

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 552**

51 Int. Cl.:

C12N 15/02 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2015 E 18201321 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3450553**

54 Título: **Terapia de ARNm para el tratamiento de enfermedades oculares**

30 Prioridad:

24.03.2014 US 201461969483 P

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

21.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CALIAS, PERICLES;
DEROSA, FRANK y
HEARTLEIN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 774 552 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 el tratamiento de enfermedades oculares

5 ANTECEDENTES

Todavía se necesitan terapias efectivas para el tratamiento de enfermedades oculares, trastornos o afecciones tales como las que resultan directa o indirectamente de la pérdida, expresión aberrante, desregulación o sobreproducción de una proteína celular ocular. Existen varios obstáculos en la implementación de una estrategia de tratamiento eficaz para enfermedades y trastornos oculares, principalmente debido a la anatomía y fisiología únicas del ojo. La combinación de barreras estáticas, como las diferentes capas y regiones del ojo, y las barreras dinámicas, como el flujo sanguíneo, el aclaramiento linfático y la dilución de lágrimas, representan un desafío importante para la administración de fármacos.

El documento WO 2013/149140 A1 sugiere la administración intravítrea, pero no en el contexto del tratamiento de enfermedades oculares. El documento US 2013/266640 A1 sugiere la administración intravítrea de ARNm que codifica un gen informador; El ejemplo proporcionado es completamente profético. El documento WO 2006/110813 A2 describe el uso de ARNip para uso en el tratamiento de enfermedades oculares.

Los ejemplos 43D y 84 del documento WO 2013/151671 A1 hacen referencia a la administración intravítrea de ARNm. El ejemplo 84 describe la administración intravítrea de ARNm de mCherry y luciferasa formulados con solución salina y describe que se observó una expresión positiva del ARNm de mCherry formulado con solución salina mediante microscopía de fluorescencia. El ejemplo 43D sugiere la administración intravítrea de ARNm de mCherry lipoplexado con RNAIMAX™ sin proporcionar ningún dato experimental.

25 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente descripción proporciona, entre otras cosas, métodos y composiciones eficaces para el tratamiento de enfermedades oculares, trastornos o afecciones basadas en la terapia de ARN mensajero (ARNm). La invención reivindicada se basa, en parte, en la observación inesperada de que el ARNm puede administrarse de manera efectiva al ojo a pesar de las barreras estáticas y dinámicas únicamente desafiantes debido a la anatomía y fisiología del ojo únicamente complicadas. Como se describe en el presente documento, incluido en los ejemplos, los presentes inventores han administrado con éxito un ARNm que codifica luciferasa de mosca de fuego (FFL) o argininosuccinato sintetasa humana (una proteína expresada naturalmente en los ojos), lo que da como resultado una expresión robusta de la proteína en todo el ojo. Por lo tanto, los presentes inventores han demostrado, por primera vez, que el suministro basado en ARNm se puede usar para administrar eficazmente proteínas terapéuticas en el ojo, proporcionando una solución efectiva pero inesperada para este problema difícil y de larga data del suministro de fármacos oculares.

Por lo tanto, la invención se refiere a una composición que comprende un ARNm que codifica una proteína terapéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección ocular en un sujeto que lo necesite, en donde la composición se administra en un ojo del sujeto mediante administración intravítrea, de modo que la administración de la composición dé como resultado la expresión y/o la actividad de la proteína terapéutica codificada por el ARNm en el ojo, en donde el ARNm está optimizado en codones, tiene una longitud de 0,5 kb a 5 kb y se encapsula dentro de un liposoma, en el que el liposoma comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, uno o más lípidos a base de colesterol y uno o más lípidos modificados con PEG. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica codificada por el ARNm normalmente funciona en el ojo, por ejemplo, se expresa naturalmente en los ojos de sujetos sanos. En otras realizaciones, la proteína terapéutica codificada por el ARNm es un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-TNF α , anticuerpo anti-IL-6, anticuerpo anti-ICAM-1 o anticuerpo anti-VCAM-1) o un receptor soluble (por ejemplo, receptor de VEGF soluble).

La administración intravítrea se usa cuando se desea que la expresión del ARNm esté restringida al ojo, por ejemplo, cuando el ARNm codifica una proteína que se expresa únicamente en el ojo o donde el ARNm codifica una proteína terapéutica cuya actividad está particularmente restringida al ojo (por ejemplo, cuando la proteína codifica un antagonista de VEGF, como un anticuerpo anti-VEGF o un receptor de VEGF soluble). En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína se detecta en células de la córnea, células esclerales, células epiteliales del plexo coroideo, células del cuerpo ciliar, células de la retina y/o humor vítreo. En algunas realizaciones, la expresión y/o la actividad de la proteína se detecta mediante un muestreo de sangre. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína se detecta mediante el muestreo de un humor vítreo. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína se detecta en las células de la retina. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína es detectable aproximadamente 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más después de la administración. Por ejemplo, la expresión y/o la actividad de la proteína codificada por un ARNm puede detectarse durante al menos 24 horas después de la administración.

En algunas realizaciones, el ARNm en la composición de la invención tendrá una longitud de

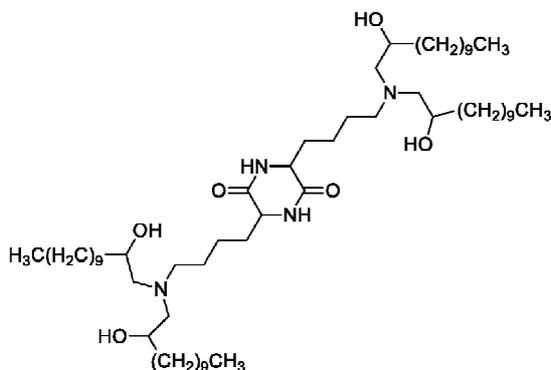
aproximadamente 1 kb a aproximadamente 3 kb. En algunas realizaciones, la proteína codificada por el ARNm normalmente funciona en el ojo. En algunas realizaciones, la proteína codificada por el ARNm es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo codificado por el ARNm es un anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-TNF α , anticuerpo anti-IL-6, anticuerpo anti-ICAM-1, anti-VCAM-1, o un receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR1).

En algunas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección ocular se selecciona de AMD, PU, BRVO, CRVO, DME, CME, UME, retinitis por CMV, endoftalmítis, inflamación, glaucoma, degeneración macular, esclerítis, coriotetinitis, síndrome del ojo seco, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Norris, enfermedad de Coat, vítreo primario hiperplásico persistente, vitreorretinopatía exudativa familiar, amaurosis congénita de Leber, retinitis pigmentosa, retinosquisis ligada a X, neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) y uveítis.

En algunas realizaciones, la composición se administra una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, dos veces al mes, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, dos veces al año o una vez al año. En ciertas realizaciones, la composición se administra una vez a la semana. En ciertas realizaciones, la composición se administra dos veces al mes. En ciertas realizaciones, la composición se administra una vez al mes. En algunas realizaciones, la composición se administra cada dos meses.

En algunas realizaciones, el 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, DMDMA, DODAC, DLinDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, HGT4003. Las composiciones de liposomas útiles incluyen aquellas que comprenden o consisten en las siguientes combinaciones de lípidos: (i) cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; (ii) C₁₂-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K. Como se ejemplifica a continuación, las nanopartículas lipídicas que contienen cKK-E12 o C₁₂-200 como componente catiónico son particularmente útiles para lograr una alta expresión de ARNm encapsulado en el ojo.

En algunas realizaciones, un lípido catiónico adecuado para la presente invención tiene una estructura de:



En algunas realizaciones, los lípidos no catiónicos adecuados 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-fosfotidilcolina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) y DOPG (2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)).

En algunas realizaciones, un lípido a base de colesterol adecuado es colesterol o colesterol PEGilado.

En algunas realizaciones, uno o más lípidos modificados con PEG adecuados para la presente invención es una cadena de glicol poli(etileno) de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud C₆-C₂₀.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico constituye aproximadamente el 30-70% (por ejemplo, aproximadamente el 30-60%, aproximadamente el 30-50%, aproximadamente el 30-40%, aproximadamente el 40-70%, aproximadamente el 40-60%, aproximadamente 40-50%, aproximadamente 50-70%, o aproximadamente 50-60%) del liposoma por relación molar.

En algunas realizaciones, el liposoma comprende cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K. En algunas realizaciones, el liposoma comprende cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K en una proporción de 40:30:25:25,

50:25:20:5, 40:30:20:10, o 40:32:20:8. En algunas realizaciones, el liposoma comprende cKK-E12, DSPC, colesterol y DMG-PEG2K. En algunas realizaciones, el liposoma comprende cKK-E12, DSPC, colesterol y DMG-PEG2K en una proporción de 40:30:25:25, 50:25:20:5, 50:27:20:3, 40:30 :20:10, 40:32:20:8, 40:32:25:3 o 40:33:25:2. En algunas realizaciones, el liposoma comprende C₁₂-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K. En algunas realizaciones, el liposoma comprende C₁₂-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K en una proporción de 50:25:20:5, 50:20:25:5, 50:27:20:3, 40:30 :20:10, 40:30:25:5 o 40:32:20:8, 40:32:25:3 o 40:33:25:2.

En algunas realizaciones, el liposoma tiene un tamaño de o menos de aproximadamente 60 nm (por ejemplo, de o menos de aproximadamente 55 nm, de o menos de aproximadamente 50 nm, de o menos de aproximadamente 45 nm, de o menos de aproximadamente 40 nm, de o menos de aproximadamente 35 nm, de o menos de aproximadamente 30 nm, o de o menos de aproximadamente 25 nm). Los liposomas adecuados pueden estar en el intervalo de 25 nm a 60 nm, por ejemplo, 30 nm a 50 nm.

[08] 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-metilcididina, 2-aminoadenosina, 7-deaadenainainaina 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y/o 2-tiocitidina. En algunas realizaciones, el ARNm no está modificado.

Otras características, objetos y ventajas de la presente invención son evidentes en la descripción detallada y en los dibujos que siguen. Debe entenderse que la descripción detallada y los dibujos se dan solo a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada serán evidentes para los expertos en la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

Los dibujos tienen fines ilustrativos y no limitativos.

La Figura 1 muestra una visualización ejemplar de la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga según se midió a través de imágenes IVIS. La proteína detectada es el resultado de su producción a partir de ARNm de FFL administrado por vía intravítrea utilizando nanopartículas lipídicas basadas en cKK-E12 (5,0 microgramos, basados en ARNm encapsulado).

La Figura 2 representa una visualización ejemplar de la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga en ratones de tipo salvaje, medida a través de imágenes de IVIS. La proteína detectada es el resultado de su producción a partir de ARNm de FFL administrado por vía intravítrea utilizando nanopartículas lipídicas basadas en C₁₂-200 (5,0 microgramos, basados en ARNm encapsulado).

La Figura 3 representa una visualización ejemplar de la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga en ratones de tipo salvaje, medida a través de imágenes de IVIS. La proteína detectada es el resultado de su producción a partir de ARNm de FFL administrado por vía intravítrea utilizando nanopartículas lipídicas basadas en PEI ramificadas de 25 kDa (2,5 microgramos, basados en ARNm encapsulado).

La Figura 4 representa una visualización ejemplar de la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga en ratones de tipo salvaje, medida a través de imágenes de IVIS. En esta figura está representada una inyección salina de control que demuestra que no hay luminiscencia de fondo.

La Figura 5 muestra un gráfico ejemplar de los niveles de proteína de sintetasa argininosuccinato humana (ASS1) medidos a través de ELISA. La proteína detectada es el resultado de su producción a partir de ARNm ASS1 encapsulado en nanopartículas lipídicas basadas en cKK-E12, que se administró por administración intravítrea a ratones de tipo salvaje. Los globos oculares de los ratones tratados se recogieron 24 horas después de la administración.

La Figura 6 muestra un gráfico ejemplar de los niveles de proteína de sintetasa argininosuccinato humana (ASS1) medidos a través de ELISA. La proteína detectada es el resultado de su producción a partir de ARNm ASS1 encapsulado en nanopartículas lipídicas que se administró por administración intravítrea a ratas Sprague-Dawley. Los globos oculares de ratas tratadas se recogieron 24 horas después de la administración. Las formulaciones 1 y 2 representan formulaciones de nanopartículas lipídicas basadas en cKK-E12 que utilizan DMG-PEG2K al 5% y 3%, respectivamente.

DEFINICIONES

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.

