa (Figura 10).

#### **Ejemplo 5: Niveles de amoníaco en plasma después del tratamiento con nanopartículas lipídicas ASS1 cargadas con ARNm**

**[0185]** Este ejemplo demuestra que la administración de ARNm ASS1 da como resultado una reducción exitosa de los niveles de amoníaco en plasma.

**[0186]** A los ratones knock-out ASS1 se les administró 1,0 mg/kg de nanopartículas lipídicas de ARNm ASS1 (Nanopartículas lipídicas basadas en cKK-E12 cargadas con ARNm ASS1) o nanopartículas lipídicas vacías una vez cada 14 días durante 30 días como se describe anteriormente en el Ejemplo 2. Ratones a los que se administraron nanopartículas lipídicas vacías sirvieron como control del vehículo. Los controles adicionales incluyeron ratones de tipo salvaje no tratados y ratones knockout ASS1 no tratados. Antes de cada dosis los días 1, 15 y 29, se recogieron muestras de plasma (es decir, antes de la dosis). Las muestras de plasma también se recolectaron dentro de las 24 horas siguientes a cada dosis los días 2, 16 y 30. Las muestras de plasma adicionales se recolectaron los días 8 y 22. Los niveles de amoníaco en plasma se cuantificaron en todas las muestras y demostraron que los niveles de amoníaco en plasma se redujeron de manera reproducible al menos 24 horas después del tratamiento a niveles cercanos a los observados en ratones de tipo salvaje.

#### **EQUIVALENTES**

**[0187]** Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando solo la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a la descripción anterior, sino que se establece en las siguientes reivindicaciones:

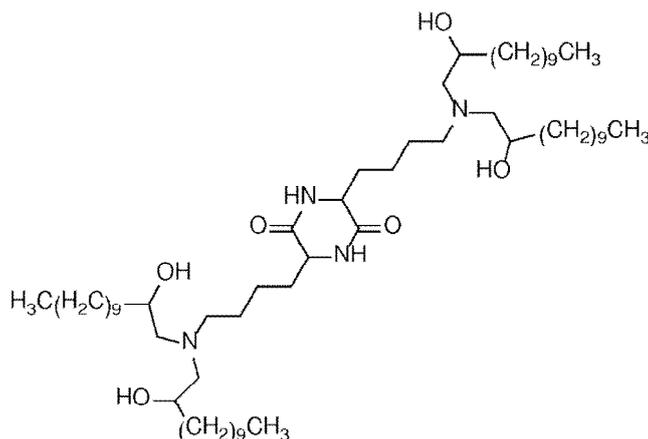
## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un ARNm que codifica sintetasa de argininosuccinato (ASS1) para uso en el tratamiento de la deficiencia de sintetasa de argininosuccinato (ASD), en donde el tratamiento comprende administrar a un sujeto que necesita tratamiento la composición a una dosis efectiva y un intervalo de administración tal que al menos un síntoma o característica de ASD se reduce en intensidad, severidad o frecuencia o se retrasa en el inicio, en donde:

el ARNm tiene una secuencia de nucleótidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15; y el ARNm es codón optimizado.

2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ARNm está encapsulado dentro de un liposoma, opcionalmente en el que el liposoma comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, uno o más lípidos basados en colesterol y uno o más PEG lípidos modificados, opcionalmente en los que:

(i) uno o más lípidos catiónicos comprenden un lípido catiónico seleccionado del grupo que consiste en C12-200, MC3, DLinDMA, DLinKC2DMA, cKK-E12, ICE (a base de imidazol), HGT5000, HGT5001, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOGS, DODAP, DODMA y DMDMA, DODAC, DLinDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, HGT400, y combinaciones de los mismos, opcionalmente en donde uno o más lípidos catiónicos comprenden cKK-E12:



y/o

(ii) uno o más lípidos no catiónicos se seleccionan de DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPC (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfotidicolina) DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo(1'-rac-glicerol)); y/o

(iii) uno o más lípidos a base de colesterol son colesterol y/o colesterol PEGilado; y/o

(iv) uno o más lípidos modificados con PEG comprenden una cadena de poli(etilén)glicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>.

