

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 249**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 18160237 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020** **EP 3388834**

54 Título: **Mejora sinérgica de la administración de ácidos nucleicos a través de formulaciones mezcladas**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361789375 P

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

23.11.2020

73 Titular/es:

TRANSLATE BIO, INC. (100.0%)

**29 Hartwell Avenue
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**DEROSA, FRANK;
SMITH, LIANNE;
HEARTLEIN, MICHAEL y
GUILD, BRAYDON CHARLES**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 795 249 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

Mejora sinérgica de la administración de ácidos nucleicos a través de formulaciones mezcladas

5 ANTECEDENTES

La administración eficiente de los ácidos nucleicos a las células y tejidos diana, así como la posterior transfección de tales ácidos nucleicos en dichas células y tejidos diana sigue siendo un desafío técnico. Por ejemplo, como resultado del tamaño y la carga de ácidos nucleicos tales como ADN y ARN, la capacidad para administrar eficazmente y de manera eficaz tales ácidos nucleicos y/o transfectar dichas células y tejidos diana a menudo es limitada.

Un enfoque para mejorar la administración de ácidos nucleicos y polinucleótidos a las células diana y tejidos ha sido la encapsulación liposomal de ácido nucleico en lípidos y, en particular lípidos catiónicos. La interacción electrostática del lípido catiónico con ácidos nucleicos facilita la formación de partículas de ácido nucleico encapsuladas en lípidos en intervalos de tamaño que pueden ser adecuados para la administración *in vivo*. El lípido catiónico cargado positivamente sobre las superficies de partículas externas facilita la interacción del liposoma basado en lípidos catiónicos con las membranas celulares negativamente cargadas, promoviendo de este modo la fusión del liposoma con la membrana celular y liberando el liposoma y/o vaciando los contenidos de ácido nucleico del liposoma intracelularmente. Aunque se han descrito previamente varias ventajas del uso de liposomas para facilitar el suministro de agentes terapéuticos a células y tejidos diana, todavía existen muchos problemas en aplicaciones *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, muchos de los lípidos catiónicos son generalmente tóxicos para las células diana, y en consecuencia pueden ser de uso limitado. Además, los portadores liposomales pueden no ser el medio más eficaz de administrar ácidos nucleicos a células diana o transfectar posteriormente tales células.

El documento US 2011/244026 describe composiciones farmacéuticas para la administración de ARNm que comprende nanopartículas de lípidos.

Los nuevos enfoques y terapias aún se necesitan para mejorar las eficiencias de administración y/o transfección de polinucleótidos y ácidos nucleicos, en particular aquellos administrados en vehículos de suministro de liposomas, tales como formulaciones de liposomas encapsulados. El desarrollo de nuevos y mejorados vehículos de administración de liposomas y formulaciones liposomales que demuestren eficiencias mejoradas de administración y/o transfección avanzarán más las terapias basadas en ácido nucleico para el tratamiento de enfermedades, tales como terapias de silenciamiento de genes y ARNm, que pueden beneficiarse de terapias de reemplazo de genes. Las terapias de administración de ARNm y/u otras terapias que incluyen la administración intracelular de ácidos nucleicos para la modulación de la expresión de genes, proteínas y/o enzimas.

RESUMEN

La invención proporciona una composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones adjuntas para la administración de uno o más polinucleótidos encapsulados a uno o más células objetivo, dicha composición comprendiendo un ARNm y una mezcla de al menos una primera nanopartícula lipídica y una segunda nanopartícula lipídica, en donde la primera nanopartícula lipídica comprende el ARNm; y en donde la primera nanopartícula lipídica comprende al menos un lípido distinto de la segunda nanopartícula lipídica.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que una mezcla de múltiples nanopartículas lipídicas no idénticas mejora sinérgicamente la expresión de ARN mensajero (ARNm) encapsulado dentro de al menos una de las nanopartículas lipídicas *in vivo*. Este efecto sinérgico se observa a través de una amplia variedad de diferentes nanopartículas lipídicas mezcladas en diversas proporciones y a través de diferentes vías de administración. Por ejemplo, en algunos casos, las mejoras en la expresión de proteínas (por ejemplo, evidenciadas por la producción de luz de una luciferasa de luciérnaga) variaron de aproximadamente 1,5 veces a 30 veces el aumento en comparación con el total de aditivos basado en cada nanopartícula individual. La sinergia también se observa en la expresión tanto específica como sistémica del ARNm. Más sorprendentemente, este efecto sinérgico no es específico de ácido nucleico. Por ejemplo, un ARNm no fluorescente puede potenciar sinérgicamente la producción de luz de un ARNm fluorescente. Se contempla que este descubrimiento inesperado de potenciación sinérgica entre diferentes formulaciones de lípidos tenga una implicación significativa en la terapia con ARN mensajero porque permite lograr una eficacia terapéutica equivalente mediante la administración de una dosis significativamente menor. La capacidad de crear una producción sinérgica de proteínas mediante el suministro de ARNm de nanopartículas basadas en lípidos también permite una ventana terapéutica mucho mayor para el tratamiento de una serie de enfermedades y logra una eficacia igual o mayor a la vez que se minimiza cualquier evento adverso o tóxico. Por lo tanto, la presente invención proporciona una terapia de ARN mensajero más segura y más potente para diversas enfermedades.

Entre otras cosas, en el presente documento se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden una mezcla de al menos dos nanopartículas lipídicas (por ejemplo, una mezcla de una primera nanopartícula lipídica

y una segunda nanopartícula lipídica) y métodos relacionados de uso de tales composiciones de nanopartículas combinadas. En ciertas realizaciones, al menos una de las nanopartículas de lípidos constituyentes que comprende la composición de nanopartículas de lípidos mezclados comprende (por ejemplo, encapsula) uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ARNm). Las composiciones de nanopartículas de lípidos mezcladas descritas en la presente memoria se caracterizan por ser capaces de administrar eficazmente los polinucleótidos encapsulados a células diana, y también se caracterizan por su capacidad de mejorar la transfección posterior de dichos polinucleótidos encapsulados después de contactar una o más de dichas células diana. Las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas también se caracterizan por su capacidad de modular o potenciar (p. ej., aumentar sinérgicamente) la expresión de los polinucleótidos encapsulados en ella por las células diana. En ciertas realizaciones en las que los polinucleótidos son ARNm, las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas también se caracterizan por su capacidad de potenciar la producción de polipéptidos codificados por tales polinucleótidos.

Tal como se utiliza aquí, el término "mezcla", "combinado" o gramatical equivalente, se refiere a una combinación de dos o más formulaciones separadas no idénticas. Típicamente, las dos o más formulaciones separadas, no idénticas, se combinan o se mezclan en una composición, tal como, una suspensión, como se representa, por ejemplo, en la FIG. 1. Como se usa en este documento, las formulaciones no idénticas se refieren a formulaciones que contienen al menos un componente lipídico distinto. En algunas realizaciones, las formulaciones no idénticas adecuadas para la mezcla contienen al menos un componente lípido catiónico distinto. El término "mezcla", como se usa en este documento, se distingue del término "mezcla", que se usa en la presente memoria para definir una única formulación que contiene múltiples lípidos catiónicos/ionizables no idénticos, múltiples lípidos auxiliares no idénticos, y/o múltiples lípidos PEGilados no idénticos. En algunas realizaciones, una formulación de "mezcla" contiene al menos dos o más lípidos catiónicos/ionizables no idénticos. Típicamente, una formulación de "mezcla" contiene una única población homogénea de nanopartículas lipídicas.

Ciertos casos divulgados se refieren a métodos de expresión de uno o más polinucleótidos en una o más células diana. Por ejemplo, cuando los polinucleótidos son ARNm que codifican una proteína funcional, los descritos en la presente son métodos para mejorar la producción y/o excreción de polipéptidos codificados por tales polinucleótidos por una célula diana. Ciertos casos se refieren a métodos para modular la expresión de uno o más polinucleótidos o ácidos nucleicos (por ejemplo, un ácido nucleico diana) en una o más células diana, usando, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido. Dichos métodos pueden comprender poner en contacto la una o más células diana con una composición farmacéutica que comprende una mezcla de al menos dos nanopartículas lipídicas (por ejemplo, una primera nanopartícula lipídica y una segunda nanopartícula lipídica), donde dichas nanopartículas lipídicas primera y segunda tienen diferentes composiciones lipídicas (por ejemplo, la primera composición lipídica comprende un lípido catiónico diferente de la segunda composición de nanopartículas lipídicas). En ciertos casos, al menos una de las dos o más nanopartículas lipídicas que comprenden la composición de nanopartículas lipídicas mezcladas comprende uno o más polinucleótidos. Por ejemplo, la primera nanopartícula lipídica puede encapsular uno o más polinucleótidos y la segunda nanopartícula lipídica puede encapsular opcionalmente uno o más polinucleótidos.

En ciertas realizaciones, la primera nanopartícula lipídica mezclada y segunda nanopartícula lipídica comprenden el mismo uno o más polinucleótidos, en donde la expresión de uno o más polinucleótidos por las células diana después de la administración (por ejemplo, por vía intravenosa) de la composición farmacéutica mezclada a un sujeto excede de la suma relativa de la expresión de uno o más polinucleótidos alcanzados por la primera nanopartícula lipídica y la expresión de uno o más polinucleótidos alcanzados por la segunda nanopartícula lipídica cuando la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica se administran al sujeto independientemente la una de la otra. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la expresión de uno o más polinucleótidos por las células diana después de la administración (por ejemplo, por vía intravenosa) de tal composición farmacéutica mezclada a un sujeto puede exceder de la suma relativa de la expresión de uno o más polinucleótidos logrados por la primera nanopartícula lipídica y la expresión de uno o más polinucleótidos alcanzados por la segunda nanopartícula lipídica cuando la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica se administran independientemente al sujeto por al menos aproximadamente dos, cinco, diez, doce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta o más.

En ciertas realizaciones, la primera nanopartícula lipídica mezclada y segunda nanopartícula lipídica comprenden el mismo uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ARNm), en el que la producción de uno o más polipéptidos o proteínas (por ejemplo, una enzima) por las células diana tras la administración (por ejemplo, por vía intravenosa) de la composición farmacéutica mezclada a un sujeto excede de la suma relativa de la producción de uno o más polipéptidos o proteínas (por ejemplo, una enzima) producidas después de la administración de uno o más polinucleótidos logrados por la primera nanopartícula lipídica y el uno o más polipéptidos producidos después del suministro del uno o más polinucleótidos logrados por la segunda nanopartícula lipídica cuando la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica se administran al sujeto independientemente una de la otra. Por ejemplo, en ciertas realizaciones donde los polinucleótidos comprenden ARNm, los polipéptidos producidos después del suministro de tales polinucleótidos a las células diana después de la administración (por ejemplo, por vía intravenosa) de tal composición farmacéutica mezclada a un sujeto pueden exceder de la suma relativa de los

polipéptidos producidos después de la administración de tales polinucleótidos conseguidos por la primera nanopartícula lipídica y los polipéptidos producidos después de la administración de dichos polinucleótidos alcanzados por la segunda nanopartícula lipídica cuando la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica se administran independientemente al sujeto por al menos aproximadamente dos, cinco, diez, doce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta, sesenta, setenta, ochenta, noventa, cien, quinientos, mil veces, o más.

En otra realización, sólo uno de las dos o más nanopartículas lipídicas que comprenden la composición de mezcla comprende o encapsula un polinucleótido. Por ejemplo, cuando las composiciones farmacéuticas comprenden dos nanopartículas lipídicas combinadas, solo la primera nanopartícula lipídica comprende uno o más polinucleótidos mientras que la segunda nanopartícula lipídica no comprende un polinucleótido (es decir, el segundo polinucleótido está vacío). En dicha realización, después de la administración (por ejemplo, por vía intravenosa) de las dos nanopartículas lipídicas primera y segunda combinadas que comprenden la composición farmacéutica para el sujeto, la producción de uno o más polipéptidos o proteínas codificadas por los polinucleótidos encapsulados por una célula diana es mejorada en relación con la producción de uno o más polipéptidos o proteínas observadas cuando la primera nanopartícula lipídica se administra al sujeto independientemente de la segunda nanopartícula lipídica. Por ejemplo, en tal realización, la producción de uno o más polipéptidos o proteínas por las células diana después de la administración de tal composición farmacéutica mezclada a un sujeto excede de la producción de uno o más polipéptidos o proteínas cuando la primera nanopartícula lipídica es administrada al sujeto independientemente de la segunda nanopartícula lipídica por al menos aproximadamente dos, cinco, diez, doce, quince o veinte veces, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta y cien, quinientos, mil veces o más.

Tras contactar con una o más células específicas con las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas descritas en este documento (por ejemplo, mediante la administración por vía intravenosa la composición farmacéutica mezclada a un sujeto) una o más de dichas células diana se transfectan con y pueden expresar uno o más polinucleótidos y/o potenciar la producción de uno o más polipéptidos funcionales o proteínas codificadas por uno o más polinucleótidos. En ciertas realizaciones, el contacto de tales células diana con las nanopartículas lipídicas mezcladas y composiciones farmacéuticas tales que las células diana son transfectadas por uno o más polinucleótidos encapsulados mejora (por ejemplo, aumenta sinérgicamente) la expresión de dichos polinucleótidos y/o aumenta la producción de un producto de proteína o polipéptido funcional que puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad o afección patológica (por ejemplo, enfermedades resultantes de una deficiencia de proteína o enzima). En ciertas realizaciones, tras o después de la transfección mediante las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas descritas aquí, la expresión de los polinucleótidos encapsulados y/o la producción de un polipéptido o proteína funcional por una o más células diana aumenta sinérgicamente, y en particular aumenta sinérgicamente en relación a la expresión de los polinucleótidos y/o producción de un polipéptido o proteína funcional que se observa cuando las nanopartículas lipídicas constituyentes que comprenden la composición mezclada (por ejemplo, la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica) se administran independientemente de la otra. La expresión de los polinucleótidos encapsulados que comprenden la composición mezclada (y/o cuando dichos polinucleótidos comprenden ARNm, la producción de los polipéptidos codificados por tales polinucleótidos encapsulados) puede aumentarse, por ejemplo, en al menos aproximadamente dos, tres, tres., cuatro, cinco, seis, ocho, diez, doce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta o cincuenta veces o más en relación con la expresión de polinucleótido (y/o la producción de polipéptido donde dicho polinucleótido comprende ARNm) que se observa cuando las nanopartículas lipídicas constituyentes que comprenden la formulación mezclada se administran independientemente.

También se describen en este documento procedimientos de modulación o el aumento de la expresión de uno o más polinucleótidos y métodos para aumentar la producción de uno o más polipéptidos funcionales o proteínas en una o más células diana (por ejemplo, células diana de un sujeto al que se administran composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas). Dichos métodos pueden comprender la etapa de administrar o contactar otras células o tejidos diana con una composición farmacéutica que comprende una mezcla de al menos una primera nanopartícula lipídica y una segunda nanopartícula lipídica, donde la primera nanopartícula lipídica comprende uno o más polinucleótidos. Después de la administración o contacto con otras células o tejidos diana con las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas, se transfectan una o más células diana con uno o más polinucleótidos encapsulados en una o más de las nanopartículas lipídicas constituyentes, tal expresión de uno o más polinucleótidos y/o la producción de uno o más polipéptidos o proteínas funcionales aumenta o incrementa sinérgicamente con relación a la expresión de uno o más polinucleótidos o la producción de uno o más polipéptidos o proteínas funcionales cuando la primera nanopartícula lipídica se administra independientemente de la segunda nanopartícula lipídica. En ciertas realizaciones, la expresión de los polinucleótidos encapsulados que comprenden la composición mezclada puede aumentarse, por ejemplo, al menos aproximadamente en dos, cuatro, cinco, diez, doce, quince, veinte o veinticinco, cincuenta, setenta y cinco, cien, doscientos, quinientos, mil veces o más en relación con la expresión observada cuando las nanopartículas lipídicas constituyentes que componen la formulación mezclada se administran independientemente.

También se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden una mezcla de una primera nanopartícula lipídica y una segunda nanopartícula lipídica, en donde la primera

nanopartícula lipídica comprende uno o más polinucleótidos. En ciertas realizaciones, tanto la primera como la segunda nanopartícula lipídica comprenden o encapsulan el mismo o un polinucleótido diferente. Al poner en contacto una o más células diana con la composición farmacéutica, uno o más polinucleótidos encapsulados por las nanopartículas lipídicas constituyentes transfectan las células diana y se expresan, y cuando tales polinucleótidos comprenden ARNm, producen de ese modo un polipéptido o proteína funcional. En ciertas realizaciones, la expresión de uno o más polinucleótidos por las células diana excede de la suma relativa de la expresión de uno o más polinucleótidos logrados por la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica que comprende la composición farmacéutica cuando las células diana se ponen en contacto con la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica independientemente de la otra. En otras realizaciones, la producción de uno o más polipéptidos funcionales por células diana excede de la suma relativa de la producción de uno o más polipéptidos funcionales logrados por la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica que comprende la composición farmacéutica cuando las células diana entran en contacto con la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica independientemente de la otra.

En ciertas realizaciones, la primera nanopartícula lipídica o la segunda nanopartícula lipídica comprende uno o más lípidos catiónicos. Por ejemplo, una o ambas nanopartículas lipídicas primera y segunda pueden incluir uno o más de C12-200, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenilo-3-trimetilamonio propano), DLinDMA, DLin-KC2-DMA, HGT4003 e ICE.