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 ("C₁₋₁₅ alquilo"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene 1 a 3 átomos de carbono ("C₁₋₃ alquilo"). Los ejemplos de grupos C₁₋₃ alquilo incluyen metilo (C₁), etilo (C₂), *n*-propilo (C₃) e isopropilo (C₃). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene 8 a 12 átomos de carbono ("C₈₋₁₂ alquilo"). Los ejemplos de grupos C₈₋₁₂ alquilo incluyen, sin limitación, *n*-octilo (C₈), *n*-nonilo (C₉), *n*-decilo (C₁₀), *n*-undecilo (C₁₁), *n*-dodecilo (C₁₂) y similares. El prefijo "*n*-" (normal) se refiere a grupos alquilo no ramificados. Por ejemplo, *n*-C₈ alquilo se refiere a -(CH₂)₇CH₃, *n*-C₁₀ alquilo se refiere a -(CH₂)₉CH₃, etc.

Mejora: como se usa en este documento, el término "mejora" significa la prevención, reducción o paliación de un estado, o mejora del estado de un sujeto. La mejora incluye, pero no requiere la recuperación completa o la prevención completa de una enfermedad. En algunas realizaciones, la mejora incluye niveles crecientes de proteína relevante o su actividad que es deficiente en tejidos de enfermedad relevantes.

Aminoácido: como se usa en este 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 H₂N-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.

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.

Aproximadamente o alrededor de: como se usa en este 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 indicado declarado de referencia a menos que se indique lo contrario o sea evidente en el contexto (excepto cuando dicho número supere el 100% de un valor posible).

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. En realizaciones particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una porción de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se denomina típicamente una porción "biológicamente activa".

Administración: Tal 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").

Expresión: como se usa en el presente documento, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a uno o más de los siguientes eventos: (1) producción de una plantilla de ARN a partir de una secuencia de

ADN (por ejemplo, mediante transcripción); (2) procesamiento de una transcripción de ARN (por ejemplo, mediante empalme, edición, formación de tapa 5' y/o formación de extremo 3'); (3) la traducción de un ARN en un polipéptido o proteína; y/o (4) modificación postraduccional de un polipéptido o proteína. En esta aplicación, los términos "expresión" y "producción", y su equivalente gramatical, se usan de manera intercambiable.

Fragmento: el término "fragmento", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos y se define como cualquier porción discreta de un polipéptido dado que es único o característico de ese polipéptido. El término como se usa en el presente documento también se refiere a cualquier porción discreta de un polipéptido dado que retiene al menos una fracción de la actividad del polipéptido de longitud completa. Preferiblemente, la fracción de actividad retenida es al menos el 10% de la actividad del polipéptido de longitud completa. Más preferiblemente, la fracción de actividad retenida es al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la actividad del polipéptido de longitud completa. Más preferiblemente aún, la fracción de actividad retenida es al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la actividad del polipéptido de longitud completa. Más preferiblemente, la fracción de actividad retenida es el 100% de la actividad del polipéptido de longitud completa. El término como se usa en el presente documento también se refiere a cualquier porción de un polipéptido dado que incluye al menos un elemento de secuencia establecido encontrado en el polipéptido de longitud completa. Preferiblemente, el elemento de secuencia abarca al menos 4-5, más preferiblemente al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos del polipéptido de longitud completa.

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.

Vida media: como se usa en este 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.

Mejorar, aumentar o reducir: como se usa en este documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir" o equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición de línea de base, como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en este documento, o una medición en un sujeto 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.

In Vitro: Como se usa en el presente documento, el término "*In Vitro*" se refiere a eventos que ocurren en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en un cultivo celular, etc., en lugar de en un dispositivo multicelular. organismo.

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*).

Aislado: como se usa en el presente 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) producidos, preparados y/o fabricados 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.).

ARN mensajero (ARNm): como se usa en el presente 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-metil 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 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-fosforamidita).

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 está 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.

Paciente: como se usa en el presente documento, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier organismo al que se puede administrar una composición proporcionada, 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.

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, alergia, respuesta u otro problema o complicación, proporcional a una relación razonable entre beneficio y riesgo.

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 descritos en el presente documento incluyen las 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, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, sulfonato, 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 alcalinotérreos 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 electrófilo apropiado, por ejemplo, un haluro de alquilo, para formar una sal de amino alquilada cuaternizada.

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.

Sustancialmente: 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.

Cantidad terapéuticamente efectiva: como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" 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.

Tratamiento: como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "tratado") se refiere a cualquier administración de una sustancia (por ejemplo, composiciones proporcionadas) que alivie, mejore, reviva, inhiba, retrase parcial o completamente el inicio, reduce la gravedad y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características y/o causas de una enfermedad, trastorno y/o condición en particular (por ejemplo, influenza). Dicho tratamiento puede ser de un sujeto que no muestre signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevantes y/o de un sujeto que muestre solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección. Alternativa o adicionalmente, tal tratamiento puede ser de un sujeto que exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevantes. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto al que se le haya diagnosticado una enfermedad, trastorno o afección relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto conocido por tener uno o más factores de susceptibilidad que están correlacionados estadísticamente con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección relevantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción proporciona, entre otras cosas, métodos y composiciones para tratar enfermedades oculares, trastornos o afecciones basadas en la terapia de ARNm. En particular, la presente divulgación proporciona métodos para tratar enfermedades, trastornos o afecciones oculares administrando a un sujeto que necesita tratamiento una composición que comprende un ARNm, de modo que la administración de la composición da como resultado la expresión de la proteína codificada por el ARNm en el ojo. La invención se refiere específicamente a una composición que comprende un ARNm que codifica una proteína terapéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección ocular en un sujeto que lo necesite, en el que la composición se administra en un ojo del sujeto mediante administración intravítrea de tal manera que la administración de los resultados de la composición en la expresión y/o actividad de la proteína terapéutica codificada por el ARNm en el ojo, en donde el ARNm está optimizado por codones, tiene una longitud de 0,5 kb a 5 kb y está encapsulado dentro de un liposoma, en donde el liposoma comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, uno o más lípidos a base de colesterol y uno o más lípidos modificados con PEG.

Varios aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones. El uso de secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta descripción, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario.

Enfermedades, trastornos o afecciones oculares.

La composición de la invención se puede usar para tratar a un sujeto que padece o es susceptible de una enfermedad, trastorno o afección ocular. Como se usa en este documento, una "enfermedad ocular, trastorno o afección" se refiere a una enfermedad, trastorno o afección que afecta al ojo y/o la visión. Las enfermedades, trastornos o afecciones oculares pueden afectar una o más de las siguientes partes del ojo: párpado, sistema lagrimal y órbita; conjuntiva; esclerótica, córnea, iris y cuerpo ciliar; lente; coroides y retina; cuerpo vítreo y globo terráqueo; nervio óptico y vías visuales; y los músculos oculares. En algunas realizaciones, una enfermedad, trastorno o afección ocular puede ser causada por una deficiencia de proteínas o disfunciones en el ojo o partes de la anatomía asociada con la visión. En algunas realizaciones, una enfermedad, trastorno o afección ocular puede ser causada por un exceso de proteína, una sobreexpresión y/o una activación excesiva en el ojo o partes de la anatomía asociada con la visión.

Las enfermedades, trastornos o afecciones oculares ejemplares incluyen, pero no se limitan a, degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), uveítis pigmentaria (PU), oclusión de la vena retiniana (BRVO), oclusión de la vena retiniana central (CRVO), edema macular diabético (DME), edema macular cistoide (CME), edema macular uveítico (UME), retinitis por citomegalovirus (CMV), endoftalmitis, inflamación, glaucoma, degeneración macular, escleritis, corioiditis, y uveítis.

En diversas realizaciones, la composición de la invención se puede usar para administrar un ARNm que codifica una proteína que es deficiente en cualquiera de las enfermedades oculares, trastornos o afecciones descritas en el presente documento. En tales realizaciones, el suministro de ARNm normalmente da como resultado un aumento de la expresión de proteínas y/o actividad en el ojo suficiente para tratar la deficiencia de proteínas. En algunas realizaciones, un ARNm adecuado para la invención puede codificar una secuencia de proteínas de tipo natural o de origen natural. En algunas realizaciones, un ARNm adecuado para la invención puede ser una secuencia de tipo natural o natural. En algunas realizaciones, un ARNm adecuado para la invención puede codificar

una secuencia de aminoácidos que tiene una homología sustancial o identidad con la secuencia de la proteína de aminoácido de tipo natural o natural (por ejemplo, que tiene al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% de identidad de secuencia con la secuencia de tipo natural o de origen natural). En realizaciones particulares, la identidad de secuencia con la secuencia de tipo natural o natural estará en el intervalo de 85-98%, por ejemplo, 90-98% o 95-98%.

Las mutaciones en más de 40 genes dan como resultado Retinitis pigmentosa (RP). Por ejemplo, las mutaciones en el gen ABCA4 están asociadas con la enfermedad de Stargardt, un gen de la retinosquiasis está mutado en la retinosquiasis hereditaria, el gen RPE65 está mutado en la amaurosis congénita de Leber (LCA), las mutaciones del ADN mitocondrial en los genes ND1, ND4 o ND6 se encuentran en la neuropatía óptica hereditaria de Leber y el gen Myo7 están mutados en la enfermedad de Usher.

En algunas realizaciones, la presente invención se puede usar para administrar un ARNm que codifica un agente terapéutico que inhibe, regula a la baja, reduce la expresión y/o actividad de una proteína, cuyo nivel de exceso está asociado con una enfermedad ocular, trastorno o condición. Dicho agente terapéutico puede ser un péptido, un anticuerpo u otros polipéptidos o proteínas.

En algunas realizaciones, la presente invención se puede usar para suministrar un ARNm que codifica un anticuerpo, un receptor soluble u otra proteína de unión. Típicamente, un ARNm adecuado codifica un anticuerpo que inhibe, regula a la baja o reduce una proteína que está presente en exceso en cantidad y/o actividad en una enfermedad, trastorno o condición ocular. En algunas realizaciones, un ARNm adecuado codifica un anticuerpo que activa, regula o aumenta una actividad proteica que es deficiente en una enfermedad, trastorno o afección ocular. Los anticuerpos ejemplares adecuados codificados por los ARNm de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra VEGF, TNF α , ILO-6, ICAM-1, VCAM-1, o receptores solubles tales como receptores de VEGF (por ejemplo, VEGFR1).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca tanto el anticuerpo intacto como el fragmento de anticuerpo. Típicamente, un "anticuerpo" intacto es una inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno particular. Un anticuerpo puede ser un miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Típicamente, un anticuerpo intacto es un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos "cadena ligera variable" (VL) y "cadena pesada variable" (VH) se refieren a estas regiones correspondientes en la cadena ligera y pesada respectivamente. Cada región variable se puede subdividir en regiones hipervariables (HV) y de marco (FR). Las regiones hipervariables comprenden tres áreas de la secuencia de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR 1, CDR 2 y CDR 3), separadas por cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR2 y FR4) que forman una estructura de hoja beta y sirven como andamio para mantener las regiones HV en posición. El término C de cada cadena pesada y ligera define una región constante que consta de un dominio para la cadena ligera (CL) y tres para la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Una cadena ligera de inmunoglobulinas se puede diferenciar aún más en los isotipos kappa y lamda.

En algunas realizaciones, los términos "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completamente ensamblado" se usan en referencia a un anticuerpo que contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, opcionalmente asociadas por enlaces disulfuro como ocurre con los anticuerpos producidos naturalmente. En algunas realizaciones, un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es un fragmento de anticuerpo.

En algunas realizaciones, la presente invención se puede usar para administrar un "fragmento de anticuerpo". Como se usa en el presente documento, un "fragmento de anticuerpo" incluye una porción de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región variable o de unión a antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; triacuerpos; tetra-cuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos aislados, fragmentos "Fv", que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas recombinantes de cadena simple en las que las regiones variables de la cadena ligera y pesada están conectadas por un conector peptídico ("proteínas ScFv"), y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable. En muchas realizaciones, un fragmento de anticuerpo contiene una secuencia suficiente de anticuerpo parental del que es un fragmento que se une al mismo antígeno que el anticuerpo parental; en algunas realizaciones, un fragmento se une al antígeno con una afinidad comparable a la del anticuerpo parental y/o compete con el anticuerpo parental por la unión al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, fragmento scFv, fragmento Fv, diacuerpo dsFv, fragmento dAb, fragmento Fd', fragmento Fd y una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, mezclas de anticuerpos o cócteles, anticuerpos humanos o humanizados, anticuerpos quiméricos o anticuerpos biespecíficos.