3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el lípido catiónico constituye aproximadamente el 30-50% en peso del liposoma, opcionalmente en la que el lípido catiónico constituye aproximadamente el 40% en peso del liposoma; y/o en donde la relación de lípido catiónico: lípido no catiónico: colesterol: lípido PEGilado es aproximadamente (i) 40:30:20:10 en relación molar, (ii) 40:30:25:5 en peso, o (iii) 40:32:25:3 en peso.

4. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en la que el liposoma comprende una combinación seleccionada de:

cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K;  
C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K;  
HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; o  
ICE, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; y/o

en donde el liposoma tiene un tamaño inferior a aproximadamente 100 nm.

5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el ARNm se administra:

- 5 (a) a la dosis efectiva que varía de 0,1 a 5,0 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, de 0,1 a 3,0 mg/kg de peso corporal o de 0,1 a 1,0 mg/kg de peso corporal; y  
 (b) una vez a la semana, dos veces a la semana, dos veces al mes, una vez al mes o una vez cada 14 días

10 6. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición se administra por vía intravenosa.

7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proteína ASS1 se expresa en el hígado, y/o en la que la administración de la composición da como resultado:

- 15 (i) la expresión de un nivel de proteína ASS1 igual o superior a aproximadamente 100 ng/mg de proteína total en el hígado; y/o  
 (ii) aumento del nivel de proteína ASS1 en suero; y/o  
 (iii) reducción del nivel de citrulina en el sujeto en comparación con el nivel de referencia de citrulina antes del tratamiento; y/o  
 20 (iv) reducción del nivel de amoníaco en el sujeto en comparación con el nivel de referencia de amoníaco antes del tratamiento; y/o  
 (v) reducción de los niveles de amoníaco a aproximadamente 50 µmol/L o menos, aproximadamente 300 µmol/L o menos, o aproximadamente 1.500 µmol/L o menos, en el plasma.

25 8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que:

- (i) el ARNm optimizado por codón comprende la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14 o la SEQ ID NO: 15, en donde opcionalmente el ARNm comprende además (a) la secuencia UTR 5' de la SEQ ID NO: 4 o (b) la secuencia 3' UTR de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6; y/o  
 30 (ii) el ARNm comprende la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 8; y/o  
 (iii) el ARNm comprende uno o más nucleótidos modificados, en donde opcionalmente uno o más nucleótidos modificados comprenden pseudouridina, N-1-metilo-pseudouridina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metilo adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinilo-citidina, C-5 propinilo-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinilo-uridina, C5-propinilo-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y/o 2-tiocitidina.

9. Una composición que comprende un ARNm que codifica sintetasa de argininosuccinato (ASS1) en una cantidad de dosis efectiva encapsulada dentro de un liposoma, en la que:

- 40 el ARNm comprende (a) SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15 o (b) SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; y  
 el liposoma comprende lípidos catiónicos o no catiónicos, lípidos a base de colesterol y lípidos modificados con PEG.