En ciertas realizaciones, la primera nanopartícula lipídica o la segunda nanopartícula lipídica comprenden uno o más lípidos auxiliares. Por ejemplo, una o ambas nanopartículas lipídicas primera y segunda que comprenden las composiciones farmacéuticas combinadas pueden incluir uno o más lípidos auxiliares que se seleccionan del grupo que consiste en DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)) y colesterol.

Del mismo modo, en ciertas realizaciones, la primera nanopartícula lipídica o la segunda nanopartícula lipídica puede comprender uno o más lípidos modificados con PEG. Por ejemplo, una o ambas nanopartículas lipídicas primera y segunda pueden comprender uno o más lípidos modificados con PEG que comprenden una cadena de poli(etileno)glicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido que comprende una o más cadenas de alquilo de C₆-C₂₀ de longitud.

En ciertas realizaciones, uno o más de las al menos dos nanopartículas lipídicas que comprenden los componentes mezclados de la invención se preparan combinando o comprendiendo múltiples componentes lipídicos, no lipídicos y/o poliméricos. Por ejemplo, la primera nanopartícula lipídica o la segunda nanopartícula lipídica pueden comprender DLinDMA, CHOL, DOPE y DMG-PEG-2000. En algunas realizaciones, la primera nanopartícula lipídica o la segunda nanopartícula lipídica comprende C12-200, CHOL, DOPE y DMG-PEG-2000. En algunas realizaciones, la primera nanopartícula lipídica o la segunda nanopartícula lipídica comprende DLinKC2, CHOL, DOPE y DMG-PEG-2000. De forma similar, una o más de la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica pueden comprender uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en ICE, DSPC, CHOL, DODAP, DOTAP y C8-PEG-2000. En otra realización, la primera nanopartícula lipídica o la segunda nanopartícula lipídica comprende ICE, DOPE y DMG-PEG-2000. Todavía en otra realización, la primera nanopartícula lipídica o la segunda nanopartícula lipídica comprende HGT4003, DOPE, CHOL y DMG-PEG-2000.

Las composiciones lipídicas de las dos o más mezclas de nanopartículas lipídicas proporcionadas en este documento son diferentes (por ejemplo, tienen diferentes composiciones lipídicas). Por ejemplo, se contemplan composiciones mezcladas en las que la primera nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico, y en donde la segunda nanopartícula lipídica comprende un lípido catiónico que es diferente del lípido catiónico que comprende la primera nanopartícula lipídica.

También se describen en este documento métodos de potenciar o de otra manera aumentar (por ejemplo, aumentar de forma sinérgica) la administración o la tasa de administración de uno o más polinucleótidos a una o más células diana, así como métodos para mejorar el tiempo de residencia de uno o más polinucleótidos dentro de una célula diana. Tales métodos generalmente comprenden poner en contacto una o más células diana con una composición farmacéutica que comprende una mezcla de al menos dos nanopartículas lipídicas, teniendo cada una una composición lipídica diferente, de manera que la administración de los polinucleótidos (por ejemplo, a una o más células diana, tejidos u órganos) se mejora. Tras la administración de uno o más polinucleótidos (por ejemplo, uno o más oligonucleótidos antisentido) o en las células diana, dicho polinucleótido puede ejercer su función deseada (por ejemplo, modular la expresión de un ácido nucleico diana tal como ARNm). Por ejemplo, un oligonucleótido antisentido puede modular o disminuir (por ejemplo, disminuir sinérgicamente) la expresión de un gen diana o ácido nucleico. Alternativamente, en ciertas realizaciones, después de la administración de los polinucleótidos a las células diana, la producción de un péptido o proteína funcional codificada por dicho polinucleótido aumenta o se incrementa sinérgicamente.

Las composiciones mezcladas y métodos de uso descritos en este documento pueden formularse para dirigirse específicamente y transfectar una o más células diana, tejidos y órganos. Por ejemplo, las células diana contempladas pueden comprender una o más células seleccionadas del grupo que consiste en hepatocitos, células epiteliales, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células pulmonares, células óseas, células madre, células mesenquimales, células neurales, células cardíacas, adipocitos, células musculares lisas vasculares, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células beta, células pituitarias, células del revestimiento sinovial, células ováricas, células testiculares, fibroblastos, células B, células T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos y células tumorales.

[0023] Las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas previstas en este documento y los métodos de uso tales composiciones mezcladas comprenden uno o más polinucleótidos (es decir, ARNm). Dichos polinucleótidos pueden codificar, por ejemplo, un polipéptido funcional, proteína o enzima, y tras ser expresados (por ejemplo, traducidos) por una o más células diana, se produce un producto polipeptídico funcional (por ejemplo, una proteína o enzima), y en algunos casos secretados por la célula diana en la circulación periférica. En ciertas realizaciones, uno o más de los polinucleótidos que comprenden o están encapsulados de otro modo por una o más de las nanopartículas lipídicas constituyentes que comprenden las composiciones mezcladas codifican un polipéptido que es expresado aberrantemente por el sujeto. En ciertas realizaciones, uno o más de los polinucleótidos encapsulados que comprenden las formulaciones de nanopartículas lipídicas mezcladas codifican una enzima funcional tal como una enzima del ciclo de la urea (por ejemplo, transcarbamilasa de ornitina (OTC), sintetasa de carbamoilo-fosfato 1 (CPS1), sintetasa de argininosuccinato (ASS1), liasa de argininosuccinato (ASL) o arginasa 1 (ARG1)). En ciertas realizaciones, uno o más de los polinucleótidos encapsulados comprende ARNm que codifica una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, el polinucleótido encapsulado es ARNm que codifica una o más de las enzimas agalsidasa alfa, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, transferasa de N-acetilglucosamina-1-fosfato, N-acetilglucosaminidasa, acetiltransferasa de alfa-glucosaminida, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, sulfamidasa de heparan, hialuronidasa y galactocerebrosidasa). Alternativamente, en algunas realizaciones, uno o más de los polinucleótidos encapsulados que comprenden las formulaciones de nanopartículas lipídicas mezcladas comprende la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

El uso de ARNm como el polinucleótido también se contemplan por la presente y, en particular el uso de ARNm que comprende una o más modificaciones químicas. En cierta realización, tales modificaciones químicas hacen que el ARNm sea más estable y puede comprender, por ejemplo, una modificación de bloqueo terminal de una región 5' o 3' no traducida del ARNm. En ciertas realizaciones, la modificación química comprende la inclusión de una secuencia parcial de un gen CMV inmediato-temprano 1 (IE1) en la región 5' no traducida del ARNm. En otras realizaciones, la modificación química comprende la inclusión de una cola de poli A en la región 3' no traducida del ARNm. También se contemplan modificaciones químicas que comprenden la inclusión de una estructura Cap1 en la región 5' no traducida del ARNm. En otras realizaciones más, la modificación química comprende la inclusión de una secuencia que codifica la hormona de crecimiento humana (hGH) en la región 3' no traducida del ARNm.

También se describen aquí métodos para la manipulación de la expresión mejorada (por ejemplo, aumento sinérgico) de uno o más polinucleótidos que están encapsulados en uno o más de las primeras o segundas nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones mezcladas y métodos de la manipulación de la producción mejorada de los polipéptidos codificados por uno o más polinucleótidos encapsulados. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la relación relativa de las nanopartículas lipídicas primera y segunda se puede ajustar (por ejemplo, basándose en la masa del polinucleótido encapsulado) para potenciar la expresión de uno o más de los polinucleótidos encapsulados y/o potenciar la producción de uno o más polipéptidos encapsulados por tales polinucleótidos encapsulados. En algunas realizaciones, la relación de uno o más polinucleótidos que comprenden la primera nanopartícula lipídica a uno o más polinucleótidos que comprenden la segunda nanopartícula lipídica en la composición farmacéutica es aproximadamente 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 75:1, 100:1, 125:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:75, 1:100, 1:125 o más. De forma similar, la expresión potenciada (por ejemplo, potenciada sinérgicamente) de uno o más polinucleótidos que están encapsulados en una o más de las nanopartículas lipídicas primera o segunda que comprenden las composiciones mezcladas puede manipularse variando el contenido y las concentraciones relativas de uno o más de los lípidos, no lípidos, lípidos auxiliares y lípidos modificados con PEG que comprenden tales nanopartículas lipídicas. Además, la producción mejorada (por ejemplo, potenciada sinérgicamente) por células diana de uno o más polipéptidos funcionales o proteínas codificadas por polinucleótidos encapsulados en las nanopartículas lipídicas primera o segunda que comprenden las composiciones mezcladas puede manipularse variando el contenido y las concentraciones relativas de uno o más de los lípidos, no lípidos, lípidos auxiliares y lípidos modificados con PEG que comprenden tales nanopartículas lipídicas.

Las mejoras sinérgicas en la expresión de polinucleótidos encapsulados que caracterizan a las formulaciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención y/o la producción sinérgica de polipéptidos codificados por los mismos por una o más células diana permiten concentraciones terapéuticamente eficaces de polinucleótidos producidos (por ejemplo, una proteína terapéutica o enzima) a alcanzar en los tejidos diana (o suero si el producto polipeptídico se excreta por la célula diana) usando una dosis de polinucleótido

significativamente más baja de lo que se había previsto previamente. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la cantidad eficaz de un polinucleótido requerida para lograr un efecto terapéutico deseado se puede reducir encapsulando dicho polinucleótido en una o más nanopartículas lipídicas y mezclando al menos dos nanopartículas lipídicas. Dichos métodos comprenden una etapa de administrar una composición farmacéutica al sujeto, donde la composición farmacéutica comprende una primera nanopartícula lipídica mezclada con una segunda nanopartícula lipídica, y en la que una o ambas nanopartículas lipídicas y la segunda nanopartícula lipídica comprenden el polinucleótido, seguidas mediante la transfección de una o más de las células diana del sujeto con dichos polinucleótidos, de modo que la cantidad del polinucleótido requerida para efectuar un efecto terapéutico se reduce (por ejemplo, se reduce en relación con la cantidad de polinucleótido requerida para efectuar un efecto terapéutico usando una composición no mezclada u otras técnicas estándar). En ciertas realizaciones, la cantidad de un polinucleótido requerida para efectuar un efecto terapéutico se reduce en al menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o 99% con relación a la cantidad de polinucleótido requerida para efectuar un efecto terapéutico usando una composición no mezclada u otras técnicas estándar. En ciertas realizaciones, la cantidad de un polinucleótido requerida para efectuar un efecto terapéutico se reduce al menos en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, diez, doce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta o cincuenta veces o más en relación con la cantidad de polinucleótidos requerida para efectuar un efecto terapéutico utilizando una composición no mezclada u otras técnicas estándar.

Las otras características anteriormente discutidas y muchas ventajas concomitantes de la presente invención se entenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención cuando se toma en conjunción con los ejemplos adjuntos. Las diversas realizaciones descritas en este documento son complementarias y pueden combinarse o usarse juntas de una manera que entienda el experto en la materia en vista de las enseñanzas contenidas en este documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** es un esquema que representa una "mezcla" de formulación, que generalmente se define como una combinación de dos o más formulaciones separadas, no idénticas en una.

La **Figura 2** ilustra la salida de luminiscencia de la proteína luciferasa de luciérnaga en hígados de ratones después del tratamiento con nanopartículas lipídicas de luciferasa de luciérnaga (FFL) encapsuladas en ARNm basadas en diversos lípidos catiónicos. Las dosis de ARNm encapsulada de FFL evaluadas fueron C12-200 (30 µg), DLin-KC2-DMA (90 µg), HGT4003 (200 µg), ICE (200 µg) y DODAP (200 µg). Los dos controles incluían una nanopartícula de lípidos catiónicos basada en C12-200 que encapsulaba un ARNm no fluorescente (dosis de 30 µg) y vehículo PBS. Los valores se representan como RLU/mg mediana de proteína total en hígado cuatro horas después de la administración.

La **Figura 3** ilustra la salida de luminiscencia de la proteína de luciferasa de luciérnaga en hígados de ratones cuatro horas después del tratamiento con nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm de FFL. Las formulaciones comparadas fueron una formulación basada en C12-200 (dosis de 30 µg), una formulación basada en DLin-KC2-DMA (dosis de 90 µg), una formulación única mixta C12-200/DLin-KC2-DMA (dosis de 30 µg) y una mezcla de dos formulaciones separadas basadas en C12-200 y DLin-KC2-DMA. Como se representa en la Figura 3, la formulación mezclada (dosis de 120 µg, relación 1:3 de ARNm de FFL encapsulado en C12-200:ARNm de FFL encapsulado en DLin-KC2-DMA, respectivamente) demostró una mejora sinérgica de la luminiscencia.

La **Figura 4** ilustra una comparación de la producción de luminiscencia de la proteína luciferasa de luciérnaga en hígados de ratón en base a dos proporciones de formulaciones mezcladas. Las formulaciones individuales de HGT4003 e ICE se dosificaron a 100 µg de ARNm de luciferasa de luciérnaga encapsulado (FFL). Las dos formulaciones mezcladas se administraron a una dosis total de 200 µg de ARNm de FFL encapsulado. Los valores se representan como RLU/mg mediana de proteína total en hígado cuatro horas después de la administración.

La **Figura 5** ilustra la comparación de luminiscencia cuando se mezclan formulaciones que encapsulan ARNm fluorescente (FFL) y no fluorescente (GALT). Las formulaciones basadas en C12-200 evaluadas se dosificaron a 30 µg, mientras que las formulaciones basadas en DLinKC2-DMA se dosificaron a 90 µg de ARNm. Las formulaciones mezcladas se dosificaron a 120 µg de ARNm total. Los valores se representan como RLU/mg mediana de proteína total en hígado cuatro horas después de la administración.

La **Figura 6** ilustra la comparación de la luminiscencia de los hígados tratados cuando se mezclan formulaciones encapsulantes fluorescentes (FFL) con nanopartículas lipídicas vacías (sin ARNm). Todas las nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 se dosificaron a 30 µg de ARNm (o equivalente) mientras que las formulaciones basadas en DLin-KC2-DMA se dosificaron a 90 µg de ARNm (o equivalente). Las formulaciones mezcladas se dosificaron a 120 µg de ARNm equivalente. Los valores se representan como RLU/mg mediana de proteína total en hígado cuatro horas después de la administración.

La **Figura 7** ilustra la salida de luminiscencia de la proteína luciferasa de luciérnaga en los tejidos cerebrales de ratones después de la administración intraculovenricular (ICV) de nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL). Las formulaciones comparadas fueron formulaciones basadas en C12-200 (dosis de 0,96 µg) y formulaciones basadas en DLin-KC2-DMA (dosis de 2,87 µg) tanto individualmente como en relación a una mezcla de estas dos formulaciones en una proporción de 1:3 (dosis de 3,83 µg). Los valores se representan como la mediana de RLU/mg de proteína total en el cerebro cuatro horas después de la administración.

La **Figura 8** ilustra una comparación de la proteína de eritropoyetina humana secretada (EPO) después de la administración intravenosa de nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm de EPO. Se tomaron muestras de sangre cuatro horas después de la inyección. Como se ilustra en la FIG. 8, todas las formulaciones demostraron la secreción exitosa de EPO humana por las células diana. Cada formulación mezclada demostró una mejora sinérgica de la producción de proteínas. Las dosis están representadas en la FIG. 8 (entre paréntesis) como microgramos de ARNm de EPO humana encapsulada.

La **Figura 9** ilustra el aumento sinérgico de la producción de proteína cuando se analiza a través de la transferencia Western. Una mezcla de una nanopartícula de lípidos basada en C12-200 cargada con ARNm de EPO humana con una nanopartícula de lípidos cargada con DLin-KC2-DMA muestra una banda fuerte (Lane 4) significativa de proteína EPO humana aislada del suero cuatro horas después de la administración. El carril correspondiente a una formulación individual C12-200 (carril 2) produce una banda detectada moderadamente mientras que la formulación basada en DLinKC2-DMA (Calle 3) es indetectable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación de al menos dos nanopartículas lipídicas, al menos una de las cuales comprende un polinucleótido y métodos relacionados para usar tales composiciones farmacéuticas como un medio altamente eficaz para aumentar la expresión de dicho polinucleótido. También se contemplan composiciones farmacéuticas mezcladas que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican ARNm y métodos relacionados para aumentar la producción del polipéptido o proteína funcional codificada por dicho polinucleótido. Como se usa en este documento, los términos "mezcla" y "mezclado" se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden dos o más nanopartículas lipídicas heterogéneas distintas. Típicamente, las dos o más nanopartículas lipídicas distintas y heterogéneas se combinan en una única composición o formulación farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica mezclada puede comprender una primera nanopartícula lipídica que comprende el lípido catiónico DOTAP y una segunda nanopartícula lipídica que comprende el lípido catiónico ICE. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica mezclada puede comprender una primera nanopartícula lipídica que comprende el lípido catiónico C12-200 y una segunda nanopartícula lipídica que comprende el lípido catiónico DLinKC2DMA. Una ilustración de tal formulación mezclada se representa en la FIG. 1.