Síntesis de ARNm

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* (IVT). En resumen, la IVT 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 ARN polimerasa apropiada (por ejemplo, ARN polimerasa T3, T7 o SP6), ADNasa I, pirofosfatasa y/o inhibidor de ARNasa. Las condiciones exactas variarán según la aplicación específica.

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.

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. La optimización con codón del ARNm se realiza para optimizar la expresión en células diana. Por ejemplo, si el ARNm es para ser administrado a un sujeto humano, el ARNm tendrá un codón optimizado para la expresión en células humanas.

ARNm modificado

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-isopentenil-adenina, 2-tio-citosina, 3-metilo-citosina, 4-acetilcitosina, 5-metilo-citosina, 2,6-diaminopurina, 1-metilo-guanina, 2-metilo-guanina, 2,2-dimetil-guanina, 7-metilguanina, inosina, 1-metilo-inosina, pseudouracilo (5-uracilo), dihidro-uracilo, 2-tio-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tio-uracilo, 5- (carboxihidroximetil)-uracilo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-carboximetilaminometil-uracilo, 5-metilo-2-tio-uracilo, 5-metilo -uracilo, metilo éster del ácido N-uracil-5-oxiacético, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxia minometil-2-tio-uracilo, 5'-metoxicarbonilmetil-uracilo, 5-metoxi-uracilo, uracil-5-ácido oxiacético éster metílico, uracil-5-oxiacético ácido (v), 1-metilo-pseudouracilo, queosina, beta-D-manosil-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.

En algunas realizaciones, los ARNm 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 incluyen típicamente, pero no se limitan a, modificaciones del grupo que consiste en metilfosfonatos, metilfosforamidatos, fosforamidatos, fosforotioatos (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.

En algunas realizaciones, los ARNm 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'-deoxiuridina 5'-trifosfato), 2'-deoxi-2'-deamina-oligorribonucleótido (2'-amino-2'-deoxicidina 5'-trifosfato, 2'-amino-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato), 2'-O-alkuiloligorribonucleótido, 2'-desoxi-2'-C-alkuiloligorribonucleótido (2'-O-metilcidina 5'-trifosfato, 2'-metiluridina 5'-trifosfato), 2'-C-alkuiloligorribonucleótido, y

sus isómeros (2'-aracitidina 5'-trifosfato, 2'-arauridina 5'-trifosfato), o azidotrifosfatos (2'-azido-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato, 2'-azido-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato).

5 En algunas realizaciones, los ARNm pueden contener modificaciones de las bases de los nucleótidos (modificaciones de bases). 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, 5'-trifosfato de ribósido de 2-amino-6-cloropurina, 5-aminoadenosina 5'-trifosfato, 2-tiocitidina 5'-trifosfato, 2-tiouridina 5'-trifosfato, 4-tiouridina 5'-trifosfato, 5-aminoallicitidina 5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina 5'-trifosfato, 5-bromocitidina 5'-trifosfato, 5-bromouridina 5'-trifosfato, 5-yodocitina, 5'-trifosfato, 5-yodocitina, 5'-trifosidina, 5-yodocitina, 5-yodocitina 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-deazaanosina 5'-trifosfato, 8-azaadenosina 5'-trifosfato, 8-azaadenosina 5'-trifosfato, 8-azidoadenosina 5'-trifosfato, benzimidazol ribósido 5'-trifosfato, N1-metiladenosina 5'-trifosfato, N1-metilguanosina 5'-trifosfato, N6-metiladenosina 5'-trifosfato, O6-metilguanosina 5'-trifosfato, pseudouridina 5'-trifosfato, puromicina 5'-trifosfato o xantosina 5'-trifosfato.

Normalmente, 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.

Estructura de la tapa

25 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' 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.

30 Las estructuras de tapa que se producen naturalmente comprenden una 7-metilguanosina que está unida a través de un puente trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, lo que resulta en una tapa de dinucleótido de m⁷G(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.

40 Una tapa común para el ARNm producido por transcripción *In Vitro* es m⁷G(5')ppp(5')G, que se ha usado como la tapa de dinucleótido en la transcripción con ARN polimerasa 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 m⁷G(5')ppp(5')G ("m⁷GpppG") como iniciador de la transcripción.

45 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-inversa ("ARCA") o ARCA modificado, que generalmente es un análogo de tapa modificado en el que el grupo OH 2' o 3' se sustituye por -OCH₃.

50 Los análogos de tapa adicionales incluyen, pero no se limitan a, estructuras químicas seleccionadas del grupo que consiste en m⁷GpppG, m⁷GpppA, m⁷GpppC; análogos de tapa no metilados (por ejemplo, GpppG); análogo de tapa dimetilada (por ejemplo, m^{2,7}GpppG), análogo de tapa trimetilada (por ejemplo, m^{2,2,7}GpppG), análogos de tapa simétricos dimetilados (por ejemplo, m⁷Gpppm⁷G), o análogos de tapa inversa (por ejemplo, ARCA; m^{7,2'Ome}GpppG, m^{7,2'd}GpppG, m^{7,3'Ome}GpppG, m^{7,3'd}GpppG y sus derivados de tetrafosfato (ver, por ejemplo, Jemielity, J. et al., "Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties", RNA, 9: 1108-1122 (2003)).

55 En algunas realizaciones, una tapa adecuada es un 7-metilo guanilato ("m⁷G") unido a través de un puente trifosfato al extremo 5' del primer nucleótido transcrito, dando como resultado m⁷G(5')ppp(5')N, donde N es cualquier nucleósido. Una realización preferida de una tapa m⁷G utilizada en realizaciones de la invención es m⁷G(5')ppp(5')G.

60 En algunas realizaciones, la tapa es una estructura Cap0. Las estructuras de Cap0 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 Cap1. Las estructuras de Cap1 tienen un residuo 2'-O-metilo en la base 2. En algunas realizaciones, la tapa es una estructura de Cap2. Las estructuras de Cap2 tienen un residuo 2'-O-metilo unido a ambas bases 2 y 3.

65 En la técnica se conoce una variedad de análogos de cap m⁷G, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Estos incluyen los m⁷GpppG descritos anteriormente, así como los análogos de tapa ARCA 3'-

OCH₃ y 2'-OCH₃ (Jemielity, J. et al., RNA, 9: 1108-1122 (2003)). Análogos adicionales de la tapa 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 los análogos de tapa (incluidos los análogos de tapa biotinilados) descritos en las patentes de EE.UU. Números 8.093.367 y 8.304.529.

Estructura de cola

Normalmente, la presencia de una "cola" sirve para proteger el 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* utilizando 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)).

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: 6). En algunas realizaciones, una cola poli-A en el extremo 3' del ARNm incluye típicamente de aproximadamente 10 a 300 nucleótidos de adenosina (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). Una cola poli-A de 10 a 100 nucleótidos de adenosina, por ejemplo de aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de adenosina, o de aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de adenosina, es adecuada para poner en práctica la invención. En algunas realizaciones, se puede usar una cola poli(U) para reemplazar una cola poli(A) descrita en este documento. En algunas realizaciones, se puede agregar una cola de poli(U) a una cola de poli(A) descrita en este documento. 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: 7) (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de citosina, de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de citosina, de 20 a 70 nucleótidos de citosina, aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de citosina, o aproximadamente 10 a 40 nucleótidos de citosina). Una cola de poli-C de aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de citosina, por ejemplo de aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de citosina, o de aproximadamente 10 a 40 nucleótidos de citosina, es adecuada para poner en práctica la invención. La cola de poli(C) se puede agregar a una cola de poli(A) y/o poli(U) o puede sustituir a la cola de poli(A) y/o poli(U).

En algunas realizaciones, la longitud de la cola poli(A), poli(U) o poli(C) se ajusta para controlar la estabilidad de una molécula de ARNm con sentido modificado de la invención y, por lo tanto, la transcripción de la proteína. Por ejemplo, dado que la longitud de una estructura de la cola puede influir en la vida media de una molécula de ARNm con sentido, la longitud de la cola se puede ajustar para modificar el nivel de resistencia del ARNm a las nucleasas y, por lo tanto, controlar el curso temporal de la expresión del polinucleótido y/o producción de polipéptidos en una célula diana.

Región no traducida de 5' y 3'

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.

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 miARN. 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 contrapartes no modificadas, e incluyen, por ejemplo, modificaciones realizadas para mejorar la resistencia de tales

polinucleótidos a la digestión con nucleasas *In Vivo*.

Vehículos de administración

5 Como se usa en el presente documento, los términos "vehículo de suministro", "vehículo de transferencia", "nanopartícula" o equivalente gramatical, se usan indistintamente.

10 Los ARNm pueden administrarse a través de un único vehículo de suministro o a través de uno o más vehículos de suministro, cada uno de ellos de una composición diferente. Los vehículos de administración adecuados incluyen, entre otros, vehículos basados en polímeros, como polietilenoimina (PEI), nanopartículas lipídicas y liposomas, nanoliposomas, nanoliposomas que contienen ceramida, proteoliposomas, exosomas naturales y de origen sintético, cuerpos lamelares naturales, sintéticos y semisintéticos, nanopartículas, nanoparticulados de silicato de fósforo y calcio, nanopartículas de fosfato de calcio, partículas nanocristalinas, nanoparticulados semiconductores, poli(D-arginina), geles de sol, nanodendrimeros, sistemas de administración basados en almidón, micelas, emulsiones, niosomas, polímeros de bloques de múltiples dominios (polímeros de vinilo, polímeros de ácido acrílico de polipropileno, policonjugados dinámicos).

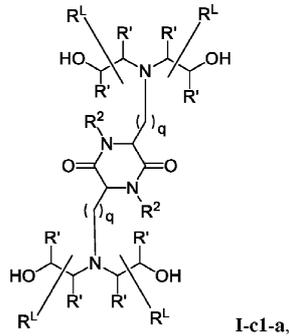
Vehículos de reparto liposomal.

20 De acuerdo con la invención, un vehículo de suministro adecuado es un vehículo de suministro liposomal. Como se usa en este documento, los vehículos de administración liposomal se caracterizan como vesículas microscópicas que tienen un espacio acuoso interior secuestrado de un medio exterior por una membrana de una o más bicapas. Las membranas de bicapa de los liposomas están formadas típicamente por moléculas anfífilas, 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 anfífilos y surfactantes (por ejemplo, polimerosomas, niosomas, etc.). En el contexto de la presente invención, un vehículo de administración liposomal sirve para transportar un ARNm deseado a una célula o tejido diana. 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 asociado 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 los 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.

40 Lípidos catiónicos

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)tetracososa-15,18-dien-1-amina (HGT5000), (15Z, 18Z)-N,N-dimetilo-6-((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)tetracososa-4,15,18-trien-1-amina (HGT5001) y (15Z, 18Z)-N,N-dimetilo-6-((9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dien-1-ilo)tetracososa-5, 15, 18-trien-1-amina (HGT5002).

55 En algunas realizaciones, los liposomas proporcionados incluyen un lípido catiónico descrito en el documento WO 2013/063468 y en la solicitud provisional de EE.UU. titulada "Lipid Formulations for Delivery of Messenger RNA" presentada simultáneamente con la presente solicitud en la misma fecha. En algunas realizaciones, un lípido catiónico comprende un compuesto de fórmula **l-c1-a**:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

20 cada R^2 es independientemente hidrógeno o C_{1-3} alquilo;

cada q independientemente es de 2 a 6;

25 cada R' es independientemente hidrógeno o C_{1-3} alquilo; y

cada R^L es independientemente C_{8-12} alquilo.

30 En algunas realizaciones, cada R^2 es independientemente hidrógeno, metilo o etilo. En algunas realizaciones, cada R^2 es independientemente hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, cada R^2 es hidrógeno.

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.

35 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.

40 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.

45 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.

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.

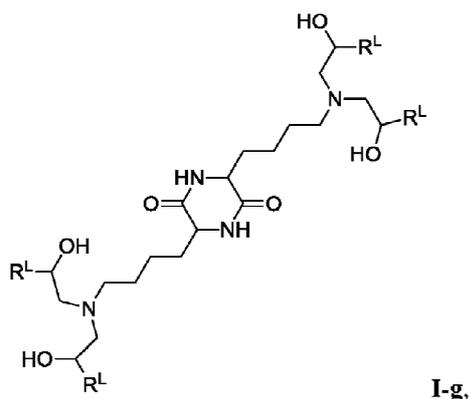
50 En algunas realizaciones, cada R^2 es hidrógeno; cada q es 4; cada R' es hidrógeno; y cada R^L es independientemente C_{8-12} alquilo.