45

50

55

60

65

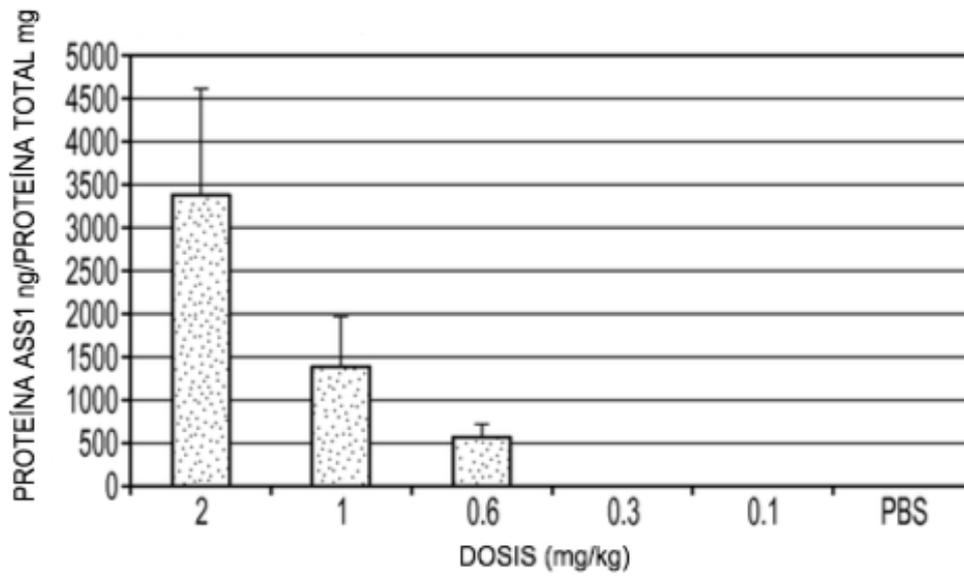


FIG. 1

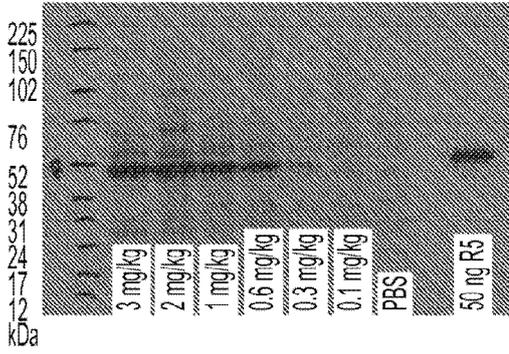


FIG. 2A

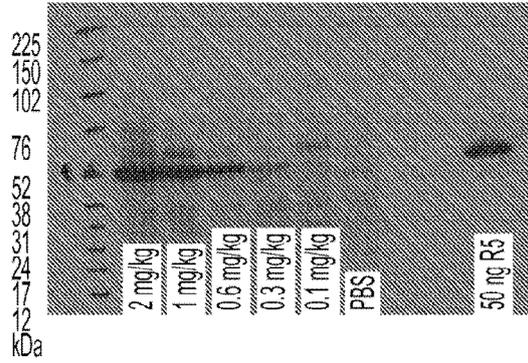


FIG. 2B

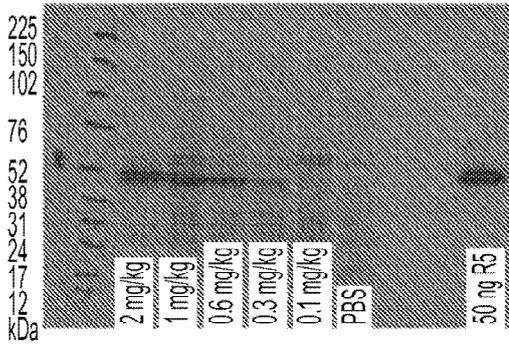


FIG. 2C