Hay que señalar que los términos "combinación" y "combinado" como se usan en el presente documento para describir las composiciones farmacéuticas y formulaciones de la presente invención son distinguibles de los términos "mezcla" o "mezclado", que se utilizan en el presente documento para describir una formulación o composición farmacéutica que incluye solo una única nanopartícula lipídica en la formulación. Por ejemplo, los términos mezcla y mezclado se usan en el presente documento para referirse a una composición farmacéutica que comprende solo una sola población de nanopartículas lipídicas, todas las cuales tienen generalmente la misma o sustancialmente la misma composición lipídica. Esto está en contraste con una formulación mezclada que comprende dos o más nanopartículas lipídicas diferentes. En particular, los términos "mezcla" y "mezclado" se usan generalmente para describir una composición o formulación farmacéutica que incluye una única población homogénea de nanopartículas lipídicas, todas las cuales se sintetizan a partir de una solución orgánica que contiene los mismos lípidos catiónicos y, por ejemplo, cualquier lípido auxiliar adicional o lípidos modificados con PEG.

Las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas se caracterizan por ser capaces de administrarse eficientemente los polinucleótidos encapsulados a las células diana, y también se caracterizan por su capacidad para mejorar la transfección subsiguiente de tales polinucleótidos encapsulados tras contactar una o más células diana. Las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas también se caracterizan por su capacidad de potenciar (por ejemplo, aumentar) la expresión de polinucleótidos encapsulados en las mismas por las células diana. Las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas descritas en la presente memoria también se caracterizan por su capacidad de potenciar (por ejemplo, aumentar) la producción de uno o más polipéptidos o proteínas (por ejemplo, por células diana) codificadas por uno o más polinucleótidos encapsulados en tales composiciones de nanopartículas. Por consiguiente, tales composiciones farmacéuticas de nanopartículas lipídicas mezcladas también son útiles para el tratamiento de enfermedades, y en particular el tratamiento de enfermedades que resultan de la expresión aberrante de genes o productos génicos (por ejemplo, enfermedades asociadas con la producción deficiente de una proteína). Por ejemplo, las enfermedades para las que pueden ser usadas las nanopartículas lipídicas mezcladas y las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas en las que una mutación

genética de un gen particular hace que las células afectadas no expresen, tengan una expresión reducida o expresen un producto no funcional de ese gen. La puesta en contacto de dichas células diana con las nanopartículas lipídicas mezcladas y composiciones farmacéuticas de manera que las células diana sean transfectadas por los polinucleótidos encapsulados aumenta la expresión de tales polinucleótidos y aumenta la producción de una proteína funcional o producto polipeptídico que puede ser útil en el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, enfermedades resultantes de una deficiencia de proteína o enzima).

En ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas mezcladas y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento presentan una mayor capacidad para transfectar una o más células diana. Como se usa en el presente documento, los términos "transfecta" o "transfección" se refieren a la introducción intracelular de un polinucleótido en una célula, o preferiblemente en una célula diana. El polinucleótido introducido puede mantenerse estable o transitoriamente en la célula diana. El término "eficacia de transfección" se refiere a la cantidad relativa de polinucleótido tomada o introducida por la célula diana que está sujeta a transfección. En la práctica, la eficacia de la transfección se estima mediante la cantidad de un producto polinucleotídico informador expresado por las células diana después de la transfección. Las nanopartículas lipídicas mezcladas y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente demuestran altas eficiencias de transfección, y en particular tales mezclas demuestran altas eficiencias de transfección con relación a las eficiencias de transfección de las nanopartículas lipídicas constituyentes individuales que comprenden tales composiciones mezcladas. Las altas eficiencias de transfección observadas por la nanopartícula de lípidos mezclados y las composiciones farmacéuticas pueden minimizar los efectos adversos asociados tanto con los lípidos que comprenden las nanopartículas como con los polinucleótidos encapsulados por dichos lípidos. De acuerdo con esto, las nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención demuestran altas eficiencias de transfección mejorando así la probabilidad de que las dosificaciones apropiadas del polinucleótido se administren al sitio de la patología, mientras que al mismo tiempo se minimizan los posibles efectos adversos sistémicos.

Como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se utilizan indistintamente para referirse al material genético (por ejemplo, ADN o ARN), y cuando se utilizan dichos términos con respecto a las nanopartículas lipídicas generalmente se refieren al material genético encapsulado por tales nanopartículas lipídicas. El polinucleótido puede ser un ARN. El ARN incluye ARNm, siARN, miARN, snARN y snoARN. Los polinucleótidos contemplados también incluyen grandes ARN intergénicos no codificantes (lincARN), que generalmente no codifican proteínas, sino que funcionan, por ejemplo, en señalización inmune, biología de células madre y desarrollo de enfermedades. (Véase, por ejemplo, Guttman, et al., 458:223 - 227 (2009), y Ng, et al., Nature Genetics 42:1035 - 1036 (2010)). Los polinucleótidos de la invención son un ARN o ARN estabilizado que codifica una proteína o enzima (por ejemplo, ARNm que codifica eritropoyetina humana, como se representa en la SEQ ID NO:3). La presente invención contempla el uso de tales polinucleótidos como un agente terapéutico que es capaz de ser expresado por células diana para facilitar de ese modo la producción (y en ciertos casos la excreción) de una enzima o proteína funcional por tales células diana, como se describe por ejemplo, en la Solicitud Internacional N° PCT/US2010/058457 y en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° PCT/US2012/041724 presentada el 8 de junio de 2012. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, tras la expresión de uno o más polinucleótidos por células diana, la producción de una enzima o proteína funcional en la que un sujeto es deficiente (por ejemplo, una enzima del ciclo de la urea o una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosomal) puede ser observada. El término "funcional", como se usa en el presente para calificar una proteína o enzima, significa que la proteína o enzima tiene actividad biológica, o alternativamente es capaz de realizar lo mismo, o una función similar a la proteína o enzima nativa o que funciona normalmente.

También se contemplan en el presente documento nanopartículas lipídicas mezcladas, composiciones farmacéuticas y métodos relacionados para la modulación de la expresión de un polinucleótido y/o para modular (por ejemplo, aumentar) la producción de un polipéptido funcional o proteína (por ejemplo, una enzima) codificada por tales polinucleótidos en una o más células diana y tejidos. En el contexto de la presente invención, el término "expresión" se usa en su sentido más amplio para referirse a la transcripción de un gen o polinucleótido específico en al menos un transcrito de ARNm, o la conversión de al menos un ARNm o polinucleótido a un polipéptido (por ejemplo, una proteína o enzima funcional). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas mezcladas comprenden al menos una primera y una segunda nanopartícula lipídica, al menos una de las cuales comprende un polinucleótido (por ejemplo, ARNm) que codifica una proteína o enzima funcional. En el contexto de polinucleótidos que comprenden o codifican ARNm, el término expresión se refiere a la conversión de dicho ARNm (por ejemplo, por las células diana) para producir el polipéptido o proteína codificada por el mismo. En el contexto de un oligonucleótido antisentido encapsulado en una o más de las composiciones de nanopartículas lipídicas descritas en la presente memoria, el término "expresión" puede usarse con referencia a uno o más genes diana o ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm). Por ejemplo, cuando se ha preparado un oligonucleótido antisentido encapsulado para que sea complementario a un fragmento de un ARNm endógeno diana expresado por una célula, el término "expresión" puede usarse con referencia a dicho ARNm endógeno (p. ej., el oligonucleótido antisentido encapsulado puede reducir la expresión de dicho ARNm dirigido).

También se proporcionan nanopartículas lipídicas mezcladas y composiciones farmacéuticas para modular la expresión de los ácidos nucleicos expresados de forma aberrante y polinucleótidos en una o más células diana y

tejidos. En ciertas realizaciones, tales nanopartículas lipídicas mezcladas comprenden al menos una primera nanopartícula lipídica y una segunda nanopartícula lipídica, una o ambas de las cuales pueden encapsular un polinucleótido. Las nanopartículas lipídicas mezcladas pueden comprender, por ejemplo, uno o más polinucleótidos encapsulados en una primera nanopartícula lipídica que se mezcla con una o más nanopartículas lipídicas diferentes (es decir, una segunda o tercera nanopartícula lipídica) que opcionalmente pueden encapsular uno o más polinucleótidos. Dichas formulaciones de nanopartículas lipídicas mezcladas demuestran una expresión mejorada de uno o más polinucleótidos encapsulados de ese modo en relación con la expresión de los mismos polinucleótidos observados después de la administración de una única nanopartícula lipídica (por ejemplo, la primera nanopartícula lipídica). De manera similar, tales formulaciones de nanopartículas lipídicas mezcladas pueden demostrar una producción mejorada de uno o más polipéptidos (por ejemplo, una enzima funcional) codificados por un polinucleótido encapsulado en relación con la producción de los mismos polipéptidos observados después de la administración de una única nanopartícula lipídica (por ejemplo, la primera nanopartícula lipídica). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas mezcladas y las composiciones farmacéuticas son capaces de aumentar la expresión de polinucleótidos encapsulados, y/o la producción de los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos encapsulados, en una célula diana en al menos aproximadamente diez veces, veinte veces, treinta veces, cuarenta y cinco veces, cincuenta veces, sesenta veces, setenta veces, cien veces, quinientas veces, mil veces o más en relación con la expresión de polinucleótido o producción de polipéptido observado cuando la célula diana se pone en contacto con tales polinucleótidos encapsulados en una única nanopartícula lipídica.

También se describen métodos para mejorar (por ejemplo, aumentar) la expresión de un polinucleótido y métodos de aumento de la producción y secreción de un producto polipéptido funcional en las células diana y tejidos (por ejemplo, hepatocitos). En algunas realizaciones, las células o tejidos diana expresan de manera aberrante el polinucleótido encapsulado por una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica mezclada. También se describen en el presente documento métodos para aumentar la expresión de uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) y métodos para aumentar la producción y/o secreción de uno o más polipéptidos (por ejemplo, una enzima funcional) en una o más células diana, tejidos y órganos. Generalmente, dichos métodos comprenden poner en contacto las células diana con una composición farmacéutica que comprende una mezcla de al menos dos nanopartículas basadas en lípidos (por ejemplo, una primera y una segunda nanopartícula lipídica), en donde al menos una de tales nanopartículas basadas en lípidos comprende o encapsula de otro modo uno o más polinucleótidos.

También se describen en este documento métodos y composiciones para mejorar (por ejemplo, aumentar) o de otra manera modular la expresión de uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) y/o mejorar (por ejemplo, aumentar) o de otro modo modular la producción y secreción de los polipéptidos o proteínas codificadas de ese modo en las células diana de un sujeto. Tales métodos comprenden generalmente la etapa de administrar (por ejemplo, administrar por vía intravenosa) una composición farmacéutica mezclada a un sujeto en la que dicha composición farmacéutica comprende al menos dos nanopartículas lipídicas mezcladas (por ejemplo, una primera y una segunda nanopartícula lipídica), al menos una de las cuales encapsula o de otra forma comprende uno o más polinucleótidos. En ciertas realizaciones, la etapa de administrar la composición farmacéutica mezclada a un sujeto facilita el contacto de las nanopartículas lipídicas mezcladas con las células y tejidos diana, el resultado de lo cual es una expresión potenciada (por ejemplo, aumentada) de los polinucleótidos encapsulados y producto potenciado (por ejemplo, aumentado) del polipéptido codificado por tales polinucleótidos encapsulados por las células y tejidos diana contactados. Al utilizarse el término "potenciado" en este documento para describir la actividad de nanopartículas lipídicas mezcladas, debe observarse que dicha mejora generalmente se determina con relación a la suma del efecto observado o producido por los miembros constituyentes que comprenden la formulación de nanopartículas lipídicas mezcladas. Por ejemplo, la expresión mejorada de un polinucleótido y/o la producción o secreción aumentada de un polipéptido que se observa después de la administración de una formulación de nanopartículas lipídicas mezcladas que comprende dos nanopartículas lipídicas diferentes designadas como "A" y "B", en donde solo la nanopartícula lipídica "A" encapsula el polinucleótido, se mejora en relación con la suma de la expresión de polinucleótido y/o la producción o la secreción del polipéptido observado por "A" y "B" cuando se administran independientemente el uno del otro.

Los presentes inventores han descubierto que, en ciertas realizaciones, la expresión de los polinucleótidos (y la correspondiente producción y/o secreción de un polipéptido codificado por los polinucleótidos que comprenden ARNm) observados cuando tales polinucleótidos se administran en una composición de nanopartículas a base de lípidos mezclados se mejora y en muchos casos excede (por ejemplo, a aproximadamente dos, tres, cuatro, cinco, diez, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta, sesenta, setenta y ochenta, cien, doscientos veces o más) la expresión (y la producción y/o secreción correspondiente de un polipéptido donde dichos polinucleótidos comprenden ARNm) observada cuando dichos polinucleótidos se administran usando cada uno de los dos o más compuestos independientes constituyentes de nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas de nanopartículas lipídicas mezcladas. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas mezcladas (por ejemplo, una única composición farmacéutica que comprende dos nanopartículas lipídicas separadas, no idénticas) demuestran un aumento sinérgico (es decir, no aditivo) en la expresión de los polinucleótidos encapsulados en las dos o más nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica y un aumento sinérgico (es decir, no aditivo) en la producción y/o secreción de los polipéptidos codificados por dichos

polinucleótidos encapsulados cuando dichos polinucleótidos comprenden ARNm. El aumento sinérgico es evidente con respecto a la expresión total aditiva de dichos polinucleótidos (o la producción total aditiva de polipéptidos codificados por polinucleótidos que comprenden ARNm), que se observa cuando cada una de las nanopartículas lipídicas constituyentes que comprenden la composición farmacéutica combinada se administran individualmente.

Los aumentos sinérgicos observados en la expresión de polinucleótidos encapsulados (y/o producción de polipéptido codificado por polinucleótidos que comprenden ARNm) son evidentes a través de una variedad de nanopartículas lipídicas y a diversas relaciones de tales nanopartículas lipídicas mezcladas. Además, la expresión potenciada observada de polinucleótidos encapsulados en al menos una de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas combinadas (y la correspondiente producción de los polipéptidos codificados por polinucleótidos encapsulados que comprenden ARNm) puede variar de aproximadamente 1,5 a 25 aumentos, o más en comparación con la suma de la expresión (o cuando sea aplicable la producción y/o secreción) observada en las nanopartículas lipídicas constituyentes que comprenden tales composiciones farmacéuticas mezcladas, demostrando así la mezcla de dos o más nanopartículas lipídicas separadas (al menos una de las cuales encapsula un polinucleótido) permite mecánicamente la mayor expresión de dichos polinucleótidos, que a su vez corresponde a una mayor producción del producto codificado, en comparación con las nanopartículas lipídicas separadas que comprenden dicha composición farmacéutica combinada.

El mecanismo de este aumento sinérgico en la producción de proteínas aún no se ha dilucidado. Sin querer limitarse a ninguna teoría en particular, las posibles explicaciones incluyen, por ejemplo, rutas no competitivas o mecanismos de entrada celular por cada una de las formulaciones de nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica combinada, la combinación de diferentes mecanismos de tráfico intracelular (p. ej., proton-sponge vs. fusogenicidad), la combinación de propiedades de liberación del fármaco con propiedades de liberación endosomal y/o la modulación de vías inhibitorias activas que permiten una mayor absorción de nanopartículas.

Las composiciones farmacéuticas mezcladas, y, en particular, las nanopartículas lipídicas constituyentes que comprenden tales composiciones mezcladas, son capaces de suministrar polinucleótidos de diferentes tamaños a sus células o tejidos diana. En ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas de la presente invención son capaces de administrar secuencias de polinucleótidos grandes (por ejemplo, polinucleótidos de al menos 1 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 12 kb, 15 kb, 20 kb, 25 kb, 30 kb o más).

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas mezcladas y los polinucleótidos encapsulados comprendidos en ellas se pueden formular con uno o más excipientes aceptables o reactivos para facilitar la administración de tales polinucleótidos a las células, tejidos y órganos destinados o dirigidos. Los reactivos y excipientes apropiados pueden seleccionarse generalmente con respecto a una serie de factores, que incluyen, entre otras cosas, las propiedades biológicas o químicas de los polinucleótidos (por ejemplo, la carga), la vía de administración prevista, el entorno biológico anticipado al que dichos polinucleótidos estarán expuestos y las propiedades específicas de las células diana y tejidos pretendidos. En algunas realizaciones, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica mezclada demuestran una unión preferencial y/o sustancial a una célula diana con respecto a las células no diana. En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas que comprenden la formulación farmacéutica combinada, y en particular las nanopartículas lipídicas que encapsulan uno o más polinucleótidos, liberan sus contenidos a la célula diana de modo que los polinucleótidos se administran al compartimento subcelular apropiado, tal como el citoplasma, y puede expresarse en consecuencia, de manera que, en ciertas realizaciones, uno o más polipéptidos funcionales (por ejemplo, una proteína funcional) se produce y/o excreta por la célula diana.