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

5

10

15



20

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.

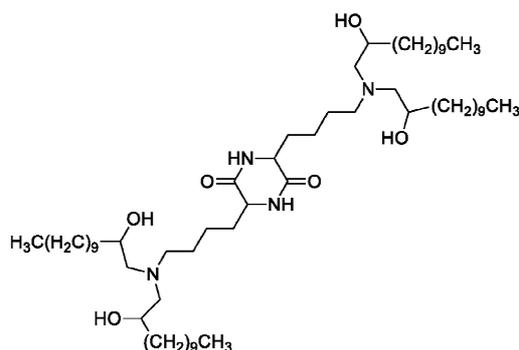
25

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

30

35

40



45

Como se describe en la sección de ejemplos a continuación, los presentes inventores observaron que los liposomas se basan en esta clase particular de lípidos catiónicos, tales como los que tienen una estructura de fórmula **I-c1-a** o fórmula **I-g** descrita en este documento (por ejemplo, cKK-E12) son inesperadamente efectivos en la administración de ARNm y en la producción de proteínas codificadas *In Vivo*. Aunque el ARNm que codifica la proteína PAH se usa como un ejemplo en esta solicitud, se contempla que esta clase de lípidos catiónicos que tienen una estructura de fórmula **I-c1-a** o fórmula **I-g** descrita en el presente documento (por ejemplo, cKK-E12) puede ser útil para administrar cualquier ARNm para una producción altamente eficiente y sostenida de proteínas (p. ej., proteínas terapéuticas) *In Vivo*. Por ejemplo, los lípidos catiónicos que tienen una estructura de fórmula **I-c1-a** o fórmula **I-g** descrita en este documento (por ejemplo, cKK-E12) se pueden usar para administrar un ARNm que codifica uno o más péptidos naturales o uno o más péptidos modificados o no naturales. En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos que tienen una estructura de fórmula **I-c1-a** o fórmula **I-g** descrita en el presente documento (por ejemplo, cKK-E12) se pueden usar para administrar un ARNm que codifica una proteína intracelular que incluye, entre otros, una proteína citosólica (p. ej., una proteína chaperona, una enzima intracelular (p. ej., un ARNm que codifica una enzima asociada con el ciclo de la urea o trastornos del almacenamiento lisosómico)), una proteína asociada al citoesqueleto de actina, una proteína asociada a la membrana plasmática, una proteína perinuclear, una proteína nuclear (por ejemplo, un factor de transcripción) y cualquier otra proteína involucrada en el metabolismo celular, la reparación del ADN, la transcripción y/o la traducción). En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos que tienen una estructura de fórmula **I-c1-a** o fórmula **I-g** descrita en el presente documento (por ejemplo, cKK-E12) se pueden usar para administrar un ARNm que codifica una proteína transmembrana, tal como, una proteína del canal iónico. En algunas realizaciones, se describen lípidos catiónicos que tienen una estructura de fórmula **I-c1-a** o fórmula **I-g** descritas en este documento (por ejemplo, cKK-E12) se puede usar para administrar un ARNm que codifica una proteína extracelular que incluye, pero no se limita a, una proteína asociada con la matriz extracelular, una proteína secretada (por ejemplo, hormonas y/o neurotransmisores).

65

En algunas realizaciones, uno o más lípidos catiónicos adecuados para la presente invención pueden ser cloruro de N-[1-(2,3-dioleoxo)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-carboxispermilglicidicocadclamida o "DOGS," 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxiamido)etilo]-N,N-dimetilo-1-propanaminio o "DOSPA" (Behr et al. 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".

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-dilinoleiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLinDMA", N-dioleil-N,N-dimetilamonio cloruro o "DODAC", N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio bromuro o "DDAB", N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-ilo)-N,N-dimetilo-N-hidroxi-etilamonio bromuro o "DMRIE", 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetilo 1-1-(cis,cis-9',1'-2'- octadecadienoxi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetilo-3,4-dioleiloxibencilamina o "DMOBA", 1, 2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-Dilinoleiloxi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-Dilinoleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLincarbDAP", 1, 2-Dilinoleoilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometilo-[1,3]-dioxolano o "DLin-DMA", 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetilo-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA", y 2-(2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)-1,3-dioxolan-4-ilo)-N,N-dimetiletanamina (DLin-KC2-DMA)) (véase el documento 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.

En algunas realizaciones, uno o más lípidos catiónicos se pueden elegir entre XTC (2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetilo-[1,3]-dioxolano), MC3 (((6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo 4-(dimetilamino)butanoato), ALNY-100 ((3aR, 5s, 6aS)-N,N-dimetilo-2,2-di((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienil)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), lipídeos de aminoalcohol tales como los descritos en el documento WO2010/053572, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio 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). 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.

50 Lípidos no catiónicos/auxiliares

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), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidilo etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), 16-O-monometilo-PE, 16-O-dimetilo-PE, 18-1-trans-PE, 1-estearoil-2-oleoilfosfatoidetanolamina (SOPE), o una mezcla de los mismos.

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 total de lípidos presentes 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%.

5

Lípidos a base de colesterol

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%.

10

15

Lípidos PEGilados

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-[Succinil(Metoxi Polietilenglicol)-2000] (C8 PEG-Ceramida 2000) también se contempla en la presente invención en combinación con uno o más de los lípidos catiónicos y otros que forman parte del 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 C₆-C₂₀. 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 ácido lipídico-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

25

30

En algunas realizaciones, los lípidos intercambiables particularmente útiles son PEG-ceramidas que tienen cadenas de acilo más cortas (por ejemplo, C₁₄ o C₁₈). El fosfolípido modificado con PEG y los lípidos derivatizados de la presente invención pueden comprender una relación molar de aproximadamente 0% a aproximadamente 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.

35

Según diversas realizaciones, la selección de lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos modificados con PEG que comprenden el liposoma, así como la relación molar relativa de tales lípidos entre sí, se basa en las características del (los) lípido(s) seleccionado(s), la naturaleza de las células diana deseadas y 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.

40

45

En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos, los lípidos no catiónicos, el colesterol y los lípidos modificados con PEG se pueden combinar en varias relaciones molares relativas. Por ejemplo, la relación de lípido catiónico (por ejemplo, cKK-E12, C12-200, etc.) a lípido no catiónico (por ejemplo, DOPE, etc.) a lípido basado en colesterol (por ejemplo, colesterol) a lípido PEGilado (por ejemplo, DMG-PEG2K) puede estar entre aproximadamente 30-60: 20-35: 20-30: 1-15, respectivamente. En algunas realizaciones, el liposoma comprende cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K. En algunas realizaciones, el liposoma comprende cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K en una proporción de 40:30:25:25, 50:25:20:5, 50:27:20:3, 40:30:20:10, 40:32:20:8, 40:32:25:3 o 40:33:25:2. En algunas realizaciones, el liposoma comprende cKK-E12, DSPC, colesterol y DMG-PEG2K. En algunas realizaciones, el liposoma comprende cKK-E12, DSPC, colesterol y DMG-PEG2K en una proporción de 40:30:25:5, 50:25:20:5, 40:30:20:10, o 40:32:20:8. En algunas realizaciones, el liposoma comprende C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K. En algunas realizaciones, el liposoma comprende C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K en una proporción de 50:25:20:5, 50:20:25:5, 50:27:20:3 40:30:20:10, 40:30:25:5 o 40:32:20:8, 40:32:25:3 o 40:33:25:2.

50

55

Formación de liposomas

60

Los vehículos de transferencia liposomal para uso en la presente 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 seleccionado en la pared interior de un recipiente o recipiente adecuado disolviendo el lípido en

65

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.

Dieciséis

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.

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, el 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.

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 asociado 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 donde 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 los 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.

Tamaño del liposoma

Los liposomas adecuados de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse en varios tamaños. En algunas realizaciones, una nanopartícula adecuada tiene un tamaño de menos de aproximadamente 100 nm (por ejemplo, de o menos de aproximadamente 90 nm, 80 nm, 70 nm, 60 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, o 20 nm). En algunas realizaciones, el liposoma tiene un tamaño de o menos de aproximadamente 60 nm (por ejemplo, de o menos de aproximadamente 55 nm, de o menos de aproximadamente 50 nm, de o menos de aproximadamente 45 nm, de o menos de aproximadamente 40 nm, de o menos de aproximadamente 35 nm, de o menos de aproximadamente 30 nm, o de o menos de aproximadamente 25 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, 10 a 50 nm, 10 a 40 nm, o 10 a 30 nm). Se pueden usar liposomas con un tamaño de 60 a 100 nm (Zaverage) y en particular nanopartículas con un tamaño de 70 a 90 nm (Zaverage) en la práctica de la invención. El índice de polidispersidad (PDI) de los liposomas está típicamente en el intervalo de 0,1 a 0,5. En una realización particular, un PDI está por debajo de 0,2. Normalmente, el PDI se determina mediante la dispersión dinámica de la luz.

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.

Composiciones farmacéuticas y administración

Para facilitar la expresión de ARNm *In Vivo*, se pueden formular vehículos de administración tales como liposomas 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.

Las composiciones que contienen ARNm pueden administrarse y dosificarse 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, el sexo y el cuerpo del sujeto. peso y otros factores relevantes para los clínicos de habilidad ordinaria en la técnica. La administración intravítrea se utiliza para administrar el ARNm en el ojo. La administración intravítrea se utiliza cuando se desea que la expresión del ARNm esté restringida al ojo, por ejemplo, cuando el ARNm codifica una proteína que se expresa únicamente en el ojo o donde el ARNm codifica una proteína terapéutica cuya actividad está particularmente restringida al ojo (por ejemplo, cuando la proteína codifica un antagonista de VEGF, como un anticuerpo anti-VEGF o un receptor de VEGF soluble). 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. En algunas realizaciones, una cantidad adecuada y un régimen de dosificación es uno que da como resultado la expresión o actividad de proteínas (por ejemplo, anticuerpos) en el ojo. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína se detecta en células de la córnea, células esclerales, células epiteliales del plexo coroideo, células del cuerpo ciliar, células de la retina y/o humor vítreo. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína se detecta en la región posterior del ojo. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína se detecta en la región anterior del ojo. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína se detecta tanto en la región posterior como en la anterior del ojo. En algunas realizaciones, la expresión y/o la actividad de la proteína se detecta mediante un muestreo de sangre. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína se detecta mediante el muestreo de un humor vítreo. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de la proteína es detectable aproximadamente 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o más después de una sola administración.

Los métodos proporcionados contemplan administraciones únicas y múltiples de una cantidad terapéuticamente eficaz de ARNm o una composición descrita en el presente documento. El ARNm o una composición descrita en el presente documento se puede administrar a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza, gravedad y extensión de la afección del sujeto. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de ARNm o una composición descrita en el presente documento puede administrarse periódicamente a intervalos regulares (por ejemplo, una vez al año, una vez cada seis meses, una vez cada cinco meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada tres meses, bimestralmente (una vez cada dos meses), mensual (una vez cada mes), una vez cada tres semanas, quincenalmente (una vez cada dos semanas), semanalmente, una vez cada tres días, una vez cada dos días, diaria o continuamente). Los intervalos típicos incluyen una vez al mes y cada dos meses. En algunas realizaciones, el ARNm o una composición descrita en el presente documento puede administrarse a intervalos variables.

40

EJEMPLOS

Mientras que ciertos compuestos, composiciones y métodos se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar la invención y no pretenden limitarla.

45

Ejemplo 1, Formulaciones de liposomas ejemplares para la administración y expresión de ARNm

Este ejemplo proporciona formulaciones de liposomas ejemplares para el suministro y la expresión eficaces de ARNm *In Vivo*.

50

Materiales lipídicos

Las formulaciones descritas en el presente documento consistían en una mezcla de lípidos de múltiples componentes de proporciones variables que empleaban uno o más lípidos catiónicos, lípidos auxiliares y lípidos PEGilados diseñados para encapsular diversos materiales basados en ácido nucleico. 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 (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), MD1 (3,6-bis(4-(bis(2-hidroxidodil)amino)butilo)piperazina-2,5-diona), cKK-E12, 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-fosfoetano) lamina, 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-fosfo-(1'-rac-glicerol), colesterol, etc. Los lípidos PEGilados

65

pueden incluir (pero no exclusivamente) una cadena poli(etileno)glicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud C6-C20. La polietilenimina puede ser lineal o ramificada. Para PEI ramificado, se prefieren 25 kDa pero no son exclusivos.