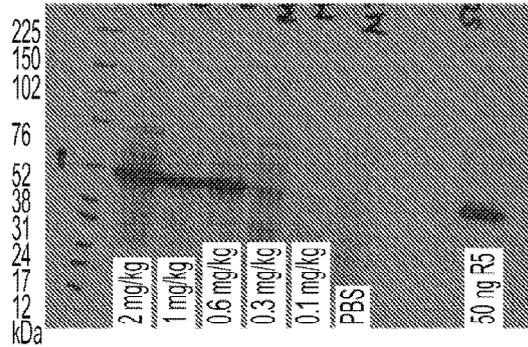


FIG. 2D

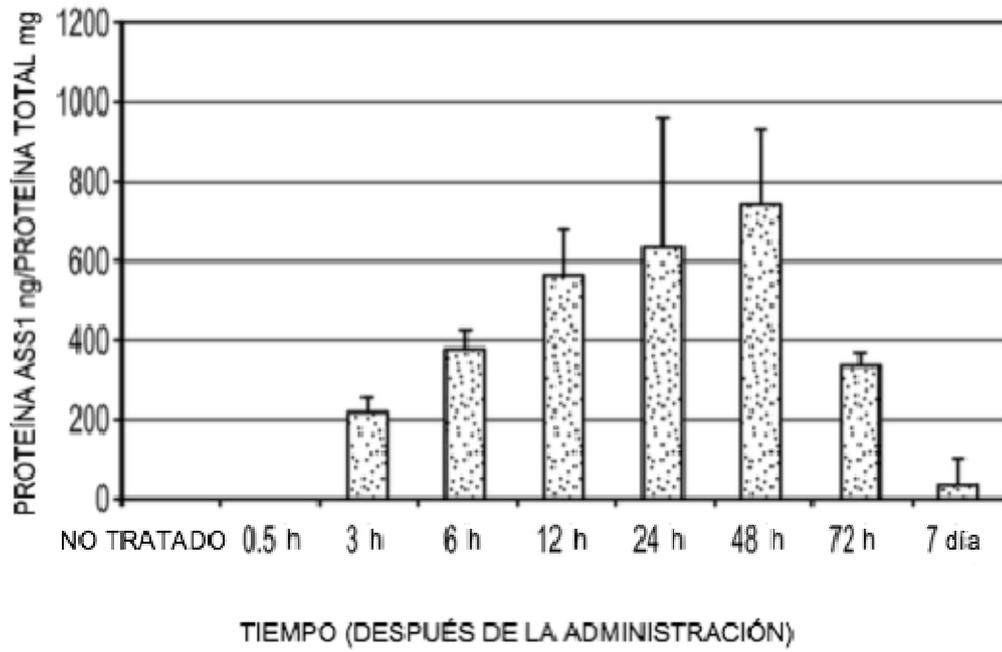


FIG. 3

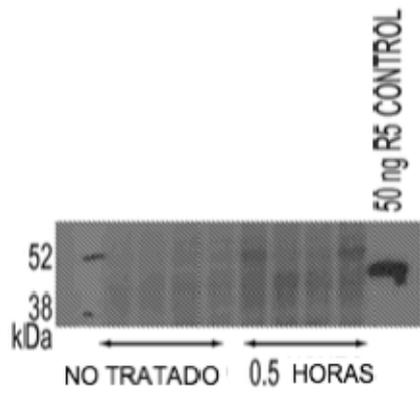


FIG. 4A

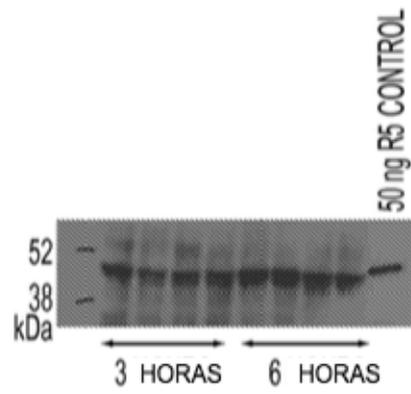


FIG. 4B

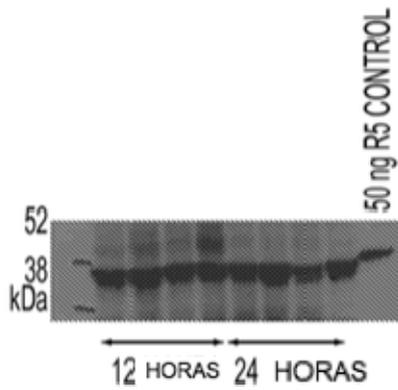