Las composiciones farmacéuticas mezcladas comprenden dos o más nanopartículas lipídicas separadas (por ejemplo, una primera nanopartícula lipídica que comprende HGT4003, DOPE, colesterol y mezcla DMG-PEG2K con una segunda nanopartícula lipídica que comprende ICE, DOPE y DMG-PEG2K). La primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica que comprenden la composición farmacéutica combinada pueden encapsular cada uno de los mismos uno o más polinucleótidos. Un aumento sinérgico en la expresión de uno o más polinucleótidos por las células diana después de la administración de la composición farmacéutica mezclada a un sujeto excede de la suma relativa de la expresión de uno o más polinucleótidos logrados por la primera nanopartícula lipídica y la expresión de uno o más polinucleótidos logrados por la segunda nanopartícula lipídica cuando la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica se administran al sujeto de forma independiente. De forma similar, en ciertas realizaciones un aumento sinérgico en la producción de uno o más polipéptidos funcionales codificados por uno o más polinucleótidos encapsulados por las células diana después de la administración de la composición farmacéutica mezclada a un sujeto excede de la suma relativa de la producción del uno o más polipéptidos funcionales logrados por la primera nanopartícula lipídica y la producción de uno o más polipéptidos logrados por la segunda nanopartícula lipídica cuando la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica se administran al sujeto de forma independiente. Alternativamente, en ciertas realizaciones, solo una de las nanopartículas lipídicas (por ejemplo, las primeras nanopartículas lipídicas) que comprende la composición farmacéutica combinada encapsula uno o más polinucleótidos.

En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas mezcladas y composiciones farmacéuticas mezcladas son capaces de aumentar la expresión de uno o más polinucleótidos independientemente de si algunas o todas las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica mezclada encapsulan uno o más polinucleótidos. En particular, las nanopartículas lipídicas mezcladas que comprenden una primera nanopartícula lipídica que encapsula un polinucleótido y una segunda nanopartícula lipídica vacía (es decir, que no encapsulan un polinucleótido) son capaces de potenciar sinérgicamente la expresión de dichos polinucleótidos (por ejemplo, aumentan la expresión alrededor de dos, cuatro, cinco, diez, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta, cien, doscientos, mil veces o más). Por consiguiente, en el contexto de la presente invención, al menos uno de los componentes de nanopartículas lipídicas liposomales de la formulación mezclada sirve para transportar el polinucleótido a la célula diana. En algunas realizaciones, dos de los al menos dos componentes de nanopartículas lipídicas de la formulación mezclada sirven para transportar uno o más polinucleótidos a la célula diana. Al poner en contacto las células diana, dichas composiciones farmacéuticas combinadas demuestran un aumento en la expresión del polinucleótido encapsulado (por ejemplo, en al menos aproximadamente dos, cinco, diez o veinte veces) y, en ciertas realizaciones, de ese modo aumenta la producción de un polipéptido funcional codificado por dicho polinucleótido encapsulado.

Como se utiliza en el presente documento, la frase "nanopartículas lipídicas" se refiere a una vesícula o vehículo que comprende uno o más lípidos (por ejemplo, catiónicos y/o lípidos no catiónicos). Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen, por ejemplo, los lípidos catiónicos tales como C12-200, ICE, DLin-KC2-DMA, DOPE, DMG-PEG-2000, HGT4003, lípidos no catiónicos, lípidos basados en colesterol, lípidos auxiliares, lípidos modificados por PEG, así como los compuestos de fosfatidilo (por ejemplo, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos) y combinaciones o mezclas de los anteriores. Las composiciones farmacéuticas mezcladas descritas en este documento comprenden al menos dos o más de las nanopartículas lipídicas, cada una de las cuales tiene una composición lipídica diferente. Dichas dos o más nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones mezcladas se denominan aquí "primera nanopartícula lipídica", "segunda nanopartícula lipídica", "tercera nanopartícula lipídica", y así sucesivamente. Las designaciones de, por ejemplo, la primera y la segunda nanopartículas lipídicas se hacen con el fin de distinguir las diferentes nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas combinadas y no están destinadas a limitar el número de diferentes nanopartículas lipídicas que comprenden tales composiciones farmacéuticas combinadas.

También se contempla el uso de composiciones farmacéuticas mezcladas que comprenden una o más nanopartículas lipídicas que comprenden uno o más lípidos catiónicos. Como se usa en este documento, la frase "lípido catiónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que llevan una carga neta positiva a un pH seleccionado, tal como el pH fisiológico. Las nanopartículas lipídicas contempladas se pueden preparar incluyendo mezclas de lípidos multicomponente de proporciones variables que emplean uno o más lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos modificados con PEG. En ciertas realizaciones, cada una de la primera y la segunda nanopartículas lipídicas que comprenden las formulaciones farmacéuticas combinadas comprenden uno o más lípidos catiónicos. De manera similar, también se contemplan composiciones farmacéuticas combinadas que comprenden dos o más nanopartículas lipídicas separadas, en donde tales nanopartículas lipídicas comprenden lípidos catiónicos que tienen cada uno diferentes composiciones lipídicas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la primera y la segunda nanopartículas lipídicas comprenden cada una un lípido catiónico diferente (por ejemplo, la primera nanopartícula lipídica comprende ICE y la segunda nanopartícula lipídica comprende DLin-KC2-DMA).

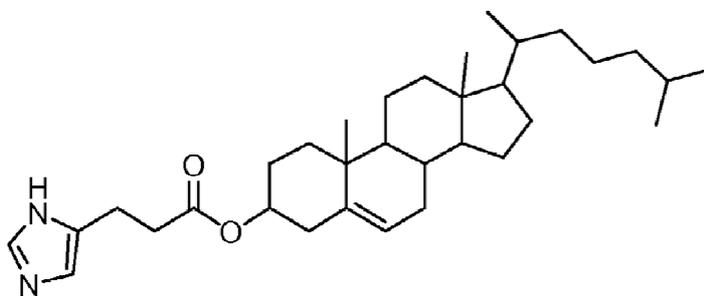
Varios lípidos catiónicos se han descrito en la bibliografía, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Los lípidos catiónicos pueden incluir, pero no están limitados a, ALNY-100 ((3aR, 5s, 6aS)-N,N-dimetilo-2,2-di((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-di-enilo)tetrahydro-3aH-ciclopenta[d] [1,3]dioxol-5-amina)), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), HGT4003 (WO 2012/170889), HGT5000 (Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. 61/617.468) o HGT5001 (cis o trans) (Solicitud de Patente Provisional N° 61/617.468), lipíoides de aminoalcohol tales como los descritos en WO2010/053572, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenilo-3-trimetilamonio propano), DLinDMA (1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano) (Heyes, y col., J. Contr. Rel. 107:276-287 (2005)), DLin-KC2-DMA (Semple, y col., Nature Biotech., 28:172-176 (2010)), C12-200 (Love, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 107:1864 - 1869 (2010)), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propilo]-N,N,N-trimetilamonio. (Felgner y otros (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987), Patente de los Estados Unidos N° 4.897.355). DOTMA se puede formular solo o se puede combinar con dioleilfosfatidiletanolamina o "DOPE" u otros lípidos catiónicos o no catiónicos en una nanopartícula lipídica. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, 5-carboxiespermilglicinadiocadecilamida o "DOGS", 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetilo-1-propanamino o "DOSPA" (Behr y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982(1989), Patente de los Estados Unidos N° 5.171.678, Patente de los Estados Unidos N° 5.334.761), 1,2-Dioleil-3-Dimetilamonio-Propano o "DODAP", 1,2-Dioleil-3-Trimetilamonio-Propano o "DOTAP". Los lípidos catiónicos contemplados también incluyen 1,2-disteariloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilo-3-aminopropano o "DLenDMA", cloruro de N-dioleil-N,N-dimetilamonio o "DODAC", N,N-distearilo-N,N-bromuro de dimetilamonio o "DDAB", N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-ilo)-N,N-dimetilo-N-hidroxietilo amonio 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-dimeti 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-Dilinoleoiloxi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-Dilinoleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-Dilinoleoilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoleilo-4-dimetilaminometilo-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-DMA", 2,2-dilinoleilo-4-dimetilaminoetilo-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA", o mezclas de los mismos. (Heyes, J., y col., J Controlled Release 107:276-287 (2005); Morrissey, DV., y col., Nat. Biotechnol. 23 (8):1003-1007 (2005); publicación PCT WO2005/121348A1).

El uso de lípidos catiónicos basados en colesterol para formular las nanopartículas lipídicas mezcladas también se contempla por la presente invención. Dichos lípidos catiónicos basados en colesterol pueden usarse, solos o en combinación con otros lípidos catiónicos o no catiónicos. Los lípidos catiónicos adecuados basados en colesterol incluyen, por ejemplo, DC-Chol (N,N-dimetilo-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis (3-N-oleilamino-propilo)piperazina (Gao, y col., Biochem. Biophys Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf y col., BioTechniques 23, 139 (1997), Patente de los Estados Unidos Nº 5.744.335).

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

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



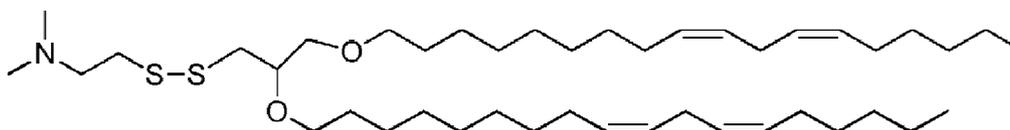
(I)

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

Los lípidos catiónicos a base de imidazol también se caracterizan por su toxicidad reducida en relación con otros lípidos catiónicos. En algunas realizaciones, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica combinada comprenden un lípido catiónico basado en imidazol tal como ICE, para reducir la concentración relativa de otros lípidos catiónicos más tóxicos en dicha composición farmacéutica mezclada. Los lípidos catiónicos basados en imidazol (por ejemplo, ICE) se pueden usar como el único lípido catiónico en una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las formulaciones mezcladas, o alternativamente se pueden combinar con lípidos catiónicos tradicionales (p. ej., DOPE, DC-Chol), lípidos no catiónicos, lípidos modificados con PEG y/o lípidos auxiliares. El lípido catiónico puede comprender una relación molar de aproximadamente 1% a aproximadamente 90%, aproximadamente 2% a aproximadamente 70%, aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 40% del lípido total presente en la nanopartícula lipídica, o preferiblemente de aproximadamente 20% a aproximadamente 70% del lípido total presente en la nanopartícula

lipídica.

Del mismo modo, ciertas formas de realización están dirigidas a nanopartículas lipídicas que comprenden el lípido catiónico HGT4003 2-((2,3-Bis ((9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propilo)disulfanilo)-N,N-dimetiletanamina, como se representa por la estructura (II) a continuación, y como se describe adicionalmente en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N°: PCT/US2012/041663, presentada el 8 de junio de 2012:



(II)

En otras realizaciones las composiciones y métodos descritos en este documento están dirigidos a nanopartículas lipídicas que comprenden uno o más lípidos escindibles, tales como, por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos o compuestos que comprenden un grupo funcional de disulfuro escindible (SS) (por ejemplo, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y HGT4005), como se describe adicionalmente en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° PCT/US2012/041663.

El uso y la inclusión de fosfolípidos modificados por PEG de polietilenglicol y lípidos derivatizados tales como ceramidas derivatizadas (PEG-Cer), incluyendo N-octanolo-esfingosina-1-[succinilo(polietilenglicol de metoxi)-2000] (Ceramide C8 PEG-2000) también se contempla mediante las formulaciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención, ya sea solos o preferiblemente en combinación con otras formulaciones lipídicas que comprenden una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden una composición farmacéutica mezclada. Lípidos modificados por PEG contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unido covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud C₆-C₂₀. La adición de dichos componentes puede evitar la agregación compleja y también puede proporcionar un medio para aumentar la duración de la circulación y aumentar el suministro de la composición de lípido-polinucleótido a los tejidos diana, (Klibanov y otros (1990) FEBS Letters, 268 (1):235-237), o se pueden seleccionar para que se intercambien rápidamente fuera de la formulación *in vivo* (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.885.613). Los lípidos intercambiables particularmente útiles son PEG-ceramidas que tienen cadenas de acilo más cortas (por ejemplo, C14 o C18). El fosfolípido modificado con PEG y los lípidos derivatizados de las composiciones de la presente invención pueden comprender una relación molar de aproximadamente 0% a aproximadamente 20%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, o aproximadamente 2% del lípido total presente en una nanopartícula lipídica liposómica.

Mientras que los vehículos basados en lípidos y sus lípidos componentes presentan medios prometedores para la administración de su contenido de polinucleótidos intracelularmente, la utilidad de muchos lípidos (y, en particular lípidos catiónicos) puede estar limitada por su citotoxicidad asociada. Esto es particularmente cierto para la LIPOFECTINA, cuyo componente DOTMA no se degrada fácilmente *in vivo* y es tóxico para las células y los tejidos. Las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención proporcionan medios para reducir las toxicidades asociadas con los lípidos, y en particular la toxicidad asociada con los lípidos catiónicos. En ciertas realizaciones, la mejora sinérgica en la expresión de polinucleótidos encapsulados observada con el uso de las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención puede corresponder a cantidades reducidas de lípidos (y en particular lípidos tóxicos) necesarios para efectuar la transfección de una cantidad efectiva de tales polinucleótidos a una o más células diana. Por consiguiente, también se contemplan aquí métodos para mediar, reducir o eliminar la toxicidad asociada con uno o más lípidos y, en particular, uno o más lípidos catiónicos. Por ejemplo, la cantidad de lípido catiónico requerida para efectuar la transfección de una cantidad eficaz de uno o más polinucleótidos en una o más células diana se puede reducir incorporando dicho lípido catiónico en una primera composición de nanopartículas lipídicas y mezclando dicha primera composición de nanopartículas lipídicas con una segunda nanopartícula lipídica. La expresión mejorada del polinucleótido observado con el uso de dicha composición de nanopartículas lipídicas mezcladas puede permitir una reducción correspondiente en la cantidad de dicho lípido requerida para efectuar la transfección de una cantidad eficaz de uno o más de tales polinucleótidos en dicha una o más células diana. En ciertas cantidades, la toxicidad de uno o más lípidos se reduce en al menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% o alternativamente se elimina.

La presente invención también contempla el uso de lípidos no catiónicos en una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las formulaciones combinadas. Como se usa en el presente documento, la

frase "lípidos no catiónicos" se refiere a cualquier lípido neutro, zwitteriónico o aniónico. Como se usa en este documento, la frase "lípidos aniónicos" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que llevan una carga neta negativa a un pH seleccionado, tal como el pH fisiológico. Los lípidos no catiónicos incluyen, pero no se limitan a, diesteoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometilo)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), etanolamina de fosfatidilo de dipalmitoil (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diesteoilfosfatidilo-etanolamina (DSPE), 16-O-monometilo PE, 16-O-dimetilo PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (SOPE), colesterol, o una mezcla de los mismos. Tales lípidos no catiónicos se pueden usar solos, pero se usan preferiblemente en combinación con otros excipientes, por ejemplo, lípidos catiónicos. Cuando se usan en combinación con un lípido catiónico, el lípido no catiónico puede comprender una relación molar de 5% a aproximadamente 90%, o preferiblemente de aproximadamente 10% a aproximadamente 70% del lípido total presente en la nanopartícula lipídica.

También se contempla la inclusión de polímeros en las nanopartículas lipídicas que comprenden la formulación farmacéutica mezclada. Los polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliácridatos, poliácridilatos, polilactida, copolímeros de polilactida-poliglicolida, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas y polietilimina.

En ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas se formulan parcialmente en base a su capacidad para facilitar la transfección de un polinucleótido a una célula diana. En otra realización, las nanopartículas lipídicas pueden seleccionarse y/o prepararse para optimizar la administración de polinucleótidos a una célula diana, tejido u órgano. Por ejemplo, si la célula diana es un hepatocito, las propiedades de la nanopartícula lipídica (p. ej., tamaño, carga y/o pH) pueden optimizarse para administrar eficazmente dicha nanopartícula lipídica a la célula u órgano diana, reducir el aclaramiento inmunitario y/o promover retención en ese órgano objetivo. Alternativamente, si el tejido objetivo es el sistema nervioso central, la selección y preparación de la nanopartícula lipídica debe considerar la penetración y la retención dentro de la barrera hematoencefálica y/o el uso de medios alternativos para administrar directamente tales nanopartículas lipídicas a dicho tejido diana (por ejemplo, administración intracerebrovascular). En ciertas realizaciones, las composiciones mezcladas o sus nanopartículas lipídicas constituyentes se pueden combinar con agentes que facilitan la transferencia de polinucleótidos encapsulados (por ejemplo, agentes que alteran o mejoran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y de ese modo mejoran la transferencia de tales polinucleótidos encapsulados a las células diana). Si bien las nanopartículas lipídicas pueden facilitar la introducción de polinucleótidos en células diana, la adición de policationes (por ejemplo, poli-L-lisina y protamina) a las nanopartículas lipídicas o las composiciones farmacéuticas combinadas como un copolímero también puede facilitar, y en algunos casos mejorar notablemente la eficiencia de transfección de varios tipos de liposomas catiónicos por 2-28 veces en varias líneas celulares tanto *in vitro* como *in vivo*. (Véase N.J. Caplen, y col., Gene Ther. 1995; 2:603; S. Li, y col., Gene Ther. 1997; 4, 891).

Para los fines de la presente invención, al menos una de las nanopartículas lipídicas (por ejemplo, la primera nanopartícula lipídica) que comprende la composición farmacéutica mezclada se prepara para encapsular el o los polinucleótidos deseados. En algunas realizaciones, todas las nanopartículas lipídicas que comprenden una composición farmacéutica mezclada se preparan para encapsular uno o más polinucleótidos. Por ejemplo, la primera y la segunda nanopartículas lipídicas combinadas que comprenden la composición mezclada pueden encapsular cada una de los mismos polinucleótidos (por ejemplo, ARNm que codifica una enzima deficiente), o alternativamente pueden encapsular cada una un polinucleótido diferente. El proceso de incorporación de un polinucleótido deseado (por ejemplo, ARNm) en un liposoma o una nanopartícula lipídica se denomina aquí como "carga" o "encapsulación" (Lasic, et al., FEBS Lett., 312:255-258, 1992). Los polinucleótidos encapsulados o nanopartículas lipídicas pueden estar total o parcialmente localizados en el espacio interior de la nanopartícula lipídica, dentro de la membrana bicapa de la nanopartícula lipídica, o asociadas con la superficie exterior de la nanopartícula lipídica.