5 *Material de ARN mensajero*

El ARN mensajero de luciferasa de luciérnaga humana (FFL) o sintetasa de argininosuccinato humana (ASS1) optimizado por 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' poli(A) de aproximadamente 250 nucleótidos (SEQ ID NO: 8) de longitud, según lo determinado por electroforesis en gel. Regiones 5' y 3' no traducidas presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente, y se definen como se indica (vide infra).

15 ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado por codón (FFL):

ES 2 774 552 T3

5 XAUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAA
GACGGGACCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUCGGUGC
CCGGCACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUUUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGA
10 GUACUUCGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAA
UACAAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUC AUGCCC
GUGUUGGGUGCCCUGUUCUUCGGUGUGGCUGUGGGCCCCAGCUAACGACAUCUACA
15 ACGAGCGCGAGCUGCUGAACAGCAUUGGGCAUCAGCCAGCCCACCGUCGUAUUCGU
GAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAGAUCUCAACGUGCAAAAAGAAGCUACCGAUCAU
ACAAAAGAUCAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUG
20 UACACCUUCGUGACUCCCCAUUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGC
CCGAGAGCUUCGACCGGGACAAAACCAUCGCCCUGAUCAUGAACAGUAGUGGCAG
UACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUC
25 AGUCAUGCCC GCGACCCCAUCUUCGGCAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCC
UCAGCGUGGUGCCAUUUCACCACGGCUUCGGCAUGUUCACCACCGCUGGGCUACUU
GAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUC AUGUACCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUU
30 GCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUUCAAUUCUGCCCUGCUGGUGCCCACACUAUUU
AGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCACG
AGAUCGCCAGCGGGCGGGCGCCGCUCAGCAAGGAGGUAGGUGAGGCCGUGGCCAA
35 ACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCAGC
GCCAUUCUGAUCACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGG
UGCCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGGACACCGGU AAGACACUGGGUG
40 UGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCAUGAUCAUGAGCGGCUACGU
UAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCUGCACAGC
GGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAUCGUGGACCGGCUGA
45 AGAGCCUGAUCAAAUAACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAGCAU
CCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGUCGCCGGCCUGCCCAGCGAC
GAUGCCGGCGAGCUGCCC GCCGAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAUGA

50 CCGAGAAGGAGAUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCU
GCGCGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUU
GGACGCCCGCAAGAUCGCGAGAUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUC
55 GCCGUGUAAY [SEQ ID NO: 1]

65 ARNm de sintetasa de argininosuccinato (ASS1) humana optimizado con codón:

ES 2 774 552 T3

5 XAUGAGCAGCAAGGGCAGCGUGGUGCUGGCCUACAGCGGGCCUGGACACCAGC
UGCAUCCUGGUGUGGCUGAAGGAGCAGGGCUACGACGUGAUCGCCUACCUUGGCCA
ACAUCGGCCAGAAGGAGGACUUCGAGGAGGCCCGCAAGAAGGCCUGAAGCUGGG
CGCCAAGAAGGUGUUCAUCGAGGACGUGAGCCGCGAGUUCGUGGAGGAGUUCAU
10 CUGGCCCGCCAUCCAGAGCAGCGCCUACGAGGACCGCUACCUUGCUGGGCACC
AGCCUGGCCCGCCCCUGCAUCGCCCCGCAAGCAGGUGGAGAUCGCCAGCGCGAGG
GCGCCAAGUACGUGAGCCACGGCGCCACCGGCAAGGGCAACGACCAGGUGCGCUU
15 CGAGCUGAGCUGCUACAGCCUGGCCCCCCAGAUCAAGGUGAUCGCCCCUGGGCGC
AUGCCCGAGUUCUACAACCGCUUCAAGGGCCGCAACGACCUGAUGGAGUACGCCA
AGCAGCACGGCAUCCCCAUCCCCGUGACCCCCAAGAACCCUGGAGCAUGGACGA
20 GAACCUGAUGCACAUCAGCUACGAGGCCGGCAUCCUGGAGAACCCCAAGAACCAG
GCCCCCCCCGGCCUGUACACCAAGACCCAGGACCCCGCCAAGGCCCCCAACACCCC
CGACAUCCUGGAGAUCGAGUUCAAGAAGGGCGUGCCCGUGAAGGUGACCAACGU
25 GAAGGACGGCACCACCCACCAGACCAGCCUGGAGCUGUUCAUGUACCUGAACGAG
GUGGCCGGCAAGCACGGCGUGGGCCGCAUCGACAUCGUGGAGAACCGCUUCAUCG
30 GCAUGAAGAGCCGCGGCAUCUACGAGACCCCGCCGGCACCAUCCUGUACCACGC
CCACCUGGACAUCGAGGCCUUCACCAUGGACCGCGAGGUGCGCAAGAUCAAGCAG
GGCCUGGGCCUGAAGUUCGCCGAGCUGGUGUACACCGGCUUCUGGCACAGCCCCG
35 AGUGCGAGUUCGUGCGCCACUGCAUCGCCAAGAGCCAGGAGCGCGUGGAGGGCAA
GGUGCAGGUGAGCGUGCUGAAGGGCCAGGUGUACAUCCUGGGCCGCGAGAGCCCC
CUGAGCCUGUACAACGAGGAGCUGGUGAGCAUGAACGUGCAGGGCGACUACGAG
40 CCCACCGACGCCACCGGCUUCAUCAACAUCAACAGCCUGCGCCUGAAGGAGUACC
ACCGCCUGCAGAGCAAGGUGACCGCCAAGUGAY [SEQ ID NO: 2]

45 Secuencias UTR 5' y 3'
X (secuencia 5' UTR)

50 GGACAGAUCGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUCCTCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG [SEQ ID NO: 3]

55 Y (secuencia 3' UTR)

60 CGGGUGGCAUCCUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCC
ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUCAAGCU [SEQ
ID NO: 4]

65 OR

GGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAAGUUGCCA
 5 CUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAAAGCU (SEQ
 ID NO: 5)

10 *Protocolos de Formulación Ejemplares*

15 *A. cKK-E12*

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 FFL o 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: 1,0 mg/ml de ARNm de FFL (encapsulado). Z_{ave} 80 nm; PDI 0,12. Concentración final: 2,0 mg/ml de ARNm ASS1 (encapsulado). Z_{ave} 82 nm; PDI: 0,14.

20 *B. C12-200*

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 de FFL 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: 1,0 mg/ml de ARNm de FFL (encapsulado). Z_{ave} 77 nm; PDI: 0,14.

30 *C. PEI*

La solución de PEI ramificada a 25 kDa a una concentración de 1,34 mg/ml (pH 5,0) se mezcló con volúmenes iguales de ARNm de FFL (1,0 mg/ml). La formulación resultante se almacenó a 2-8°C. Concentración final 0,50 mg/ml de ARNm de FFL.

35 ***Ejemplo 2. Análisis de la proteína producida a través de la administración intravítrea de nanopartículas cargadas de ARNm***

Este ejemplo ilustra métodos ejemplares de administración de nanopartículas de liposomas cargados con ARNm de FFL o ASS1 y métodos para analizar el ARNm administrado y posteriormente la proteína FFL o ASS1 expresada en varios tejidos diana *In Vivo*.

Todos los estudios se realizaron utilizando ratones CD-1 macho o ratas Sprague-Dawley. Las muestras se introdujeron en ratones mediante una inyección en una vena de la cola de un solo bolo de ARNm FFL o ASS1 encapsulado. Las muestras se introdujeron en ratas mediante inyección intravítrea directa de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm ASS1 encapsuladas.

45 *Protocolo de inyección*

Los animales se anestesiaron con inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina 60 - 150 mg/kg y xilazina 6 - 32 mg/kg. Los materiales de prueba se inyectaron solo por inyección intravítrea en el ojo izquierdo. Se administró yohimbina (2 mg/ml, 0,01 - 0,02 ml/animal, IP) a los animales después de la administración de la dosis para mejorar la recuperación de la anestesia.

55 *Imágenes in vivo de animales.*

A las 6 y 24 horas posteriores a la finalización de la administración de la dosis (\pm 5%), todos los animales se sometieron a una sesión de formación de imágenes con equipo IVIS Lumina. Los animales se trataron con ketamina/xilazina [40-100mg/kg/5-15mg/kg (ratas), 60-150mg/kg/6-32mg/kg (ratones)] mediante inyección IP. Después de esto, a los animales se les inyectaron hasta 5 ml/animal (ratones) o hasta 10 ml/animal (ratas) de luciferina en PBS a 60 mg/ml mediante inyección intravítrea. La luciferina se dejó distribuir durante 5-10 minutos.

60 *Aislamiento de tejidos orgánicos para análisis.*

Después de la sesión de imágenes, todos los animales fueron sacrificados por asfixia con CO₂, seguido de toracotomía. Para la mitad de los animales/grupo, se cosechó el globo ocular izquierdo. La mitad de los globos

oculares se almacenaron como un casete de histología por animal. Todos los casetes de histología se almacenaron en condiciones ambientales en NBF al 10% durante al menos 24 horas, pero no más de 72 horas, antes de ser transferidos a una solución de alcohol al 70% y procesados para histología (parafina). Las otras bolas/grupo ocular se colocaron en tubos individuales, luego se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a aproximadamente -70°C.

Para la mitad restante de los animales de cada grupo, se recogieron las retinas del ojo izquierdo. La mitad de las retinas/grupo se almacenaron en condiciones ambientales en NBF al 10% durante al menos 24 horas, pero no más de 72 horas, antes de transferirse a una solución de alcohol al 70%. Las retinas fijas se transfirieron a PBS y se montaron en un (1) portaobjetos de microscopio por grupo y se almacenaron a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Las otras retinas/grupo se colocaron en tubos individuales, luego se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a aproximadamente -70°C.

Análisis de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (eLISA)

Se siguieron los procedimientos ELISA estándar empleando IgG anti-ASS1 2D1-2E12 de ratón como el anticuerpo de captura con IgG anti-ASS1 #3285 de conejo como el 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 2N H₂SO₄ después de 20 minutos. La detección se controló mediante absorción (450 nm) en un instrumento Molecular Device SpectraMax. Los órganos no tratados y la proteína ASS1 humana se utilizaron como controles negativos y positivos, respectivamente.

Ejemplo 3. Producción eficiente de proteínas *in vivo* en el ojo.

Este ejemplo demuestra que la administración de ARNm que codifica FFL o ASS1 da como resultado la producción exitosa de proteínas *In Vivo* en el ojo. Se eligió ASS1 en parte porque ASS1 es una proteína expresada en el ojo en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, este ejemplo establece que la terapia de ARNm puede usarse para administrar proteínas fisiológicamente relevantes para reemplazar, aumentar o complementar la actividad de proteínas endógenas en el ojo.

*Resultados de la producción de proteína luciferasa de luciérnaga *in vivo**

La producción de proteína luciferasa de luciérnaga a través de lípidos cargados con ARNm de FFL optimizado con codón y nanopartículas poliméricas se ensayó en ratones CD-1 como una única inyección en bolo intravítrea. Las Figuras 1-4 representan la luminiscencia detectada a través de imágenes bioluminiscentes *in vivo* utilizando un reproductor de imágenes IVIS. Dicha luminiscencia se midió 6 y 24 horas después de la inyección de nanopartículas de ARNm de FFL en ratones de tipo salvaje. La Tabla 1 representa los valores de luminiscencia después de la administración de luciferina (flujo total (fotón/s), 5 minutos después de la luciferina). Los ratones se sacrificaron veinticuatro horas después de la inyección y los órganos se recogieron (como se describe anteriormente).

Tabla 1. Cuantificación del flujo luminiscente total (fotones/s) producido a partir de la proteína luciferasa de luciérnaga activa derivada de la administración intravítrea de nanopartículas cargadas de ARNm de FFL. Los valores reflejan la proteína producida 24 horas después de la administración del artículo de prueba. El flujo total se mide cinco minutos después de la administración del sustrato de luciferina.