FIG. 4C

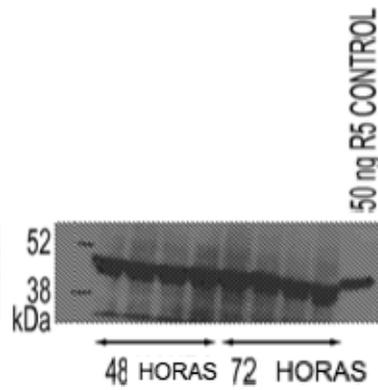


FIG. 4D

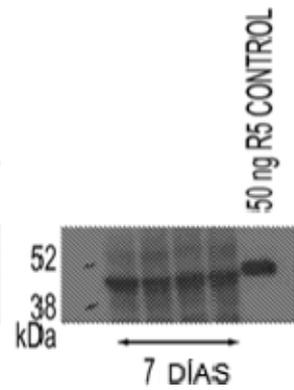


FIG. 4E

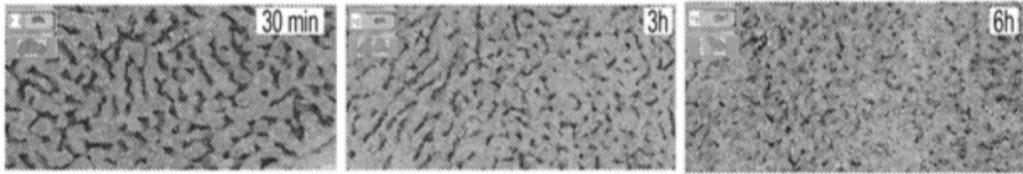


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