La carga o encapsulación de un polinucleótido en una nanopartícula de lípidos puede servir para proteger el polinucleótido a partir de un medio ambiente que puede contener enzimas o productos químicos (por ejemplo, suero) que degradan polinucleótidos y/o sistemas o receptores que causan la rápida excreción de los polinucleótidos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas seleccionadas que comprenden las composiciones farmacéuticas combinadas son capaces de potenciar la estabilidad del (de los) polinucleótido(s) encapsulado(s), particularmente con respecto a los entornos en los que dichos polinucleótidos estarán expuestos. Encapsular los polinucleótidos en una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas combinadas también facilita la administración de dichos polinucleótidos en las células y tejidos diana. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas pueden permitir que el polinucleótido encapsulado alcance la célula diana o puede permitir preferentemente que el polinucleótido encapsulado alcance las células u órganos diana de forma discriminatoria (p. ej., las nanopartículas lipídicas pueden concentrarse en el hígado o el bazo de un sujeto al que se administra la composición mezclada). Alternativamente, las nanopartículas lipídicas pueden limitar el suministro de polinucleótidos encapsulados a otras células u órganos no dirigidos donde la presencia de los polinucleótidos encapsulados puede ser indeseable o de utilidad limitada.

Preferiblemente, las nanopartículas lipídicas se preparan mediante la combinación de múltiples componentes de lípidos y/o polímeros. Por ejemplo, se puede preparar una nanopartícula lipídica usando ceramida DSPC/CHOL/DODAP/C8-PEG-5000 en una relación molar de aproximadamente 1 a 50:5 a 65:5 a 90:1 a 25, respectivamente. Una nanopartícula lipídica puede estar compuesta de combinaciones de lípidos adicionales en diversas relaciones, que incluyen, por ejemplo, DSPC/CHOL/DODAP/mPEG-5000 (por ejemplo, combinadas en una relación molar de aproximadamente 33:40:25:2), DSPC/CHOL/DODAP/C8 PEG-2000-Cer (por ejemplo, combinadas en una relación molar de aproximadamente 31:40:25:4), POPC/DO-DAP/C8-PEG-2000-Cer (por ejemplo, combinadas en una relación molar de aproximadamente 75-87:3-14:10) o DSPC/CHOL/DOTAP/C8 PEG-2000-Cer (por ejemplo, combinadas en una relación molar de aproximadamente 31:40:25:4). La selección de lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y/o lípidos modificados con PEG que comprenden las nanopartículas lipídicas, así como la relación molar relativa de dichos lípidos entre sí, se basa en las características del lípido seleccionado, la naturaleza de las células o tejidos diana pretendidos y las características de los polinucleótidos que debe suministrar la nanopartícula lipídica. Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena alquílica, así como el tamaño, la carga, el pH, la pKa, la fusiogenicidad y la toxicidad del lípido seleccionado.

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

En ciertas realizaciones, las composiciones de mezcla de la presente invención comprenden una nanopartícula de lípidos en donde el polinucleótido (por ejemplo, ARNm que codifica OTC) se asocia en la superficie de la nanopartícula de lípidos (por ejemplo, un liposoma) y se encapsula dentro de la misma nanopartícula lipídica. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, los lípidos catiónicos que comprenden las nanopartículas lipídicas pueden asociarse con los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) a través de interacciones electrostáticas con dicho ARNm terapéutico.

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

Durante la preparación de nanopartículas lipídicas liposómicas, agentes portadores solubles en agua pueden ser también encapsulados en el interior acuoso mediante su inclusión en la solución hidratante, y las moléculas lipófilas pueden incorporarse en la bicapa lipídica por la inclusión en la formulación de lípidos. En el caso de ciertas moléculas (por ejemplo, polinucleótidos lipófilos catiónicos o aniónicos), la carga del polinucleótido en nanopartículas lipídicas preformadas o liposomas puede realizarse, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la patente de EE.UU. N° 4.946.683. Después de la encapsulación del polinucleótido, las nanopartículas lipídicas pueden procesarse para eliminar el ARNm no encapsulado a través de procesos tales como la cromatografía en gel, la diafiltración o la ultrafiltración. Por ejemplo, si es deseable eliminar un polinucleótido unido externamente de la superficie de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas combinadas, tales nanopartículas lipídicas pueden someterse a una columna de Dietilaminoetilo SEPHACEL.

Además del polinucleótido encapsulado, uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico pueden incluirse o encapsularse en las nanopartículas lipídicas. Por ejemplo, tales agentes terapéuticos adicionales pueden estar asociados con la superficie de la nanopartícula lipídica, pueden incorporarse en la bicapa lipídica de la nanopartícula lipídica por inclusión en la formulación lipídica o carga en nanopartículas lipídicas preformadas (véanse las patentes de Estados Unidos N° 5.194.654 y 5.223.263).

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

Una variedad de métodos alternativos conocidos en la técnica está disponible para el dimensionamiento de una población de nanopartículas lipídicas. Uno de tales métodos de dimensionamiento se describe en la patente de EE.UU. N° 4.737.323. El sonido de una suspensión de liposomas o nanopartículas lipídicas mediante sonicación en baño o sonda produce una reducción progresiva de tamaño hasta una ULV pequeña de menos de aproximadamente 0,05 micrómetros de diámetro. La homogeneización es otro método que depende de la energía de corte para fragmentar los liposomas grandes en los más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, se recirculan MLV a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrómetros. El tamaño de las nanopartículas lipídicas se puede determinar por dispersión de luz cuasi eléctrica (QELS) como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10:421- 450 (1981). El diámetro promedio de las nanopartículas lipídicas puede reducirse mediante la sonicación de las nanopartículas lipídicas formadas. Los ciclos intermitentes de sonicación pueden alternarse con la evaluación QELS para guiar la síntesis eficiente de liposomas.

La selección del tamaño apropiado de una nanopartícula lipídica debe tomar en consideración el sitio de la célula o tejido diana y, en cierta medida, la aplicación para la que se está haciendo la nanopartícula lipídica. Como se usa en el presente documento, la frase "célula diana" se refiere a células a las que se dirigen u orientan una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición mezclada. En algunas realizaciones, las células diana comprenden un tejido u órgano particular. En algunas realizaciones, las células diana son deficientes en una proteína o enzima de interés. Por ejemplo, cuando se desea administrar un polinucleótido a un hepatocito, el hepatocito representa la célula diana. En algunas realizaciones, los polinucleótidos y las composiciones mezcladas de la presente invención transfectan las células diana sobre una base discriminatoria (es decir, no transfectan células no diana). Las composiciones de la presente invención y los métodos contemplados se pueden preparar para dirigirse preferentemente a una variedad de células diana, que incluyen, pero no se limitan a, hepatocitos, células epiteliales, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células de pulmón, células óseas, células madre, células mesenquimales, células neuronales (por ejemplo, meninges, astrocitos, neuronas motoras, células de los ganglios de la raíz dorsal y neuronas motoras de cuerno anterior), células fotorreceptoras (por ejemplo, bastones y conos), células epiteliales pigmentadas de la retina, células secretoras, cardíacas células, adipocitos, células musculares lisas vasculares, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células beta, células pituitarias, células del revestimiento sinovial, células ováricas, células testiculares, fibroblastos, células B, células T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos y células tumorales.

Después de la transfección de una o más células diana por los polinucleótidos encapsulados en las una o más nanopartículas lipídicas que comprenden la composición de mezcla, la producción del producto (por ejemplo, un polipéptido funcional o proteína) codificado por dicho polinucleótido se puede estimular preferiblemente y se potencia la capacidad de dichas células diana para expresar el polinucleótido y producir, por ejemplo, un polipéptido o proteína de interés. Por ejemplo, la transfección de una célula diana por las composiciones mezcladas que encapsulan el ARNm OTC mejorará (es decir, aumentará) la expresión del ARNm OTC y producirá una enzima OTC funcional.

En algunas realizaciones, puede ser deseable limitar la transfección de los polinucleótidos a ciertas células o tejidos. Por ejemplo, el hígado representa un órgano diana importante para las composiciones de la presente invención en parte debido a su papel central en el metabolismo y producción de proteínas y, por consiguiente, enfermedades causadas por defectos en productos génicos específicos del hígado (por ejemplo, los trastornos del ciclo de la urea) pueden beneficiarse de la dirección específica de las células (por ejemplo, hepatocitos). De acuerdo con esto, en ciertas realizaciones de la presente invención, las características estructurales del tejido objetivo pueden explotarse para dirigir la distribución de las nanopartículas lipídicas a dichos tejidos diana. Por ejemplo, para dirigir a los hepatocitos, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica mezclada pueden dimensionarse de manera que sus dimensiones sean menores que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos en el hígado; por consiguiente, la una o más de tales nanopartículas lipídicas pueden penetrar fácilmente tales fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos diana. Alternativamente, una nanopartícula lipídica se puede dimensionar de manera que las dimensiones del liposoma sean de un diámetro suficiente para limitar o evitar expresamente la distribución en ciertas células o tejidos. Por ejemplo, una o ambas de la primera y segunda nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica mezclada pueden dimensionarse de manera que sus dimensiones sean mayores que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos para limitar así la distribución de la nanopartícula lipídica liposómica a los hepatocitos. En tal realización, las nanopartículas lipídicas liposómicas grandes no penetrarán fácilmente en las fenestraciones endoteliales, y en su lugar serían eliminadas por las células macrófagas de Kupffer que recubren los sinusoides hepáticos. El dimensionamiento de, por ejemplo, la primera y la segunda nanopartículas lipídicas que comprenden la composición mezclada puede proporcionar una oportunidad para manipular y controlar con precisión el grado en que la expresión de los polinucleótidos encapsulados se puede potenciar en una o más células diana. Generalmente, el tamaño de al menos una de las nanopartículas lipídicas que comprende la composición farmacéutica mezclada está dentro del intervalo de aproximadamente 25 a 250 nm, preferiblemente menos de aproximadamente 250 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o 10 nm.

Del mismo modo, las composiciones de la presente invención se pueden preparar para distribuir preferentemente a otros tejidos diana, células u órganos, como el corazón, los pulmones, los riñones, el bazo. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas de la presente invención se pueden preparar para lograr una administración mejorada a las células y tejidos diana. Por consiguiente, las composiciones de la presente invención pueden enriquecerse con lípidos catiónicos, no catiónicos y modificados con PEG adicionales para dirigir tejidos o células diana.

En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones mezcladas se distribuyen a las células y tejidos del hígado para mejorar la administración, la transfección y la posterior expresión de los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) encapsulados por las células y tejidos del hígado (p. ej., hepatocitos) para, en determinadas realizaciones, potenciar de ese modo la producción de un polipéptido funcional codificado por dicho polinucleótido encapsulado. Si bien tales composiciones se pueden distribuir preferentemente en las células y tejidos del hígado, los efectos terapéuticos de los polinucleótidos expresados y/o los polipéptidos producidos no necesitan limitarse a las células y tejidos diana. Por ejemplo, los hepatocitos diana pueden funcionar como una "reserva" o un "depósito" capaz de expresar y/o producir, y excretar periférica o sistémicamente una proteína o enzima funcional. De acuerdo con esto, en ciertas realizaciones de la presente invención, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición mezclada pueden dirigir hepatocitos y/o distribuirse preferentemente a las células y tejidos del hígado en el momento de la administración. Después de la transfección de los hepatocitos diana por el polinucleótido encapsulado en una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición mezclada, dichos polinucleótidos se expresan (por ejemplo, se traducen) y un producto funcional (por ejemplo, un polipéptido o proteína) se excreta y sistémicamente se distribuye, donde dicho producto funcional puede ejercer un efecto terapéutico deseado.

Los polinucleótidos encapsulados en una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición mezclada pueden ser administrados a, y/o transfectar células o tejidos específicos. En algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados son capaces de ser expresados y los productos polipeptídicos funcionales producidos (y en algunos casos excretados) por la célula diana, confiriendo de ese modo una propiedad beneficiosa a, por ejemplo, las células o tejidos diana. Dichos polinucleótidos encapsulados pueden codificar, por ejemplo, una hormona, enzima, receptor, polipéptido, péptido u otra proteína de interés. En ciertas realizaciones, dichos polinucleótidos encapsulados también pueden codificar un ARN de interferencia pequeño (ARNip) o ARN antisentido con el fin de disminuir o eliminar la expresión de un ácido nucleico o gen endógeno. En ciertas realizaciones, dichos polinucleótidos encapsulados pueden ser de naturaleza natural o recombinante y pueden ejercer su actividad terapéutica usando mecanismos de acción sentido o antisentido.

Se debe entender que, si bien ciertas realizaciones descritas en este documento pueden causar una expresión mejorada o modulada de uno o más encapsulados polinucleótidos por una célula diana, la utilidad de las composiciones mezcladas descritas en este documento no se limita a los aumentos en la expresión de polinucleótidos encapsulados. Por el contrario, en ciertas realizaciones, las composiciones mezcladas descritas en este documento pueden modular o provocar de otro modo una reducción sinérgica en la expresión de uno o más genes o ácidos nucleicos en una célula diana. Por ejemplo, en ciertas realizaciones en las que uno o más de los polinucleótidos encapsulados que comprenden las formulaciones combinadas de este documento son oligonucleótidos antisentido, tales formulaciones combinadas pueden potenciar sinérgicamente (por ejemplo, aumentar) la administración de tales oligonucleótidos antisentido encapsulados a una o más células diana, modulando o potenciando de este modo la interferencia o inhibición de la expresión o producción de un gen o ácido nucleico diana. Por consiguiente, cuando los polinucleótidos encapsulados son, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido o siARN, las formulaciones combinadas que comprenden tales polinucleótidos pueden potenciar sinérgicamente la administración de polinucleótidos encapsulados a las células diana (por ejemplo, potenciadas por aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, ocho, diez, doce, quince, veinte, veinticinco, cincuenta, cien, quinientas, mil veces o más). Dicha administración mejorada de, por ejemplo, los polinucleótidos antisentido o siARN, usando las formulaciones mezcladas descritas aquí reduciría sinérgicamente de ese modo la expresión de los ácidos nucleicos diana (por ejemplo, tal que la producción de un ácido nucleico o proteína correspondiente a tales ácidos nucleicos diana se reduce o se elimina de otra manera). En tal realización, el suministro de los polinucleótidos encapsulados a las células diana puede potenciarse sinérgicamente (por ejemplo, aumentarse) y, por consiguiente, la función de los polinucleótidos encapsulados también se potencia, provocando de este modo una reducción correspondiente en la expresión de los genes o ácidos nucleicos diana.

Del mismo modo, en ciertas realizaciones, las invenciones descritas en este documento pueden causar una producción sinérgicamente reforzada (por ejemplo, aumentada) de uno o más polipéptidos o proteínas que están codificadas por los polinucleótidos encapsulados. En ciertas realizaciones en las que tales polipéptidos o proteínas se excretan en la circulación periférica de un sujeto, tal producción mejorada de polipéptidos o proteína codificada por, por ejemplo, un polinucleótido de ARNm encapsulado, usando las formulaciones mezcladas descritas en la presente memoria, se esperaría que causara una correspondiente secreción potenciada (por ejemplo, aumentada) de tales polipéptidos periféricamente.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína deficiente) puede opcionalmente incluir modificaciones químicas o biológicas que, por ejemplo, mejora la estabilidad y/o vida media de tales polinucleótidos o que mejoren o de otra manera facilita el traslado de tal polinucleótido.

5 También se contempla por la presente invención la co-administración de uno o más polinucleótidos únicos a las células diana por las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones mezcladas, por ejemplo, mediante la combinación de dos polinucleótidos únicos en una sola nanopartícula lipídica. En ciertas realizaciones, un primer polinucleótido, tal como ARNm que codifica uridiltransferasa de galactosa-1-fosfato (GALT) como se representa por SEQ ID NO:2, y un segundo polinucleótido, tal como ARNm que codifica galatoquinasa (GALK), se puede encapsular en una sola nanopartícula lipídica basada en liposomas (por ejemplo, una primera nanopartícula lipídica) y mezclada con una segunda nanopartícula lipídica y administrada a un sujeto que lo necesita (p. ej., para el tratamiento de la galactosemia). Alternativamente, en ciertas realizaciones, un primer polinucleótido, tal como ARNm que codifica uridiltransferasa de galactosa-1-fosfato (GALT) como se representa por SEQ ID NO:2, y un segundo polinucleótido, como ARNm que codifica galatoquinasa (GALK), pueden ser respectivamente encapsulados en una primera y una segunda nanopartículas lipídicas, y tal primera y segunda nanopartículas lipídicas mezcladas y administradas a un sujeto que lo necesita (p. ej., para el tratamiento de la galactosemia). También se contempla la coadministración y/o administración conjunta de un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido en una composición farmacéutica mezclada. Por ejemplo, tales primer y segundo polinucleótidos (por ejemplo, ARNm exógeno o sintético) pueden encapsularse respectivamente en una primera y una segunda nanopartículas lipídicas y tales primera y segunda nanopartículas lipídicas mezcladas en una única composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, el segundo polinucleótido encapsulado por la segunda nanopartícula lipídica potencia la administración o mejora la expresión del primer polinucleótido. De forma similar, en ciertas realizaciones, el primer polinucleótido encapsulado por la primera nanopartícula lipídica facilita la administración o potencia sinérgicamente la expresión del segundo polinucleótido. Alternativamente, un polinucleótido puede estar encapsulado en una primera nanopartícula lipídica y posteriormente mezclado con una segunda nanopartícula lipídica vacía (es decir, una nanopartícula lipídica que no encapsula un polinucleótido). En tal realización, la expresión del polinucleótido puede potenciarse (por ejemplo, incrementarse) con relación a la expresión de los polinucleótidos observados cuando la primera nanopartícula lipídica se administra independientemente de la segunda nanopartícula lipídica (por ejemplo, la expresión del polinucleótido puede aumentar sinérgicamente por aproximadamente dos, cuatro, cinco, diez, doce, quince o veinte veces o más).