Portador (Componente catiónico)	ARNm	Dosis (μg)	Flujo total (fotón/s)
cKK-E12	FFL	5,0	70.000.000
C12-200	FFL	5,0	59.100.000
PEI (25 kDA ramificado)	FFL	2,5	2.350.000
Saline	N/A	N/A	22.800

*Resultados de la producción de la proteína ASS1 humana *in vivo**

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 y ratas Sprague-Dawley como una única inyección en bolo intravítrea. La Figura 5 representa la cantidad de proteína ASS1 humana detectada en el ojo mediante ELISA cuando se tratan ratones con nanopartículas lipídicas basadas en MD1 humanas cargadas con ARNm ASS1 (5 microgramos, basadas en ARNm encapsulado) o formulaciones de control (ARNm STOP y/o solución salina). Los ratones se sacrificaron veinticuatro horas después de la inyección y los órganos se recogieron (como se describe anteriormente).

Se detectó una señal clara al medir los niveles oculares de la proteína ASS1 humana a través de ELISA. Esto contrasta con la falta completa de señal cuando se analizan los globos oculares tratados con control de ARNm STOP o solución salina (Figura 5). Estos datos demuestran la capacidad de las nanopartículas lipídicas para acumularse en las células oculares y liberar la carga útil del ARNm para procesar este ARNm exógeno a través de la traducción para producir la proteína ASS1 humana.

Dicha producción de proteínas también se logró en una segunda especie de roedor, ratas Sprague-Dawley. Como se muestra en la Figura 6, el tratamiento de ratas mediante inyección intravítrea directa con nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm ASS1 (20 microgramos, basado en ARNm encapsulado) produjo niveles detectables de proteína ASS1 humana dentro del ojo tratado.

EQUIVALENTES

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas descritas en este documento. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a la descripción anterior, sino que se establece en las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TRANSLATE BIO, INC.

<120> TERAPIA DE ARNM PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES OCULARES

<130> P073843EP

<140> Todavía no asignado

<141> 2015-03-19

<150> 61/969,483

<151> 2014-03-24

<150> EP15767977.0

<151> 2015-03-19

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1899

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<221> base modificada

<222> (1794). (1794)

<223> Puede o no estar presente

<220>

<221> base modificada

<222> (1896). (1896)

<223> Puede o no estar presente

<220>

<223> Consulte la especificación como presentada para obtener una descripción detallada de las sustituciones y las realizaciones preferidas

<400> 1

ES 2 774 552 T3

	ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac	60
5	cgauccagcc uccgcgggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauucctcg ugccaagagu	120
	gacucaccgu ccuugacacg auggaagaug ccaaaaacau uaagaagggc ccagcgccau	180
	ucuaccacu cgaagacggg accgcccggc agcagcugca caaagccaug aagcgcuacg	240
10	cccuggugcc cggcaccauc gccuuuaccg acgcacauau cgagguggac auuaccuacg	300
	ccgaguacuu cgagaugagc guucggcugg cagaagcuau gaagcgcuau gggcugaaua	360
15	caaaccaucg gaucguggug ugcagcgaga auagcuugca guucuucaug cccguguugg	420
	gugcccuguu caucggugug gcuguggccc cagcuaacga caucuacaac gagcgcgagc	480
	ugcugaacag caugggcauc agccagccca ccgucguauu cgugagcaag aaagggcugc	540
20	aaaagaucuu caacgugcaa aagaagcuac cgaucauaca aaagaucac aucauggaua	600
	gcaagaccga cuaccagggc uuccaaagca uguacaccuu cgugacuucc cauuugccac	660
25	ccggcuucaa cgaguacgac uucgugcccg agagcuucga cggggacaaa accaucgccc	720
	ugaucaugaa caguaguggc aguaccggau ugcccgaagg cguaagccua ccgcaccgca	780
	ccgcuugugu ccgauucagu caugcccgcg accccaucuu cggcaaccag aucaucctcg	840
30	acaccgcuau ccucagcgug gugccauuuc accacggcuu cggcauguuc accacgcugg	900
	gcuacuugau cugcggcuuu cgggucgugc ucauguaccg cuucgaggag gagcuauucu	960
35	ugcgcagcuu gcaagacuau aagauucaau cugcccugcu ggugcccaca cuauuuagcu	1020
	ucuuvcgcaa gagcacucuc aucgacaagu acgaccuaag caacuvcac gagaucgcca	1080
	gcgcgggggc gccgcucagc aaggagguag gugagccgu ggccaaacgc uuccaccuac	1140
40	caggcauccg ccagggcuac ggccugacag aaacaaccag cgccauucug aucacccccg	1200
	aaggggacga caagccuggc gcaguaggca agguggugcc cuucuucgag gcuaaggugg	1260
45	uggacuugga caccgguaag acacugggug ugaaccagcg cggcgagcug ugcguccgug	1320
	gccccaugau caugagcggc uacguuaaca accccgaggc uacaaacgc cucaucgaca	1380
	aggacggcug gcugcacagc ggcgacaucg ccuacuggga cgaggacgag cacuucuua	1440
50	ucguggaccg gcugaagagc cugaucaau acaagggcua ccagguagcc ccagccgaac	1500
	uggagagcau ccugcugcaa caccccaaca ucuucgacgc cggggucgcc ggccugcccg	1560
55	acgacgaugc cggcgagcug cccgccgcag ucgucgugcu ggaacacggu aaaaccauga	1620
	ccgagaagga gaucguggac uauguggcca gccagguuac aaccgccaag aagcugcgcg	1680
	gugguguugu guucguggac gaggugccua aaggacugac cggcaaguug gacgcccgca	1740
60	agaucgcgga gauucucau aaggccaaga agggcggcaa gaucgcccug uaacgggugg	1800
	caucccugug accccucccc agugccucuc cuggcccugg aaguugccac uccagugccc	1860
65	accagccuug uccuaauaaa auuaaguugc aucaaagcu	1899

<210> 2
<211> 1485
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

5
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
10 <221> base modificada
<222> (1380). (1380)
<223> Puede o no estar presente

<220>
15 <221> base modificada
<222> (1482). (1482)
<223> Puede o no estar presente

<220>
20 <223> Consulte la especificación como presentada para obtener una descripción detallada de las sustituciones y las realizaciones preferidas

<400> 2

ES 2 774 552 T3

	ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac	60
5	cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu	120
	gacucaccgu ccuugacacg augagcagca agggcagcgu ggugcuggcc uacagcggcg	180
10	gccuggacac cagcugcauc cugguguggc ugaaggagca gggcuacgac gugaucgccu	240
	accuggccaa caucggccag aaggaggacu ucgaggaggc ccgcaagaag gcccugaagc	300
	ugggcgccaa gaagguguuc aucgaggacg ugagccgcga guucguggag gaguucaucu	360
15	ggccccccau ccagagcagc gcccuugacg aggaccgcua ccugcugggc accagccugg	420
	ccccccccug caucgccccg aagcaggugg agaucgcca gcgcgagggc gccaaaguacg	480
20	ugagccacgg cgccaccggc aagggcaacg accaggugcg cuucgagcug agcugcuaca	540
	gccuggcccc ccagaucaag gugaucgccc ccuggcgcau gcccgaguuc uacaaccgcu	600
	ucaagggccg caacgaccug auggaguacg ccaagcagca cggcaucccc auccccguga	660
25	cccccaagaa ccccgaggc auggacgaga accugaugca caucagcuac gaggccggca	720
	uccuggagaa ccccaagaac caggcccccc cgggccugua caccaagacc caggacccccg	780
30	ccaaggcccc caacaccccc gacauccugg agaucgaguu caagaagggc gugccccguga	840
	aggugaccaa cgugaaggac ggcaccacc accagaccag ccuggagcug uucauguacc	900
	ugaacgaggu ggccggcaag cacggcgugg gccgcaucga caucguggag aaccgcuuca	960
35	ucggcaugaa gagccgcggc aucuacgaga cccccgccgg caccauccug uaccacgccc	1020
	accuggacau cgaggccuuc accauggacc gcgaggugcg caagaucaag cagggccugg	1080
40	gccugaaguu cgccgagcug guguacaccg gcuucuggca cagccccgag ugcgaguucg	1140
	ugcgccacug caucgccaag agccaggagc gcguggaggg caaggugcag gugagcgugc	1200
	ugaagggcca gguguacauc cugggcccgc agagcccccu gagccuguac aacgaggagc	1260
45	uggugagcau gaacgugcag ggcgacuacg agcccaccga cgccaccggc uucaucaaca	1320
	ucaacagccu gcgcccugaag gaguaccacc gccugcagag caaggugacc gccaaugac	1380
50	ggguggcauc ccugugaccc cuccccagug ccucuccugg cccuggaagu ugccacucca	1440
	gugcccacca gccuuguccu aaauaaaaua aguugcauca aagcu	1485

<210> 3

<211> 140

55 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

60

<400> 3

ES 2 774 552 T3

	ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac	60
	cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu	120
	gacucaccgu ccuugacacg	140
10	<210> 4 <211> 105 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
	<400> 4	
20	cggguggcau ccugugacc ccucccagug gccucuccug gccuggaag ugccacucc	60
	agugcccacc agccuugucc uauaaaauu aaguugcauc aagcu	105
25	<210> 5 <211> 105 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
	<400> 5	
35	ggguggcauc ccugugaccc cuccccagug ccucuccugg ccuggaagu ugccacucca	60
	gugcccacca gccuuguccu aauaaaauu aaguugcauca aagcu	105
40	<210> 6 <211> 500 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético	
50	<220> <221> característica miscelanea <222> (1). (500) <223> Esta secuencia puede abarcar 10-500 nucleótidos	
55	<220> <223> Consulte la especificación como presentada para obtener una descripción detallada de las sustituciones y las realizaciones preferidas	
	<400> 6	

ES 2 774 552 T3

	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
5	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
10	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
15	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	420
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	480
20	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	500

<210> 7
 <211> 200
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
 <221> característica miscelanea
 <222> (1). (200)
 <223> Esta secuencia puede abarcar 10-200 nucleótidos

<220>
 <223> Consulte la especificación como presentada para obtener una descripción detallada de las sustituciones y las realizaciones preferidas

<400> 7

	cccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc	60
	cccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc	120
45	cccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc	180
	cccccccccc ccccccccccc	200

<210> 8
 <211> 250
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

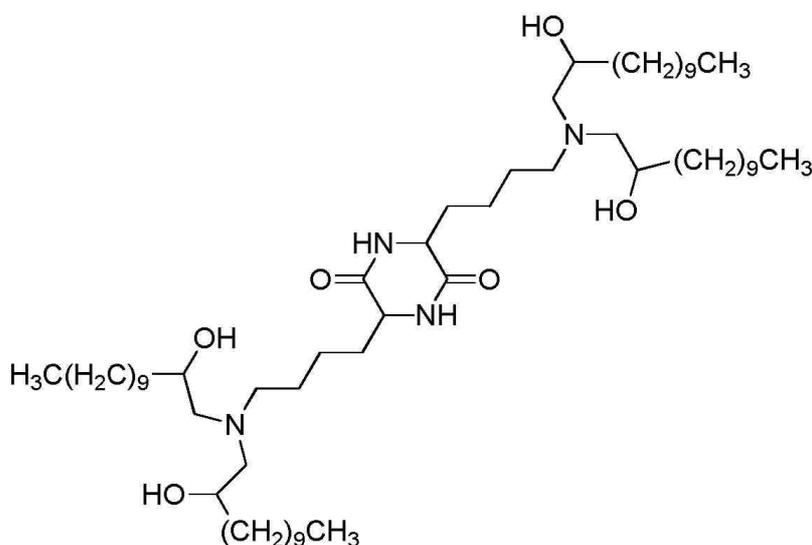
<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético
 <400> 8

ES 2 774 552 T3

	aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	60
5	aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	120
	aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	180
10	aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa	240
	aaaaaaaaa	250