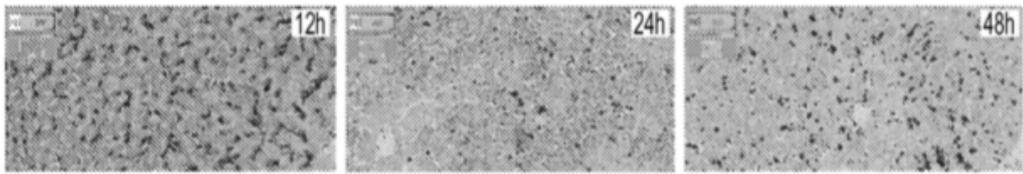


FIG. 5D

FIG. 5E

FIG. 5F

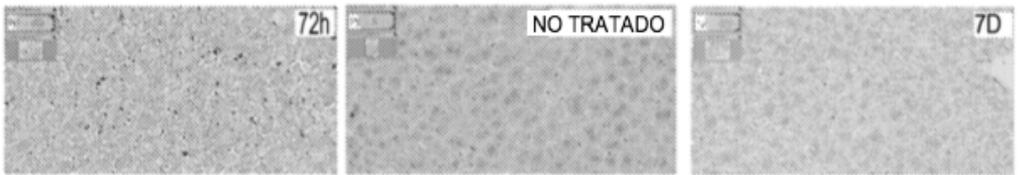


FIG. 5G

FIG. 5H

FIG. 5I

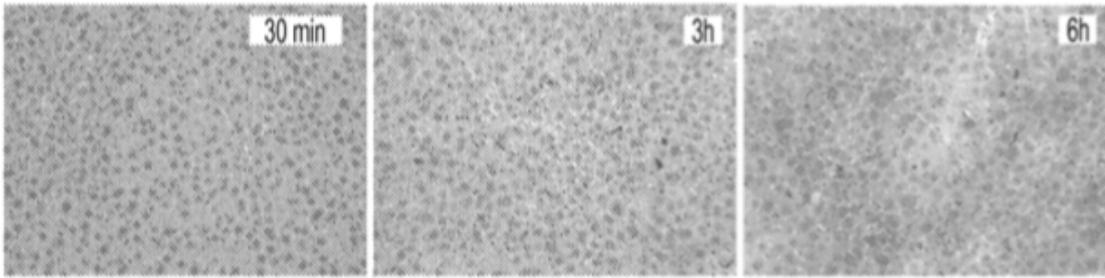


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C