También se contempla la administración de uno o más polinucleótidos encapsulados a una o más células diana para el tratamiento de un único trastorno o deficiencia, en donde cada polinucleótido funciona por un mecanismo de acción diferente. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas mezcladas de la presente invención pueden comprender un primer polinucleótido que, por ejemplo, está encapsulado en una primera nanopartícula lipídica y destinado a corregir una proteína endógena o deficiencia de enzima, y que se mezcla con un segundo polinucleótido encapsulado en una segunda nanopartícula lipídica y destinada a desactivar o "destruir" un polinucleótido endógeno defectuoso y su proteína o producto enzimático. Tales polinucleótidos encapsulados pueden codificar, por ejemplo, ARNm y siARN. Alternativamente, tales polinucleótidos pueden encapsularse en la misma nanopartícula lipídica y mezclarse con una nanopartícula lipídica vacía. En cada una de tales realizaciones, la expresión de los polinucleótidos encapsulados se puede potenciar sinérgicamente (por ejemplo, aumentar) con relación a la expresión de los polinucleótidos observados cuando dichas primeras nanopartículas lipídicas se administran independientemente de las segundas nanopartículas lipídicas. Por ejemplo, la expresión del polinucleótido encapsulado puede aumentar sinérgicamente en al menos aproximadamente dos, cuatro, cinco, diez, doce, quince o veinte veces o más, en relación con la suma de la expresión de los polinucleótidos observados cuando tales primeras nanopartículas lipídicas se administran independientemente de las segundas nanopartículas lipídicas.

Mientras que polinucleótidos transcritos *in vitro* (por ejemplo, ARNm) se pueden transfectar en células diana, tales polinucleótidos pueden ser fácilmente y eficientemente degradados por la célula *in vivo*, haciendo así tales polinucleótidos ineficaces. Además, algunos polinucleótidos son inestables en fluidos corporales (particularmente suero humano) y pueden degradarse o digerirse incluso antes de alcanzar una célula diana. Además, dentro de una célula, un ARNm natural puede descomponerse con una vida media de entre 30 minutos y varios días. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados en nanopartículas lipídicas proporcionados aquí, y los polinucleótidos de ARNm descritos en la presente memoria, conservan preferiblemente al menos alguna capacidad para expresarse o traducirse, para producir de ese modo una proteína o enzima funcional dentro de una o más células diana.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas mezcladas comprenden una o más nanopartículas lipídicas que incluyen o encapsulan uno o más polinucleótidos estabilizados (por ejemplo, ARNm que ha sido estabilizado contra la digestión o degradación *in vivo* de nucleasa) que modulan la expresión de un gen o que puede expresarse o traducirse para producir un polipéptido o proteína funcional dentro de una o más células diana. En ciertas realizaciones, la actividad de dichos polinucleótidos encapsulados (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína o enzima funcional) se prolonga durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, la actividad de los polinucleótidos puede prolongarse de manera que las composiciones farmacéuticas combinadas se

pueden administrar a un sujeto en una base semisemanal o quincenal, o más preferiblemente en una base mensual, bimensual, trimestral o anual. La actividad prolongada o extendida de las composiciones farmacéuticas combinadas de la presente invención, y en particular del ARNm encapsulado, está directamente relacionada con la cantidad de proteína funcional o enzima traducida a partir de dicho ARNm. De forma similar, la actividad de las composiciones mezcladas de la presente invención se puede extender o prolongar adicionalmente mediante modificaciones químicas preparadas para mejorar aún más el traslado de los polinucleótidos de ARNm. Por ejemplo, la secuencia consenso Kozac juega un papel en el inicio de la traducción de proteínas, y la inclusión de dicha secuencia de consenso Kozac en los polinucleótidos de ARNm encapsulados puede extender o prolongar adicionalmente la actividad de los polinucleótidos de ARNm. Además, la cantidad de proteína o enzima funcional expresada y producida por la célula diana es una función de la cantidad de polinucleótido (por ejemplo, ARNm) administrado a las células diana y la estabilidad de dicho polinucleótido. En la medida en que la estabilidad de los polinucleótidos de la presente invención pueda mejorarse o potenciarse, la semivida, la actividad de la proteína o enzima traducida y la frecuencia de dosificación de la composición pueden extenderse adicionalmente.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados en las composiciones farmacéuticas comprenden ARNm (por ejemplo, SEQ ID NO:3 que codifica ARNm de eritropoyetina humana). En ciertas realizaciones, los polinucleótidos pueden modificarse químicamente, por ejemplo, para conferir estabilidad (por ejemplo, estabilidad con respecto a la versión de tipo natural o de origen natural del ARNm y/o la versión del ARNm naturalmente endógeno a las células diana). Por consiguiente, en algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados proporcionados en la presente invención comprenden al menos una modificación química que confiere una estabilidad mayor o potenciada al polinucleótido, que incluye, por ejemplo, resistencia mejorada a la digestión con nucleasas *in vivo*. Como se usa en este documento, las frases "modificaciones químicas" y "químicamente modificadas" como tales términos se refieren a los polinucleótidos proporcionados aquí, incluyen al menos una alteración que preferiblemente mejora la estabilidad y hace que el polinucleótido sea más estable (por ejemplo, resistente a la digestión con nucleasas) que el tipo salvaje o versión de origen natural de ese polinucleótido. Los términos "estable" y "estabilidad" como tales términos se refieren a los polinucleótidos de la presente invención, y particularmente con respecto al ARNm, se refieren a una resistencia incrementada o potenciada a la degradación mediante, por ejemplo, nucleasas (es decir, endonucleasas o exonucleasas) que normalmente son capaces de degradar dicho ARN. Una mayor estabilidad puede incluir, por ejemplo, menos sensibilidad a la hidrólisis u otra destrucción por enzimas endógenas (por ejemplo, endonucleasas o exonucleasas) o afecciones dentro de la célula o tejido diana, aumentando o mejorando así la residencia de tales polinucleótidos en la célula diana, tejido, sujeto y/o citoplasma. Las moléculas de polinucleótidos estabilizadas proporcionadas en la presente memoria demuestran semividas más largas en relación con sus contrapartidas naturales no modificadas (por ejemplo, la versión de tipo silvestre del polinucleótido).

También se contemplan por las frases "modificación química" y "modificar químicamente" como tales términos relacionados con los polinucleótidos para su uso con la presente invención son alteraciones que mejoran o aumentan la traducción de los polinucleótidos de ARNm, incluyendo por ejemplo, la inclusión de secuencias que funcionan en el inicio de la traducción de proteínas (por ejemplo, la secuencia de consenso de Kozac). (Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15 (20):8125- 48 (1987)). La frase "modificaciones químicas" como se usa en el presente documento también incluye modificaciones que introducen químicas que difieren de las observadas en polinucleótidos naturales, por ejemplo, modificaciones covalentes tales como la introducción de nucleótidos modificados (por ejemplo, análogos de nucleótidos o la inclusión de grupos colgantes que no se encuentran naturalmente en tales moléculas polinucleotídicas). En algunas realizaciones, los polinucleótidos han sufrido una modificación química o biológica para hacerlos más estables antes de la encapsulación en una o más nanopartículas lipídicas. Las modificaciones químicas ejemplares de un polinucleótido incluyen el agotamiento de una base (por ejemplo, mediante delección o mediante la sustitución de un nucleótido por otro) o la modificación química de una base.

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

Las limitaciones en la reducción del número de residuos de C y U en una secuencia probable será mayor

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

Los polinucleótidos encapsulados pueden incluir variantes tanto de origen natural como no natural, y en consecuencia, dichos polinucleótidos pueden comprender no sólo los conocidos heterociclos de purina y pirimidina, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de los mismos. Los ejemplos contemplados incluyen, pero no están limitados a, adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, xantina, hipoxantina, pseudouridina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina. En algunas realizaciones, al menos uno de los nucleótidos presentes en el polinucleótido es una nucleobase modificada seleccionada del grupo que consiste en 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

El término modificación química también incluye, por ejemplo, la incorporación de enlaces no nucleótidos o nucleótidos modificados en las secuencias de polinucleótidos para uso con la presente invención (por ejemplo, modificaciones de bloqueo de extremo a uno o ambos extremos 3' y 5' de una molécula de ARNm que codifica una proteína o enzima funcional). Tales modificaciones pueden incluir la adición de bases a una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, la inclusión de una cola de poli A o una cola de poli A más larga), la alteración de la UTR en 3' o la UTR en 5', complejando el polinucleótido con un agente (por ejemplo, una proteína o una molécula de polinucleótido complementaria), y la inclusión de elementos que cambian la estructura de una molécula de polinucleótido (por ejemplo, que forman estructuras secundarias).

Se cree que la cola poli A estabiliza mensajeros naturales y de ARN sentido sintético. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se puede añadir una cola de poli A larga a una molécula de ARNm, lo que hace que el ARN sea más estable. Las colas poli A se pueden agregar usando una variedad de técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden añadir largas colas de poli A a ARN transcrito sintético o *in vitro* usando polimerasa poli A (Yokoe, y col., Nature Biotechnology, 1996; 14:1252-1256). Un vector de transcripción también puede codificar colas largas de poli A. Además, las colas de poli A se pueden agregar mediante transcripción directamente de productos de PCR. El Poli A también se puede ligar al extremo 3' de un ARN sentido con ligasa ARN (véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª edición, editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: edición de 1991)). En ciertas realizaciones, la longitud de la cola de poli A es al menos aproximadamente 90, 200, 300, 400 al menos 500 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la longitud de la cola de poli A se ajusta para controlar la estabilidad de una molécula de ARNm con sentido modificado de las composiciones de la invención y, por lo tanto, la transcripción de la proteína. Por ejemplo, dado que la longitud de la cola de poli A puede influir en la vida media de una molécula de ARNm sentido, la longitud de la cola de poli A se puede ajustar para modificar el nivel de resistencia del ARNm a nucleasas y controlar así el curso del tiempo de la expresión de polinucleótidos y/o producción de polipéptidos en una célula diana. En ciertas realizaciones, las moléculas de polinucleótidos estabilizadas son suficientemente resistentes a la degradación *in vivo* (por ejemplo, mediante nucleasas), de manera que pueden administrarse a la célula diana sin una nanopartícula lipídica.

En ciertas realizaciones, las modificaciones químicas son la modificación de bloqueo final de uno o más polinucleótidos que comprenden las composiciones farmacéuticas mezcladas de la invención. Por ejemplo, tales polinucleótidos pueden modificarse mediante la incorporación de secuencias 3' y/o 5' no traducidas (UTR) que no se encuentran naturalmente en el polinucleótido de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, la secuencia flanqueante 3' y/o 5' que flanquea naturalmente un ARNm y codifica una segunda proteína no relacionada se puede incorporar a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm que codifica una proteína funcional para modificarla. Por ejemplo, secuencias 3' o 5' de moléculas de ARNm que son estables (p. ej., globina, actina, GAPDH, tubulina, histona o enzimas del ciclo del ácido cítrico) pueden incorporarse en la región 3' y/o 5' de una molécula de polinucleótido de ARNm sentido para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm sentido.

También se contemplan por la presente invención modificaciones a las secuencias de polinucleótidos realizadas en uno o ambos de los extremos 3' y 5' del polinucleótido. Por ejemplo, la presente invención contempla modificaciones en el extremo 5' de los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) para 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. Además de aumentar la estabilidad de la secuencia de polinucleótidos de ARNm, se ha descubierto sorprendentemente que la inclusión de una secuencia parcial de un gen CMV inmediato-temprano 1 (IE1) (por ejemplo, en la región 5' no traducida del ARNm) potencia aún más la traducción del ARNm. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona de crecimiento humano (hGH), o un fragmento de la misma en el extremo 3' o región no traducida del polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para

estabilizar adicionalmente el polinucleótido. En general, las modificaciones químicas contempladas mejoran las propiedades de estabilidad y/o farmacocinética (por ejemplo, vida media) del polinucleótido con relación a sus equivalentes no modificados, e incluyen, por ejemplo, modificaciones hechas para mejorar la resistencia de dichos polinucleótidos a la digestión con nucleasas *in vivo*.

Las modificaciones químicas contempladas también incluyen, por ejemplo, la modificación de polinucleótidos encapsulados para incluir nucleótidos no naturales que comprenden, por ejemplo, restos de azúcar y/o de base modificados, que también se denominan aquí análogos de nucleótidos. Los nucleótidos no naturales incluyen nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, tales como nucleótidos bicíclicos o nucleótidos modificados en 2', tales como nucleótidos sustituidos en 2'. En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos son variantes de nucleótidos naturales, tales como nucleótidos de ADN o ARN, en virtud de, por ejemplo, modificaciones en los restos de azúcar y/o base.

En ciertas realizaciones, los análogos de nucleótidos contemplados pueden ser funcionalmente equivalentes a los nucleótidos naturales en el contexto del polinucleótido. Por ejemplo, los análogos de nucleótidos pueden no tener ningún efecto funcional sobre la forma en que funciona el polinucleótido. Dichos análogos de nucleótidos funcionalmente equivalentes pueden ser útiles, sin embargo, si, por ejemplo, son más fáciles o más baratos de fabricar, o son más estables a las condiciones de almacenamiento o fabricación, o representan una etiqueta o etiqueta.

En otras realizaciones, los análogos de nucleótidos pueden tener un efecto funcional sobre la forma en que las funciones de polinucleótido (por ejemplo, mediante el aumento de la resistencia a las nucleasas intracelulares y/o una mayor facilidad de transporte en la célula diana). Los ejemplos específicos de análogos de nucleótidos contemplados se describen, por ejemplo, en Freier, et al., Nucl. Acid Res. (1997) 25:4429 - 4443 y Uhlmann, y col., Curr. Opin. in Drug Development (2000) 3(2): 293-213.

Los polinucleótidos descritos en este documento pueden así comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos de origen natural, (por ejemplo, ADN o ARNm), o alternativamente pueden comprender o consistir en una combinación de tales nucleótidos de origen natural y uno o más nucleótidos no naturales (por ejemplo, análogos de nucleótidos). En ciertas realizaciones, por ejemplo, cuando los polinucleótidos encapsulados comprenden o consisten en oligonucleótidos antisentido, la inclusión de análogos de nucleótidos en dichos polinucleótidos puede mejorar adecuadamente la afinidad del polinucleótido por una o más secuencias diana. Se proporcionan ejemplos adicionales de análogos de nucleótidos adecuados y preferidos en la solicitud de patente internacional WO 2007/031091.

En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos se seleccionan independientemente de, por ejemplo: unidades de 2'-O-alquilo-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de ácido nucleico bloqueado, unidades de ácido nucleico arabino (ANA), unidades de 2'-fluoro-ANA, unidades de HNA, INA (unidades de ácido nucleico intercalante según lo discutido por Christensen, y col., Nucl. Acids. Res. (2002) 30:4918-4925) y Unidades 2'MOE. En ciertas realizaciones, solo hay uno de los tipos anteriores de análogos de nucleótidos presentes en los polinucleótidos para uso con la invención.

En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos comprenden 2'-O-metoxietilo-ARN (2'MOE), monómeros o análogos de nucleótidos de LNA, y como tal, los polinucleótidos para su uso con la invención pueden comprender análogos de nucleótidos 2'-fluoro-ADN que se seleccionan independientemente de estos tres tipos de análogos, o alternativamente pueden comprender solo un tipo de análogo seleccionado de los tres tipos. En algunas realizaciones, al menos uno de los nucleótidos de un polinucleótido encapsulado es 2'-MOE-ARN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de nucleótido 2'-MOE-ARN. En algunas realizaciones, al menos uno de los nucleótidos de un polinucleótido encapsulado es ADN 2'-fluoro, tal como unidades de nucleótido 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 2'-fluoro-ADN.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados comprenden al menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA), tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 unidades de LNA, tal como de aproximadamente 3-7 o 4-8 unidades LNA, o 3, 4, 5, 6 o 7 unidades de LNA. En algunas realizaciones, todos los nucleótidos del polinucleótido son LNA. En algunas realizaciones, el polinucleótido puede comprender tanto beta-D-oxi-LNA, como una o más de las siguientes unidades de LNA: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA y/o ENA en las configuraciones beta-D o alfa-L o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, todas las unidades de cinasina de LNA son 5'metil-citosina.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica mezclada, las dos o más nanopartículas lipídicas comprendidas en la misma o los polinucleótidos encapsuladas por dichas nanopartículas lipídicas pueden comprender un reactivo estabilizador. Las composiciones pueden incluir uno o más reactivos de formulación que se unen directa o indirectamente y estabilizan el polinucleótido, mejorando así el tiempo de residencia en el citoplasma de una célula diana. Tales reactivos conducen preferiblemente a una semivida mejorada de un polinucleótido en las células diana. Por ejemplo, la estabilidad de un ARNm y la eficacia de la traducción pueden aumentarse mediante la

incorporación de "reactivos estabilizantes" que forman complejos con los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) que se producen naturalmente dentro de una célula (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.677.124). La incorporación de un reactivo estabilizante se puede llevar a cabo, por ejemplo, combinando poli A y una proteína con el ARNm para estabilizar *in vitro* antes de cargar o encapsular el ARNm dentro de una o más nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica mezclada. Los reactivos estabilizantes a modo de ejemplo incluyen una o más proteínas, péptidos, aptámeros, proteína accesoria traduccional, proteínas de unión a ARNm y/o factores de iniciación de la traducción.