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un ARNm que codifica un péptido o polipéptido terapéutico para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección ocular en un sujeto que lo necesita, en donde la composición se administra en un ojo del sujeto mediante inyección intravítrea de tal manera que la administración de la composición da como resultado la expresión y/o actividad del péptido o polipéptido terapéutico codificado por el ARNm en el ojo, en donde el ARNm tiene una longitud de 0,5 kb a 5 kb y está encapsulado dentro de un liposoma, en donde el liposoma comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, uno o más lípidos a base de colesterol y uno o más lípidos modificados con PEG.
2. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la expresión y/o actividad del péptido o polipéptido terapéutico se detecta en células corneales, células esclerales, células epiteliales del plexo coroideo, células del cuerpo ciliar, células retinianas y/o humor vítreo, opcionalmente en donde la expresión y/o actividad del péptido o polipéptido terapéutico se detecta mediante (a) muestreo de sangre, o (b) muestreo de un humor vítreo.
3. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la expresión y/o actividad del péptido o polipéptido terapéutico es detectable aproximadamente 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o 1 mes después de la administración.
4. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ARNm tiene una longitud de aproximadamente 1 kb a 3 kb.
5. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido o polipéptido terapéutico codificado por el ARNm (a) funciona normalmente en el ojo, (b) es un anticuerpo, o (c) es un receptor soluble, opcionalmente en donde el anticuerpo codificado por el ARNm es un anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-TNF α , anticuerpo anti-IL-6, anticuerpo anti-ICAM-1, anti-VCAM-1, o receptor de VEGF soluble.
6. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enfermedad, trastorno o afección ocular se selecciona de AMD, PU, BRVO, CRVO, DME, CME, UME, CMV, retinitis, endoftalmítis, inflamación, glaucoma, degeneración macular, escleritis, coriorretinitis, síndrome de ojo seco, Stargardt, enfermedad de Norris, enfermedad de Coat, vítreo primario hiperplásico persistente, vitreoretinopatía exudativa familiar, amaurosis de congénita Leber, retinitis pigmentosa, retinosquiasis ligada a X, neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), y uveítis, opcionalmente en donde la composición se administra (a) una vez a la semana, (b) dos veces al mes, o (c) una vez al mes.
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el uno o más lípidos catiónicos se seleccionan del grupo que consiste de C12-200, MC3, DLinDMA, DLinkC2DMA, cKK-E12, ICE (a base de Imidazol), HGT5000, HGT5001, DODAC, DDAB, DMRIE, DOSPA, DOGS, DODAP, DODMA and DMDMA, DODAC, DLenDMA, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, KLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, HGT4003, y combinaciones de los mismos, opcionalmente en donde el uno o más lípidos catiónicos comprenden cKK-E12:



8. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el uno o más

lípidos no catiónicos se seleccionan del grupo que consiste de DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), 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 (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol) y combinaciones de los mismos.

5 **9.** La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el uno o más lípidos a base de colesterol es colesterol o colesterol PEGilado.

10 **10.** La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el 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 C6-C20 de longitud, opcionalmente en la que el lípido catiónico constituya aproximadamente el 30-70% del liposoma por relación molar.

15 **11.** La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el liposoma comprende:

- (a) cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K, opcionalmente en una proporción de 40:30:25:5, 50:25:20:5, 50:27:20:3, 40:30:20:10, 40:32:20:8, 40:32:25:3 o 40:33:25:2;
- 20 (b) cKK-E12, DSPC, colesterol y DMG-PEG2K, opcionalmente en una proporción de 40:30:25:5, 50:25:20:5, 50:27:20:3, 40:30:20:10, 40:32:20:8, 40:32:25:3 o 40:33:25:2; o
- (c) C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K, opcionalmente en una proporción de 50:25:20:5, 50:20:25:5, 50:27:20:3, 40:30:20:10, 40:30:25:5, 40:32:20:8, 40:32:25:3 o 40:33:25:2.

25 **12.** La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la nanopartícula tiene un tamaño inferior a aproximadamente 60 nm.

30 **13.** La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ARNm comprende uno o más nucleótidos modificados, opcionalmente en donde el uno o más nucleótidos modificados comprenden pseudouridina, N-1-metil-pseudouridina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metil adenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinil-citidina, C-5 propinil-uridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propinil-uridina, C5-propinil-citidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y/o 2-tiocitidina.

35 **14.** La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el ARNm no está modificado.