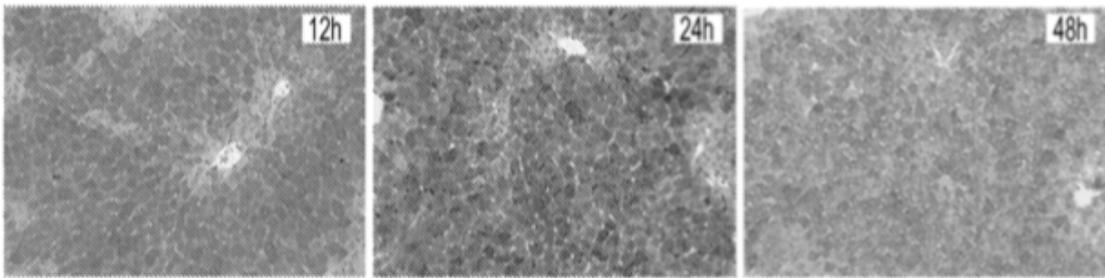


FIG. 6D

FIG. 6E

FIG. 6F

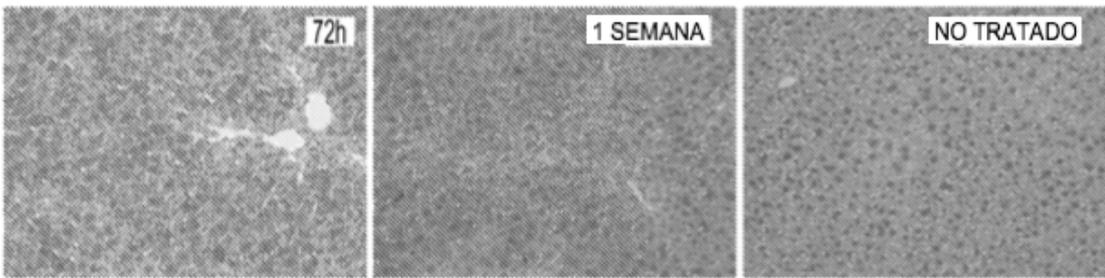


FIG. 6G

FIG. 6H

FIG. 6I

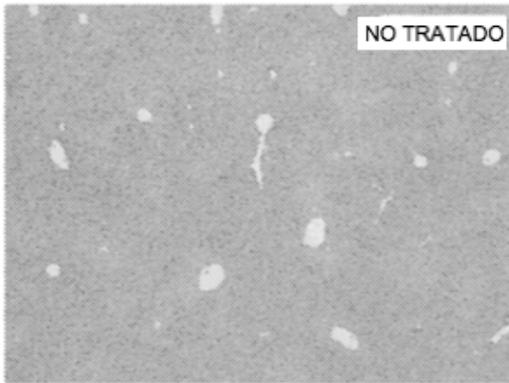


FIG. 7A

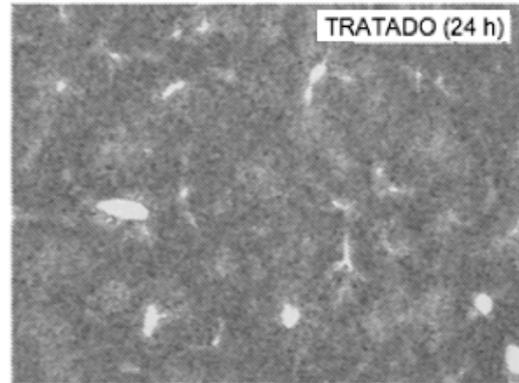