La estabilización de las composiciones farmacéuticas combinadas descritas aquí, y de las nanopartículas lipídicas constituyentes, también se puede mejorar mediante el uso de restos inhibidores de opsonización, que típicamente son polímeros hidrofílicos grandes que están unidos química o físicamente o incorporados de otro modo en la nanopartícula lipídica (por ejemplo, mediante la intercalación de un anclaje soluble en lípidos en la membrana misma, o uniéndose directamente a grupos activos de lípidos de membrana). Estos polímeros hidrofílicos inhibidores de opsonización forman una capa superficial protectora que disminuye significativamente la absorción de los liposomas por el sistema de monocitos y macrófagos y el sistema reticuloendotelial (por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 4.920.016). Por ejemplo, las demoras en la absorción de nanopartículas lipídicas por el sistema reticuloendotelial pueden facilitarse mediante la adición de un revestimiento de superficie de polímero hidrófilo sobre o en nanopartículas lipídicas para enmascarar el reconocimiento y la absorción de la nanopartícula lipídica basada en liposomas por el sistema reticuloendotelial. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las formulaciones mezcladas comprenden un polímero de polietilenglicol (PEG) o un lípido modificado con PEG para potenciar adicionalmente el suministro de tales nanopartículas lipídicas a la célula y tejidos diana.

Cuando el ARN se hibrida con una molécula polinucleotídica complementaria (por ejemplo, ADN o ARN) puede protegerse de las nucleasas. (Krieg, y col., Melton. *Methods in Enzymology*. 1987; 155, 397-415). La estabilidad del ARNm hibridado probablemente se deba a la especificidad inherente de una sola cadena de la mayoría de las ARNasas. En algunas realizaciones, el reactivo de estabilización seleccionado para formar un complejo de un polinucleótido es una proteína eucariótica (por ejemplo, una proteína de mamífero). En otra realización más, el polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para uso en la terapia de los sentidos se puede modificar mediante hibridación con una segunda molécula de polinucleótido. Si se hibridaba una molécula de ARNm completa con una molécula de polinucleótido complementaria, se puede reducir el inicio de la traducción. En algunas realizaciones, la región 5' no traducida y la región de inicio AUG de la molécula de ARNm pueden dejarse sin hibridar opcionalmente. Después de la iniciación de la traducción, la actividad de desenrollado del complejo ribosómico puede funcionar incluso en dúplex de alta afinidad para que pueda llevarse a cabo la traducción. (Liebhaber, J. *Mol. Biol.* 1992; 226:2-13; Monia, y col., *J Biol Chem.* 1993; 268:14514-22). Se entenderá que cualquiera de los métodos descritos anteriormente para mejorar la estabilidad de polinucleótidos se pueden usar solos o en combinación con uno o más de cualquiera de los otros métodos y/o composiciones descritas anteriormente.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas combinadas de la presente invención potencian la administración de polinucleótidos encapsulados en nanopartículas lipídicas a una o más células diana, tejidos u órganos. En algunas realizaciones, la administración mejorada a una o más células diana comprende aumentar la cantidad de polinucleótido que entra en contacto o se administra de otra manera a las células diana. En algunas realizaciones, potenciar la administración a las células diana comprende reducir la cantidad de polinucleótido que entra en contacto con las células no diana. En algunas realizaciones, potenciar la administración a las células diana comprende permitir la transfección de al menos algunas células diana con el polinucleótido encapsulado. En algunas realizaciones, el nivel de expresión del polinucleótido encapsulado por las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas mezcladas en cuestión se incrementa en las células diana.

Los polinucleótidos para uso con la presente invención pueden combinarse opcionalmente con un gen reportero (por ejemplo, aguas arriba o aguas abajo de la región codificante del polinucleótido) que, por ejemplo, facilita la determinación de liberación de polinucleótidos a las células o tejidos diana. Los genes informadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, ARNm de proteína verde fluorescente (ARNm de GFP), ARNm de luciferasa de *Renilla* (ARNm de luciferasa), ARNm de luciferasa de luciérnaga (SEQ ID NO:1), o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el ARNm de GFP puede fusionarse con un polinucleótido que codifica ARNm de OTC para facilitar la confirmación de la localización del ARNm en las células diana, tejidos u órganos.

En algunas realizaciones, las composiciones mezcladas de la presente invención comprenden una o más moléculas adicionales (por ejemplo, proteínas, péptidos, aptámeros u oligonucleótidos) que facilitan la transferencia de los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm, miARN, snARN y snoARN) de la nanopartícula lipídica en un compartimento intracelular de la célula diana. En algunas realizaciones, la molécula adicional facilita la administración de los polinucleótidos en, por ejemplo, el citosol, el lisosoma, la mitocondria, el núcleo, las nucleolas o el proteasoma de una célula diana. También se incluyen agentes que facilitan el transporte de la proteína traducida de interés desde el citoplasma a su ubicación intercelular normal (por ejemplo, en la mitocondria) para tratar deficiencias en ese orgánulo. En algunas realizaciones, el agente se selecciona del grupo que consiste en una

proteína, un péptido, un aptámero y un oligonucleótido.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención facilitan la producción endógena de un sujeto de una o más proteínas y/o enzimas funcionales, y en particular la producción de proteínas y/o enzimas que demuestran menos inmunogenicidad en relación con sus preparaciones recombinantes contrapartes. En ciertas realizaciones de la presente invención, las nanopartículas lipídicas comprenden polinucleótidos que codifican ARNm de una proteína o enzima deficiente. Tras la distribución de dichas composiciones a los tejidos diana y la posterior transfección de tales células diana, el ARNm exógeno cargado o encapsulado en las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones mezcladas puede traducirse *in vivo* para producir una proteína funcional o enzima codificada por dicho ARNm encapsulado (por ejemplo, una proteína o enzima en la que el sujeto es deficiente). Por consiguiente, en ciertas realizaciones las composiciones de la presente invención explotan la capacidad de un sujeto para traducir ARNm preparado exógeno o recombinantemente para producir una proteína o enzima traducida endógenamente, y de ese modo producir (y cuando corresponda excretar) una proteína funcional o enzima. El ARNm expresado y/o las proteínas traducidas o las enzimas producidas a partir del mismo también pueden caracterizarse por la inclusión *in vivo* de modificaciones postraduccionales nativas que a menudo pueden estar ausentes en proteínas o enzimas preparadas recombinantemente, reduciendo así la inmunogenicidad de la proteína traducida o enzima.

La encapsulación de ARNm en las nanopartículas lipídicas y la administración de las composiciones farmacéuticas mezcladas que comprenden tales nanopartículas lipídicas evita la necesidad de administrarse el ARNm a orgánulos específicos dentro de una célula diana (por ejemplo, las mitocondrias). Por el contrario, tras la transfección de una célula diana y la administración del ARNm encapsulado al citoplasma de la célula diana, los contenidos de ARNm de las nanopartículas lipídicas pueden traducirse y una proteína o enzima funcional producida y/o excretada.

La presente invención también contempla la selección discriminatoria de una o más células diana y tejidos mediante medios de direccionamiento tanto pasivos como activos. El fenómeno de la orientación pasiva explota los patrones de distribución natural de las nanopartículas lipídicas *in vivo* sin depender del uso de excipientes adicionales o medios para mejorar el reconocimiento de la nanopartícula lipídica por una o más células diana. Por ejemplo, es probable que las nanopartículas lipídicas que están sujetas a fagocitosis por las células del sistema retículo-endotelial se acumulen en el hígado o el bazo, y en consecuencia pueden proporcionar medios para dirigir pasivamente la administración de las composiciones a tales células diana.

Alternativamente, la presente invención contempla la orientación activa, que implica el uso de excipientes adicionales, denominados aquí "ligandos de orientación" que se pueden unir (ya sea covalentemente o no covalentemente) a la nanopartícula de lípidos para fomentar la localización de tal nanopartícula lipídica en ciertas células diana o tejidos diana. Por ejemplo, la dirección puede estar mediada por la inclusión de uno o más ligandos de dirección endógenos (por ejemplo, apolipoproteína E) en o sobre la nanopartícula lipídica para estimular la distribución a las células o tejidos diana. El reconocimiento del ligando de direccionamiento por los tejidos diana facilita activamente la distribución tisular y la captación celular de las nanopartículas lipídicas y/o sus contenidos por las células y tejidos diana. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la formulación farmacéutica combinada pueden comprender un ligando dirigido a la apolipoproteína E en dichas nanopartículas lipídicas para facilitar o estimular el reconocimiento y la unión de dicha nanopartícula lipídica a lipoproteínas de baja densidad endógenas, receptores expresados, por ejemplo, por hepatocitos. Como se proporciona aquí, la composición puede comprender un ligando capaz de potenciar la afinidad de las composiciones mezcladas por una o más células diana. Los ligandos dirigidos se pueden unir a la bicapa externa de la nanopartícula lipídica durante la formulación o la postformulación. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Además, algunas nanopartículas lipídicas pueden comprender polímeros fusogénicos tales como PEAA, hemaglutinina, otros lipopéptidos (véanse las solicitudes de patente de Estados Unidos números 08/835.281 y 60/083.294) y otras características útiles para la administración *in vivo* y/o intracelular. En otras realizaciones, las composiciones mezcladas de la presente invención demuestran eficacias de transfección mejoradas, y/o demuestran una selectividad mejorada hacia las células diana o los tejidos de interés. Por lo tanto, se contemplan composiciones mezcladas o nanopartículas lipídicas que comprenden uno o más ligandos (p. ej., péptidos, aptámeros, oligonucleótidos, una vitamina u otras moléculas) que son capaces de potenciar la afinidad de las composiciones mezcladas o sus nanopartículas lipídicas constituyentes y sus contenidos de polinucleótidos para una o más células o tejidos diana. Los ligandos adecuados pueden estar opcionalmente unidos o unidos a la superficie de la nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede abarcar la superficie de una nanopartícula lipídica o puede encapsularse dentro de la nanopartícula lipídica. Los ligandos adecuados se seleccionan basándose en sus propiedades físicas, químicas o biológicas (por ejemplo, afinidad selectiva y/o reconocimiento de marcadores o características de la superficie celular diana). Los sitios diana específicos de la célula y su correspondiente ligando de direccionamiento pueden variar ampliamente. Los ligandos de direccionamiento adecuados se seleccionan de modo que se explotan las características únicas de una célula diana, permitiendo así que la composición discrimine entre células diana y no diana. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden llevar marcadores superficiales (por ejemplo, apolipoproteína B o apolipoproteína E) que mejoran selectivamente el reconocimiento de, o la afinidad a los hepatocitos (p. ej., por reconocimiento y

unión de dichos marcadores superficiales). Además, se esperaría que el uso de galactosa como ligando de direccionamiento dirigiera las composiciones de la presente invención a hepatocitos parenquimatosos, o alternativamente, se esperaría que el uso de residuos de azúcar que contienen manosa como ligando de direccionamiento dirigiera las composiciones de la presente invención a células endoteliales hepáticas (por ejemplo, manosa que contiene residuos de azúcar que se pueden unir preferentemente al receptor de la asialoglicoproteína presente en los hepatocitos). (Véase Hillery AM, et al. "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc.) La presentación de tales ligandos dirigidos que se han conjugado con restos presentes en la nanopartícula lipídica facilita el reconocimiento y la absorción de las composiciones mezcladas de la presente invención por una o más células diana y tejidos. Los ejemplos de ligandos de direccionamiento adecuados incluyen uno o más péptidos, proteínas, aptámeros, vitaminas y oligonucleótidos.

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

La capacidad de las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas para mejorar sinérgicamente la expresión de polinucleótidos encapsulados como la producción de un polipéptido o proteína proporciona nuevos y más eficientes medios de efectuar la producción *in vivo* de polipéptidos y proteínas para el tratamiento de una serie de enfermedades o condiciones patológicas. Tales composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas son particularmente adecuadas para el tratamiento de enfermedades o afecciones patológicas asociadas con la expresión aberrante de una proteína o enzima. Por ejemplo, la administración con éxito de polinucleótidos tales como ARNm a órganos diana tales como el hígado y, en particular, a hepatocitos, puede usarse para el tratamiento y la corrección de errores de metabolismo innato que se localizan en el hígado. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas combinadas y los métodos relacionados descritos en la presente memoria se pueden emplear para tratar una amplia gama de enfermedades y afecciones patológicas, en particular aquellas enfermedades que se deben a deficiencias de proteínas o enzimas. Los polinucleótidos encapsulados por las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas combinadas pueden codificar un producto funcional (por ejemplo, una proteína, enzima, polipéptido, péptido y/o ARN funcional), y pueden codificar un producto cuya producción *in vivo* se desea. Alternativamente, los polinucleótidos encapsulados por las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas combinadas pueden comprender un oligonucleótido antisentido y después de la administración de dicho oligonucleótido antisentido a una o más células diana, la expresión de genes diana o ácidos nucleicos modulados, sinérgicamente reducidos o eliminados.

Los trastornos metabólicos de ciclo de urea representan ejemplos de tales proteínas y deficiencias enzimáticas que pueden ser tratadas utilizando los métodos descritos y mezclas de composiciones de nanopartículas lipídicas proporcionadas en este documento. Tales trastornos metabólicos del ciclo de la urea incluyen la deficiencia de transcarbamilasa de ornitina (OTC), deficiencia de sintetasa de arginosuccinato (ASD) y deficiencia de liasa de argininosuccinato (ALD). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados por las nanopartículas lipídicas proporcionadas aquí codifican una enzima implicada en el ciclo de la urea, que incluye, por ejemplo, transcarbamilasa de ornitina (OTC), sintetasa de fosfato de carbamilo (CPS), sintetasa de argininosuccinato 1 (ASS1) liasa de argininosuccinato (ASL) y arginasa (ARG).

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

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

El gen *OTC*, que se localiza en el brazo corto del cromosoma X dentro de la banda Xp21.1, abarca más de 85 kb y está compuesto por 10 exones que codifican una proteína de 1062 aminoácidos. (Lindgren V., y col., Science 1984; 226:698-7700; Horwich, AL., y col., Science 224: 1068-1074, 1984; Horwich, AL., y col., Cell 44:451-

459, 1986). ; Hata, A., y col., J. Biochem. 100: 717 - 725, 1986). La enzima OTC cataliza la conversión de ornitina y fosfato de carbamoilo a citrulina. Dado que *OTC* se encuentra en el cromosoma X, las mujeres son principalmente portadoras, mientras que los hombres con mutaciones no conservativas rara vez sobreviven más allá de las 72 horas de vida.

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

La deficiencia de *OTC* es muy heterogénea, con más de 200 mutaciones únicas notificadas y grandes deleciones que representan aproximadamente el 10-15% de todas las mutaciones, mientras que el resto generalmente comprende mutaciones de punto sin sentido con números más pequeños de mutaciones sin sentido, sitio de empalme y deleción pequeña. (Monish A., *et al.*) El fenotipo de la deficiencia de *OTC* es extremadamente heterogéneo, que puede ir desde el coma hiperamonémico agudo neonatal a los adultos hemicigóticos asintomáticos. (Gordon N. Eur J Paediatr Neurol 2003; 7: 115-121). Aquellas mutaciones que resultan en enfermedad neonatal grave y potencialmente mortal se agrupan en importantes dominios estructurales y funcionales en el interior de la proteína en sitios de actividad enzimática o en la superficie de intercadena, mientras que las mutaciones asociadas con enfermedad de inicio tardío se localizan en la superficie de la proteína (Monish A., *et al.*) Los pacientes con formas más leves o parciales de deficiencia de *OTC* pueden tener la aparición de la enfermedad más adelante en la vida, que puede presentarse como vómitos recurrentes, cambios neuroconductuales o convulsiones asociadas con hiperamonemia.