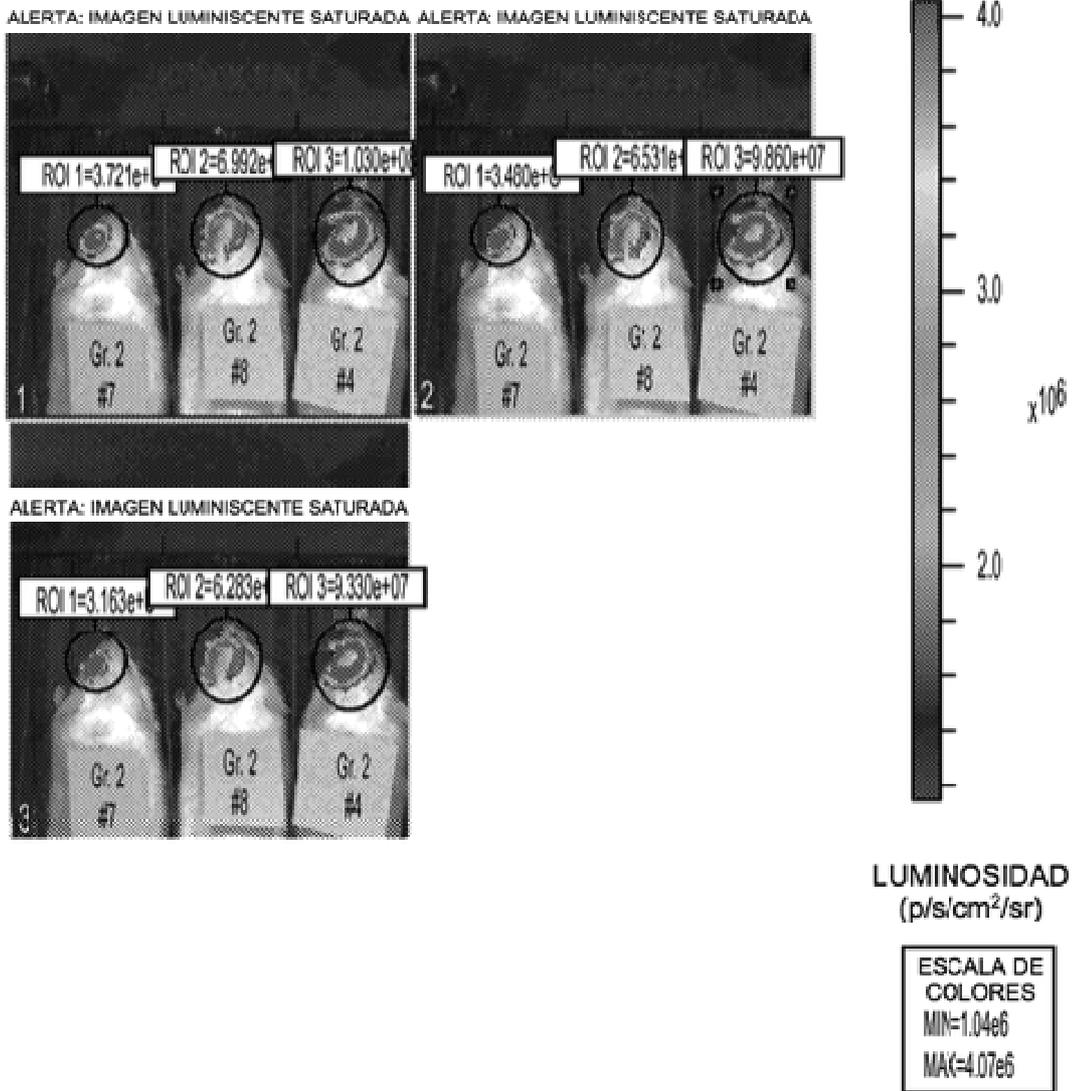


FIG. 1

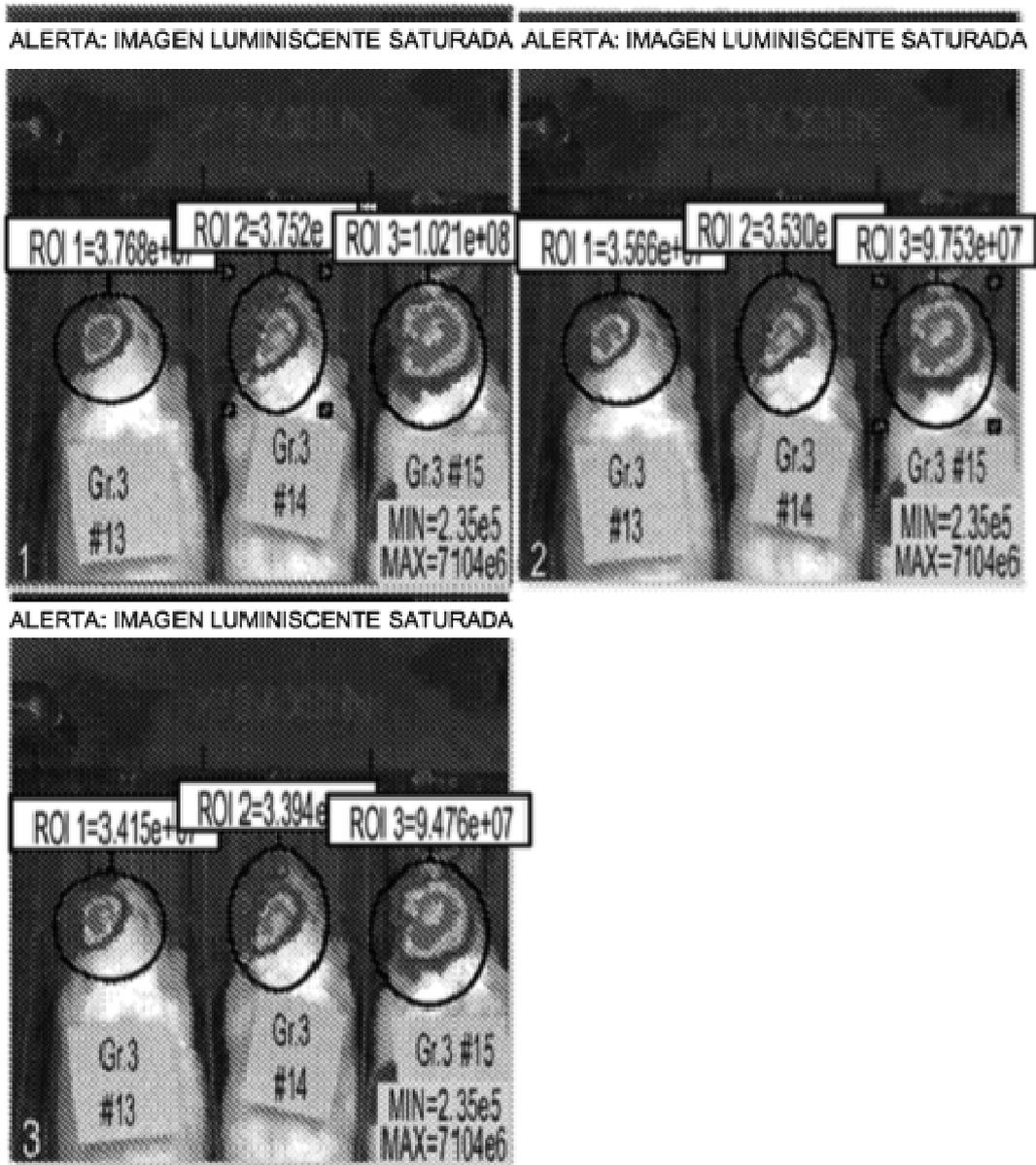


FIG. 2

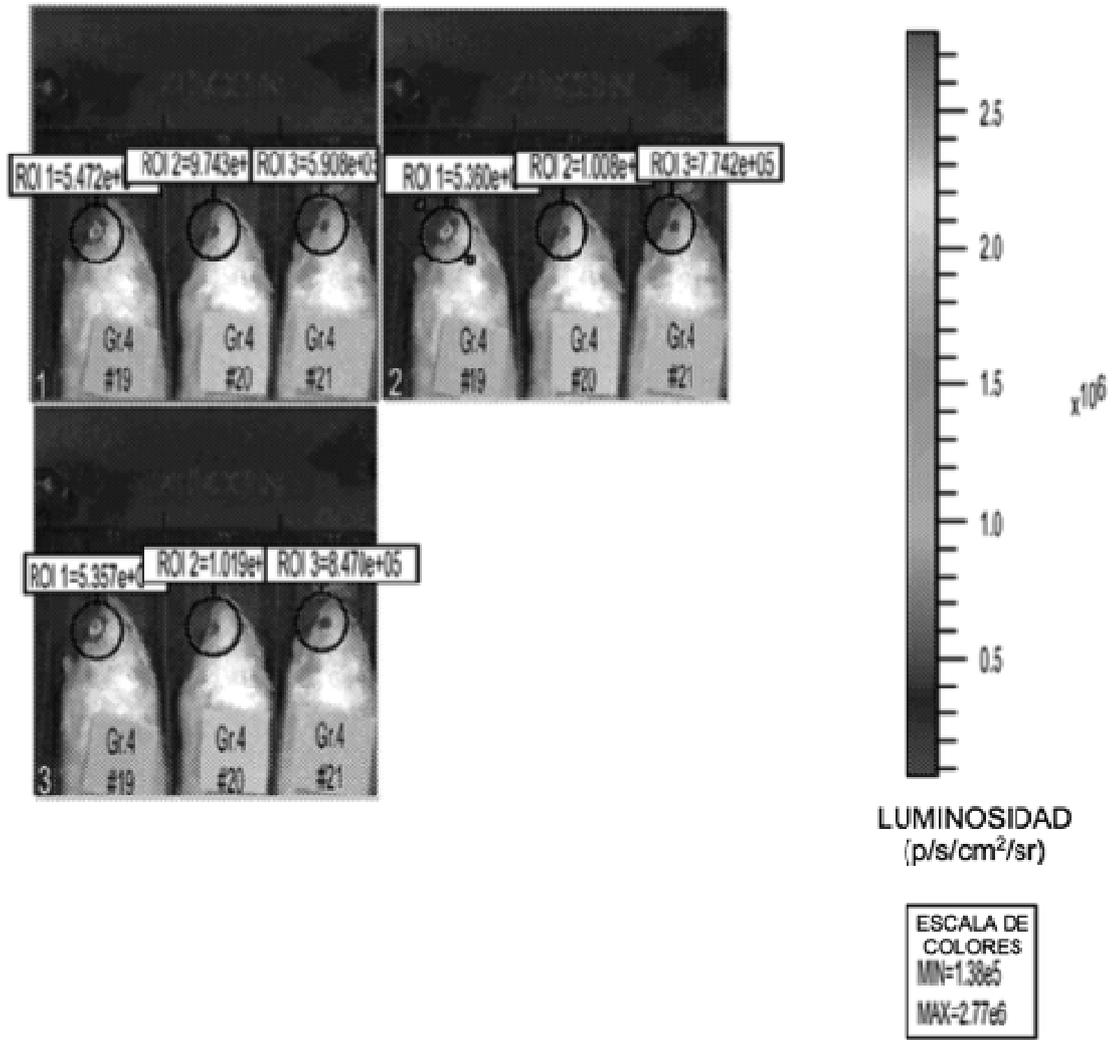


FIG. 3

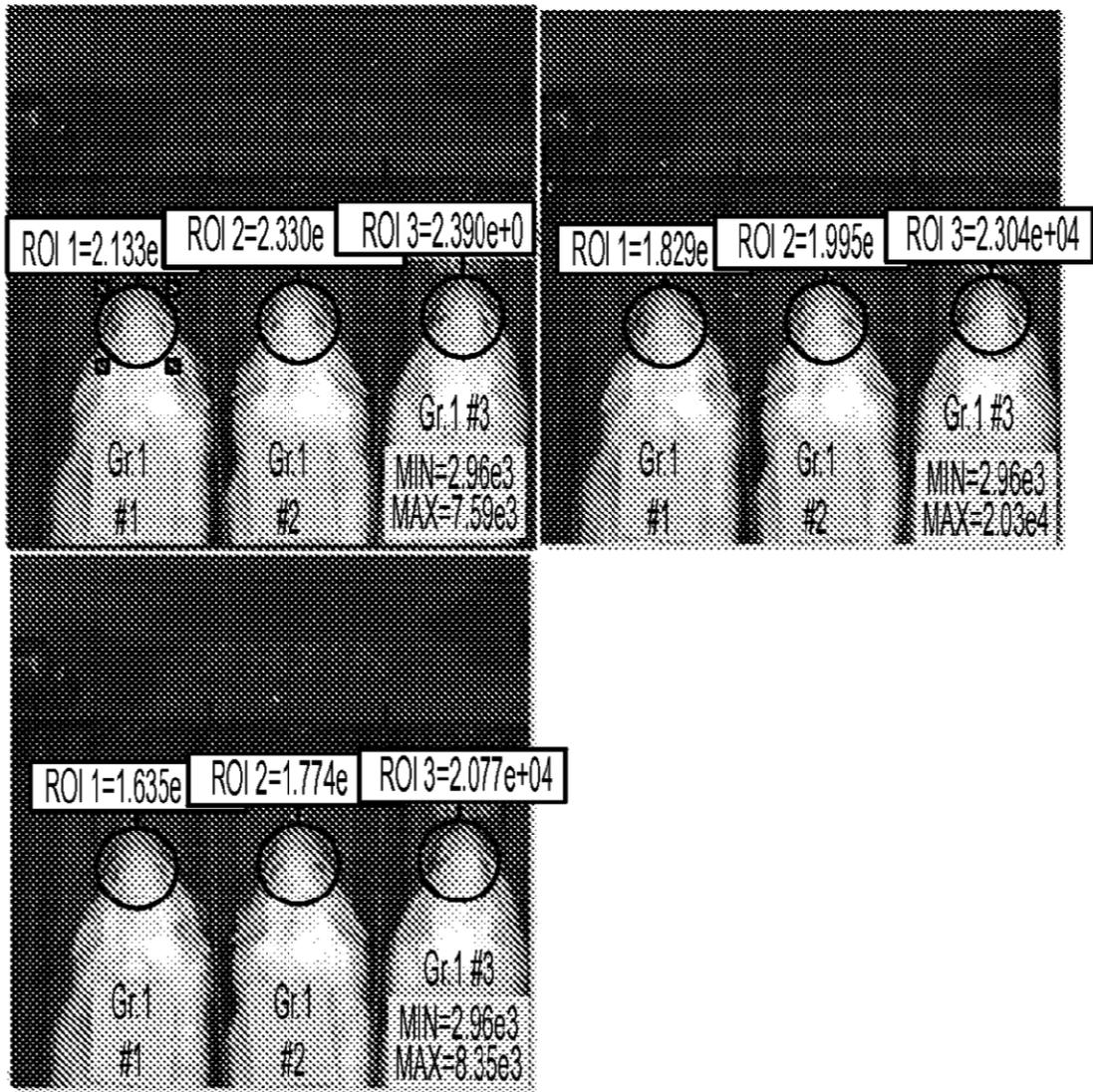


FIG. 4

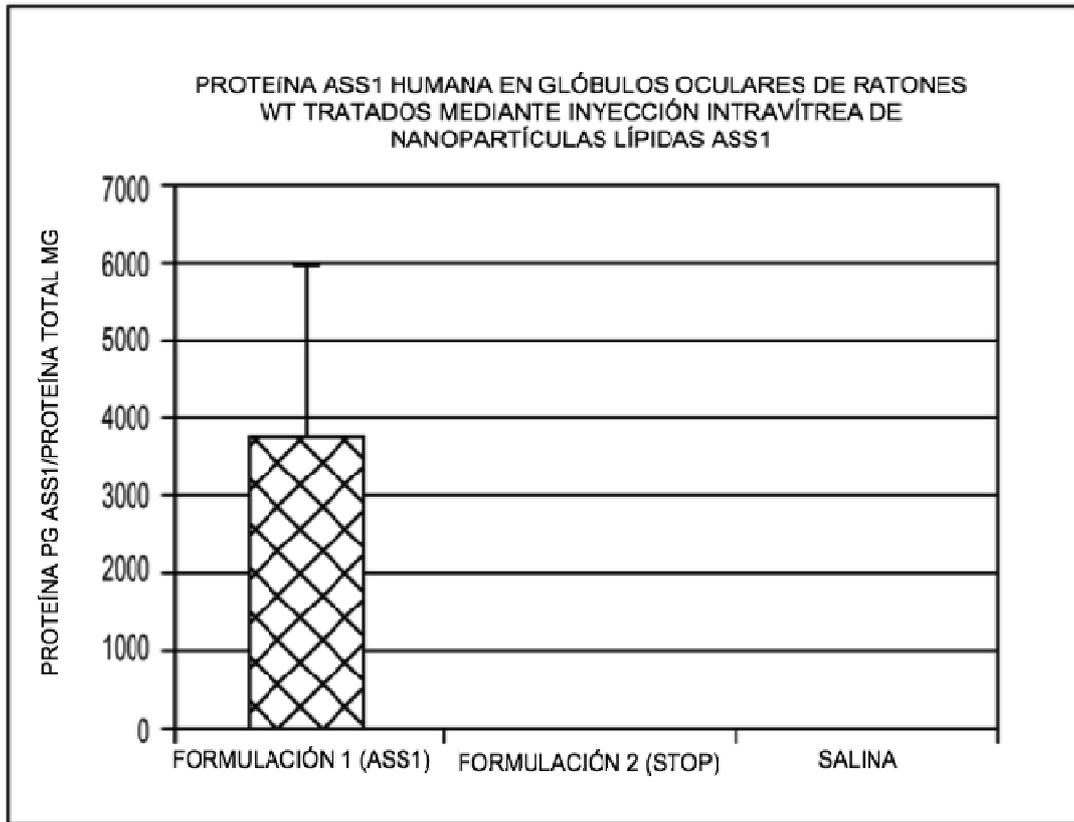


FIG. 5

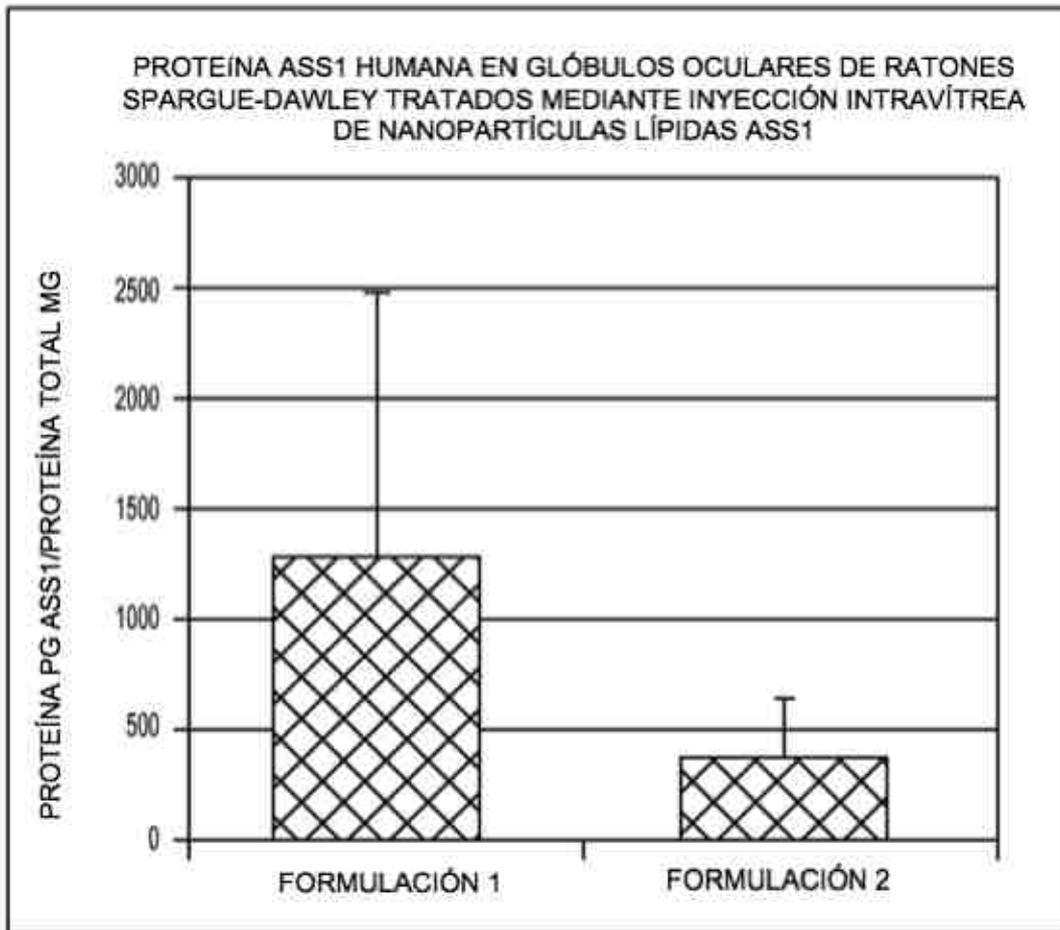


FIG. 6