FIG. 7B

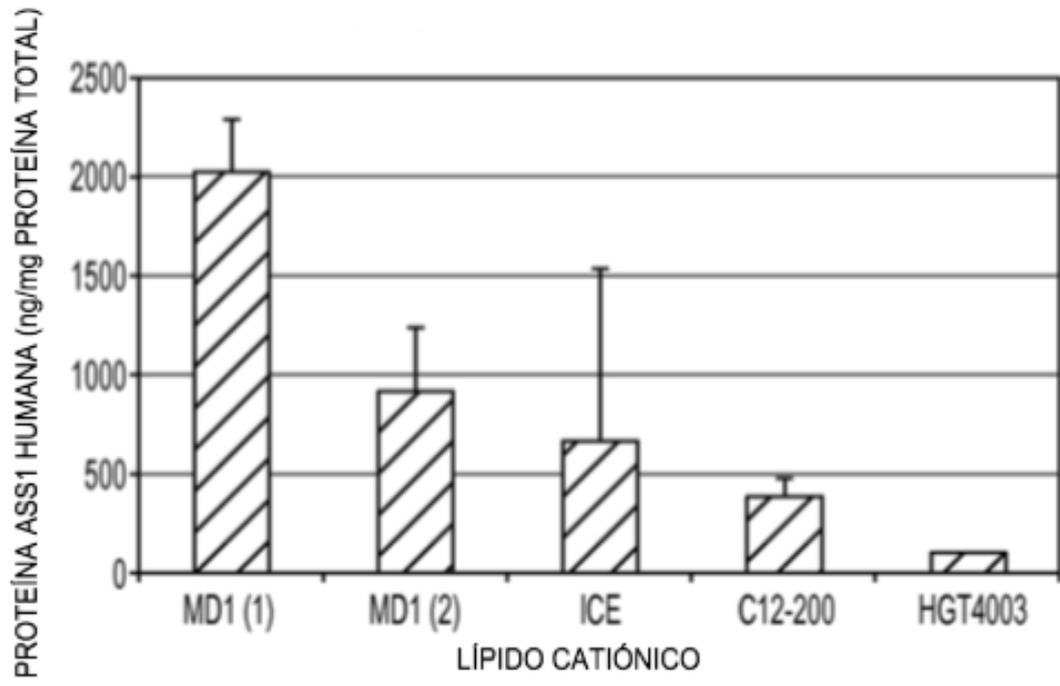


FIG. 8

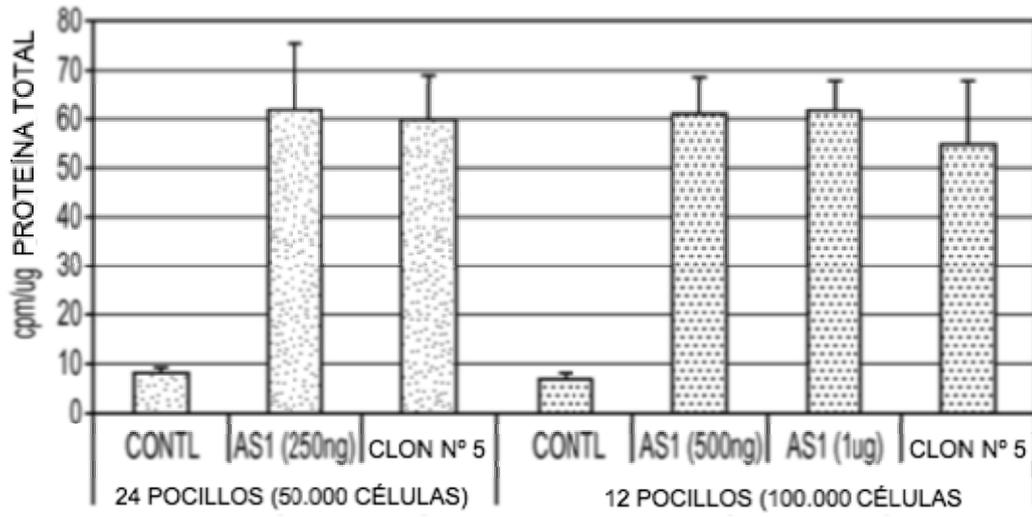


FIG. 9

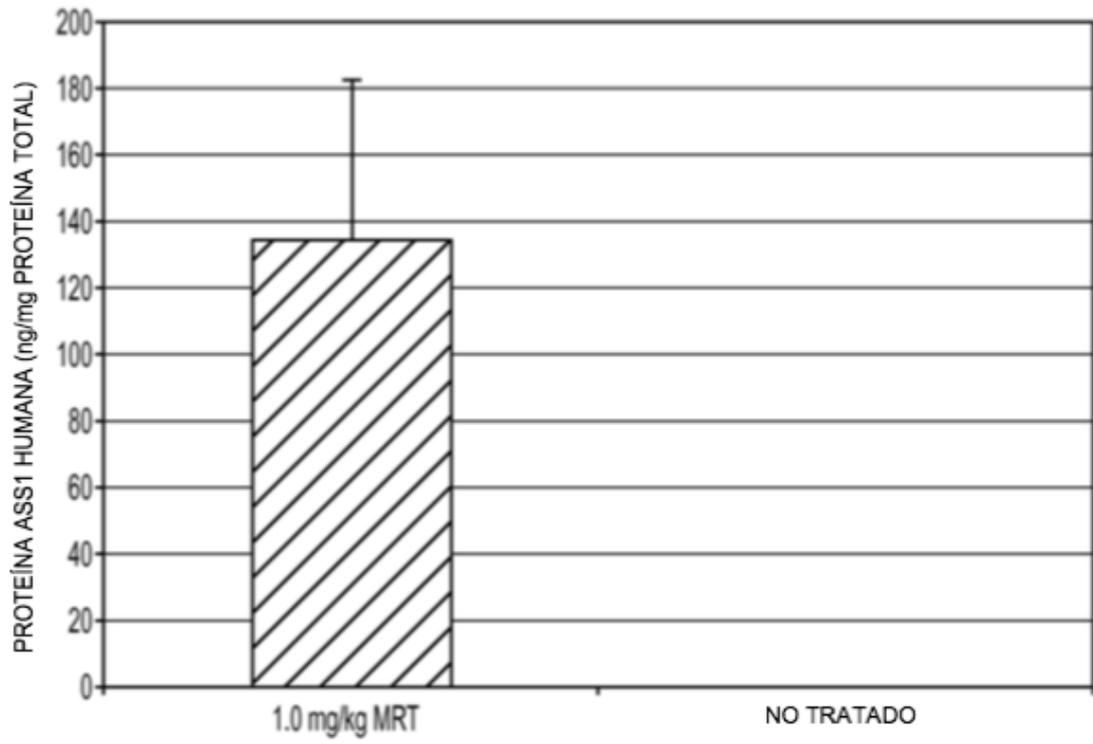


FIG. 10

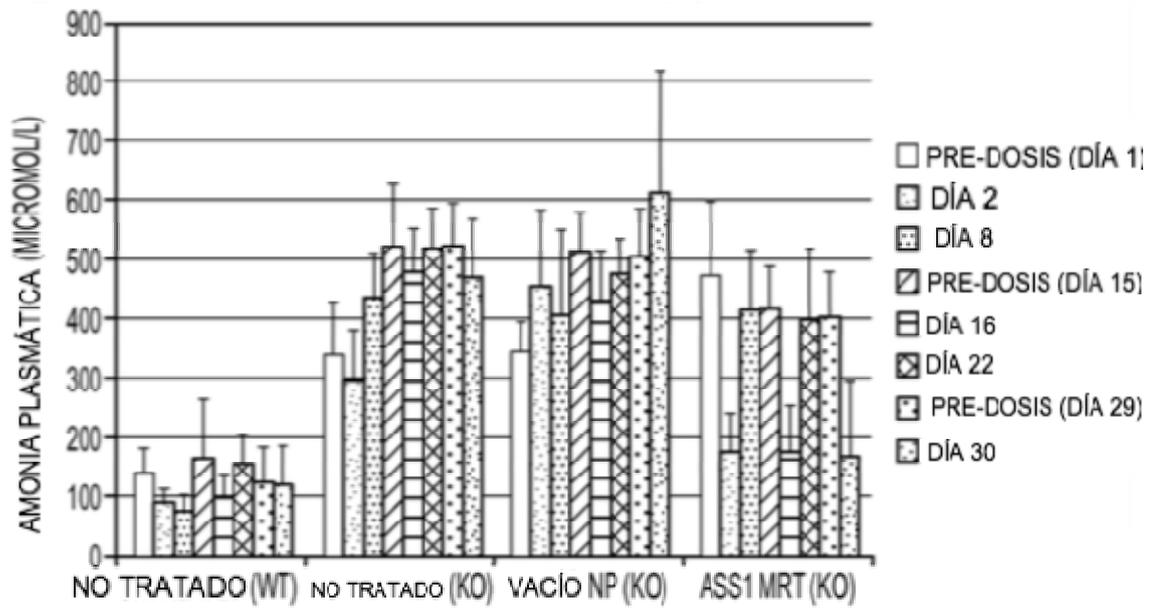


FIG. 11