Las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención y métodos relacionados contempladas en este documento son ampliamente aplicables a la administración de polinucleótidos, y, en particular ARNm, para tratar una serie de trastornos. En particular, las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención y los métodos relacionados contemplados en la presente son adecuados para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la deficiencia de proteínas y/o enzimas. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados en nanopartículas lipídicas codifican proteínas o enzimas funcionales que se excretan o secretan por una o más células diana en el fluido extracelular circundante (por ejemplo, ARNm que codifica hormonas y neurotransmisores). Alternativamente, en otra realización, los polinucleótidos para uso con la presente invención codifican proteínas funcionales o enzimas que permanecen en el citosol de una o más células diana (por ejemplo, ARNm que codifica enzimas asociadas con trastornos metabólicos del ciclo de la urea o una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosómico). Otros trastornos para los cuales las composiciones farmacéuticas de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención son útiles incluyen, pero no se limitan a, trastornos tales como atrofia muscular espinal (SMA) relacionada con SMN1; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); galactosemia relacionada con GALT; fibrosis quística (CF); Trastornos relacionados con SLC3A1 que incluyen cistinuria; trastornos relacionados con COL4A5 que incluyen el síndrome de Alport; deficiencias de galactocerebrosidasa; adrenoleucodistrofia ligada a X y adrenomieloneuropatía; Ataxia de Friedreich; Enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; esclerosis tuberosa relacionada con TSC1 y TSC2; Síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB); Cistinosis relacionada con CTNS; trastornos relacionados con FMR1 que incluyen síndrome de X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil y síndrome de falla de ovario frágil X prematuro; Síndrome de Prader-Willi; Enfermedad de Fabry; telangiectasia hemorrágica hereditaria (AT); Enfermedad de Niemann-Pick tipo C1; las enfermedades relacionadas con la lipofuscinosis ceroides neuronal incluyendo la Lipofuscinosis Ceroides Neonatal Juvenil (JNCL), la enfermedad de Batten Juvenil, la enfermedad de Santavuori-Haltia, la enfermedad de Jansky-Bielschowsky y las deficiencias de PTT-1 y TPP1; Ataxia infantil EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 y EIF2B5 con hipomielinización del sistema nervioso central/materia blanca desaparecida; CACNA1A y ataxia episódica relacionada con CACNB4 tipo 2; los trastornos relacionados con MECP2 que incluyen el Síndrome Classic Rett, la Encefalopatía Neonatal Severa relacionada con MECP2 y el Síndrome PPM-X; síndrome Rett atípico relacionado con CDKL5; Enfermedad de Kennedy (SBMA); Arteriopatía cerebral autosómica dominante relacionada con Notch-3 con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); Trastornos convulsivos relacionados con SCN1A y SCN1B; los trastornos relacionados con la polimerasa G que incluyen el síndrome de Alpers-Huttenlocher, la neuropatía atáxica sensorial relacionada con el POLG, la disartria y la oftalmoparesia y la oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante y recesiva con las deficiencias del ADN mitocondrial; hipoplasia suprarrenal ligada a X; agammaglobulinemia ligada a X; y la enfermedad de Wilson. En ciertas realizaciones, el ARNm para uso con la presente invención puede codificar proteínas o enzimas funcionales. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden incluir ARNm que codifica agalsidasa alfa, eritropoyetina, α 1-antitripsina, carboxipeptidasa N, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, sulfamidasa de heparan, hialuronidasa y galactocerebrosidasa o hormona de crecimiento humano.

Alternativamente, los polinucleótidos encapsulados pueden codificar anticuerpos de longitud completa o anticuerpos más pequeños (por ejemplo, cadenas tanto pesadas como livianas) para conferir inmunidad a un sujeto. Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren a composiciones farmacéuticas de nanopartículas

lipídicas mezcladas y a métodos para usar las mismas para conferir inmunidad a un sujeto (por ejemplo, mediante la traducción de ácidos nucleicos de ARNm que codifican anticuerpos funcionales), las invenciones descritas aquí y contempladas son ampliamente aplicables. En una realización alternativa, las composiciones mezcladas de la presente invención codifican anticuerpos que pueden usarse para efectuar de manera transitoria o crónica una respuesta funcional en sujetos. Por ejemplo, el ARNm encapsulado puede codificar un anticuerpo monoclonal o policlonal funcional, que tras la traducción (y según corresponda, la excreción sistémica de las células diana) puede ser útil para dirigir y/o inactivar un objetivo biológico (por ejemplo, una citocina estimulante tal como factor de necrosis tumoral). De forma similar, el ARNm encapsulado puede codificar, por ejemplo, anticuerpos funcionales de anti-factor nefrítico útiles para el tratamiento de glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II o síndrome urémico hemolítico agudo, o alternativamente pueden codificar anticuerpos anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por VEGF, como el cáncer.

Las composiciones farmacéuticas combinadas se pueden administrar a un sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones mezcladas o las nanopartículas lipídicas constituyentes se formulan en combinación con uno o más polinucleótidos adicionales, vehículos, ligandos de direccionamiento o reactivos estabilizantes, o en composiciones farmacológicas combinadas donde tales composiciones comprenden otros excipientes adecuados. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones mezcladas pueden prepararse para liberar ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm) que codifican dos o más proteínas o enzimas distintas. Alternativamente, las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención se pueden preparar para administrar un único polipéptido en dos o más nanopartículas lipídicas, teniendo cada una diferentes composiciones lipídicas y que posteriormente se mezclan en una sola formulación o forma de dosificación y se administran a un sujeto. Las técnicas para formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., Última edición.

Una amplia gama de moléculas que pueden ejercer efectos farmacéuticos o terapéuticos pueden ser administrados a las células diana utilizando las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención. Las moléculas pueden ser orgánicas o inorgánicas. Las moléculas orgánicas pueden ser péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, esteroides, ácidos nucleicos (incluyendo ácidos nucleicos peptídicos) o cualquier combinación de los mismos. Una formulación para administración en células diana puede comprender más de un tipo de molécula, por ejemplo, dos secuencias de polinucleótidos diferentes que codifican una proteína, una enzima y/o un esteroide.

Las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención se pueden administrar y dosificar de acuerdo con la práctica médica actual, teniendo en cuenta el estado clínico del sujeto, el sitio y método de administración, la programación de administración, el sujeto de edad, sexo, peso corporal y otros factores relevantes para los médicos con experiencia normal en la técnica. La "cantidad efectiva" para los fines del presente documento puede determinarse mediante consideraciones relevantes conocidas por los expertos en investigación clínica experimental, farmacológica, clínica y médica, reconociendo que las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas son capaces de mejorar sinérgicamente el expresión de los polinucleótidos encapsulados y la producción de polipéptidos o proteínas codificados por los mismos o modulando la expresión de un ácido nucleico o polinucleótido diana (por ejemplo, usando un oligonucleótido antisentido), y que en algunos casos las reducciones de dosis de dichos polinucleótidos encapsulados en relación con la formulación mezclada puede estar garantizada. En algunas realizaciones, la cantidad administrada es eficaz para lograr al menos cierta estabilización, mejora o eliminación de síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas del progreso, la regresión o la mejora de la enfermedad por los expertos en la materia. Por ejemplo, una cantidad adecuada y régimen de dosificación es uno que causa al menos expresión transitoria de uno o más polinucleótidos en las células diana.

Las mejoras sinérgicas en la expresión de polinucleótidos encapsulados que caracterizan a las formulaciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención permiten concentraciones terapéuticamente eficaces de polipéptidos producidos en la expresión de tales polinucleótidos encapsulados (por ejemplo, una proteína terapéutica o enzimática) a alcanzar en el tejidos dirigidos (o suero si el producto es excretado por la célula diana) usando una dosis significativamente más baja de polinucleótido de la que se había previsto previamente. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la cantidad eficaz de un polinucleótido requerida para lograr un efecto terapéutico deseado puede reducirse encapsulando dicho polinucleótido en una o más nanopartículas lipídicas y mezclando al menos dos nanopartículas lipídicas. También se contemplan métodos para reducir la cantidad de un polinucleótido requerido para provocar un efecto terapéutico en un sujeto. Dichos métodos generalmente comprenden una etapa de administrar una composición farmacéutica al sujeto, donde la composición farmacéutica comprende una primera nanopartícula lipídica mezclada con una segunda nanopartícula lipídica, y en la que una o ambas de la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica comprenden el polinucleótido, seguido de la transfección de una o más células diana del sujeto con tales polinucleótidos, de manera que la cantidad del polinucleótido requerido para efectuar un efecto terapéutico se reduce (por ejemplo, se reduce en relación con la cantidad de polinucleótido requerida para efectuar un efecto terapéutico usando una composición no mezclada u otras técnicas estándar). En ciertas realizaciones, la cantidad de un polinucleótido requerida para efectuar un efecto terapéutico se reduce en al menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o 99%. En ciertas realizaciones, la cantidad de un polinucleótido requerida para efectuar

un efecto terapéutico se reduce al menos en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, diez, doce, quince, veinte o veinticinco veces o más.

Las rutas de administración adecuadas de las composiciones de nanopartículas lipídicas combinadas incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal, vaginal, transmucosa, sublingual, subdural, nasal o intestinal; administración parenteral, incluidas las inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como las inyecciones o infusiones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, oftálmicas o intraoculares. En ciertas realizaciones, la administración de la composición de nanopartículas lipídicas mezcladas a un sujeto facilita el contacto de las nanopartículas lipídicas constituyentes con una o más células diana, tejidos u órganos.

Alternativamente, las composiciones de nanopartículas lipídicas mezcladas de la presente invención se pueden administrar de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de inyección o infusión de la composición farmacéutica mezclada directamente en un tejido diana, preferiblemente en un depósito o formulación de liberación sostenida, de modo que el contacto de las células diana con las nanopartículas lipídicas constituyentes puede facilitarse adicionalmente. La administración local puede verse afectada de varias maneras, dependiendo del tejido al que se va a dirigir. Por ejemplo, los aerosoles que contienen composiciones de la presente invención se pueden inhalar (para administración nasal, traqueal o bronquial); las composiciones mezcladas de la presente invención se pueden inyectar en el sitio de lesión, manifestación de enfermedad o dolor, por ejemplo; las composiciones mezcladas pueden proporcionarse en pastillas para aplicación oral, traqueal o esofágica; se puede suministrar en forma de líquido, tableta o cápsula para administración al estómago o los intestinos, se puede suministrar en forma de supositorio para aplicación rectal o vaginal; o incluso puede administrarse al ojo mediante el uso de cremas, gotas o incluso inyección. Las formulaciones que contienen composiciones mezcladas de la presente invención complejadas con moléculas o ligandos terapéuticos pueden incluso administrarse quirúrgicamente, por ejemplo en asociación con un polímero u otra estructura o sustancia que puede permitir que las composiciones se difundan desde el sitio de implantación a las células circundantes. Alternativamente, tales composiciones mezcladas se pueden aplicar quirúrgicamente sin el uso de polímeros o soportes.

En ciertas realizaciones, las composiciones mezcladas de la presente invención se formulan de manera que sean adecuadas para la liberación prolongada de los polinucleótidos o ácidos nucleicos encapsulados en las nanopartículas lipídicas constituyentes. Dichas composiciones mezcladas de liberación prolongada se pueden administrar convenientemente a un sujeto a intervalos de dosificación extendidos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces al día, diariamente o cada dos días. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces por semana, una vez a la semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, o más preferiblemente cada cuatro semanas, una vez al mes, cada seis semanas, cada ocho semanas, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis meses, cada ocho meses, cada nueve meses o anualmente. También se contemplan composiciones y nanopartículas lipídicas que se formulan para la administración de depósito (por ejemplo, intramuscularmente, subcutáneamente, intravítreamente) para administrar o liberar un polinucleótido (por ejemplo, ARNm) durante períodos de tiempo prolongados. Preferiblemente, los medios de liberación prolongada empleados se combinan con modificaciones (por ejemplo, modificaciones químicas) introducidas en los polinucleótidos para mejorar la estabilidad.

También se contemplan en el presente documento composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden uno o más de los compuestos descritos en este documento y los métodos para el uso de tales composiciones liofilizadas relacionadas como se describe por ejemplo, en la solicitud provisional de Estados Unidos N° PCT/US2012/041663, presentada 8 de junio de 2011.

Aunque ciertas composiciones de la presente invención y métodos contemplados en la presente han sido descritos con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar las composiciones de la invención y no están destinados a limitar la misma.

Los artículos "un" y "una" como se utiliza aquí en la especificación y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, debe entenderse para incluir los referentes plurales. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, está empleado o es relevante para un producto o proceso determinado. La invención también incluye realizaciones en las que más de uno, o los miembros del grupo completo están presentes en, empleados en, o son relevantes para un producto o proceso dado. Cuando los elementos se presentan como listas, (por ejemplo, en el grupo Markush o en un formato similar) debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se revela, y cualquier elemento puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se hace referencia a la invención, o aspectos de la invención, que comprenden elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente de tales elementos, características, etc. Por motivos de simplicidad, dichas realizaciones no se han expuesto específicamente en todos los casos en las presentes palabras en este documento.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se refieren en general a composiciones y formulaciones farmacéuticas de nanopartículas lipídicas, y en particular, composiciones farmacéuticas y formulaciones que comprenden "mezclas" de tales nanopartículas lipídicas, así como métodos altamente eficaces para usar las composiciones farmacéuticas anteriores y formulaciones para administración de constructos de polinucleótidos a una o más células diana, tejidos y órganos.

Ejemplo 1. Formulaciones y material de ARN mensajero*Materiales lipídicos*

Las formulaciones descritas en este documento incluyen una mezcla de lípidos multi-componente de relaciones variables que emplea uno o más lípidos catiónicos, lípidos adyuvantes y lípidos PEGilados diseñados para encapsular diversos materiales basados en ácidos nucleicos. Los lípidos catiónicos pueden incluir, pero no se limitan a, 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 y otros, "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), HGT4003, ICE, a base de dialquilamino, a base de imidazol o a base de guanidinio. Otros componentes de nanopartículas pueden incluir, pero sin limitación, DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfolina), DOPE (1, 2-dioleil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina), DPPE (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina), DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)), o colesterol. Los lípidos PEGilados pueden incluir, pero no se limitan a, una cadena de poli(etileno)glicol de hasta 5 kDa de longitud unido covalentemente a un lípido con cadena(s) de alquilo de longitud C₆-C₂₀.

Material de ARN mensajero

El ARN mensajero de luciferasa de luciérnaga optimizado en codón (ARNm de CO-FFL), la transferasa de uridilo de galactosa-1-fosfato (GALT) y la eritropoyetina humana (EPO) se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica el gen, que era seguido de la adición de una estructura cap de 5' (Cap1) (Fechter, P., Brownlee, GG "Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249) y un cola de poli(A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud determinada por electroforesis en gel. Las 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.

ES 2 795 249 T3

ARNm de luciferasa CO-FF:

5 **X**AUGGAAGAUGCCAAAAACAUUAAGAAGGGCCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGA
CGGGACCGCCGGCGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUCGGUGCCCGG
CACCAUCGCCUUUACCGACGCACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUU
10 CGAGAUGAGCGUUCGGCUGGCAGAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAAACCA
UCGGAUCGUGGUGUGCAGCGAGAAUAGCUUGCAGUUCUUCUUCUUGCCCGUGUUGGGUGC
CCUGUUCUUCGGUGUGGCUGUGGCCCCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGCGAGCU
GCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCCACCGUCGUUUCGUGAGCAAGAAAGGGCU
15 GCAAAGAUCUUCUACCGUGCAAAAGAAGCUACCGAUCAUACAAAAGAUCAUCAUCAU
GGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUACACCUUCGUGACUCCCCA
UUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGCCCGAGAGCUUCGACCGGGACAA
AACCAUCGCCCUGAUCAUGAACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGGGCGUAGC
20 CCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGCGACCCCAUCUUCGG
CAACCAGAUCAUCCCCGACACCGCUAUCUUCAGCGUGGUGCCAUUUCACCACGGCUU
CGGCAUGUUCACCACGCUUGGGCUACUUGAUUCGCGGCUUUCGGGUCGUGCUCAUGUA
CCGCUUCGAGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUUCAUUCUGC
25 CCUGCUGGGUGCCACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUA
CGACCUAAGCAACUUGCACGAGAUCCAGCGGGCGGGCGCCGCUAGCAAGGAGGU
AGGUGAGGCCGUGGCCAAACGCUUCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCU
GACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUCACCCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGGCGC
AGUAGGCAAGGUGGUGCCUUCUUCGAGGCUAAGGUGGUGGACUUGGACACCGGUAA
30 GACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCCGUGGCCCCAUGAUCAUGAG
CGGCUACGUUAAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUCUCAUCGACAAGGACGGCUGGCU
GCACAGCGGCGACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCUUCGUGGACCG
GCUGAAGAGCCUGAUCAAUACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGGAGAG
35 CAUCCUGCUGCAACACCCCAACAUCUUCGACGCCGGGGUCGCCGGCCUGCCCAGCA
CGAUGCCGGCGAGCUGCCCAGCGCAGUCGUCGUGCUGGAACACGGUAAAACCAUGAC
CGAGAAGGAGAUUCGUGGACUUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCUGCG
CGGUGGUGUUGUGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGC
40 CCGCAAGAUCGCGAGAUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGAUCGCCGUGUA
AY (SEQ ID NO: 1)

ARNm GALT humano:

XAUGUCGCGCAGUGGAACCGAUCCUCAGCAACGCCAGCAGGCGUCAGAGGCGGACGC
 CGCAGCAGCAACCUUCCGGGCAAACGACCAUCAGCAUAUCCGCUACAACCCGCUGCA
 5 GGAUGAGUGGGUGUCUGGUGUCAGCUCACCGCAUGAAGCGGCCCCUGGCAGGGUCAAGU
 GGAGCCCCAGCUUCUGAAGACAGUGCCCCGCCAUGACCCUCUCAACCCUCUGUGUCC
 UGGGGCCAUCCGAGCCAACGGAGAGGUGAAUCCCCAGUACGAUAGCACCUCUCCUGUU
 10 UGACAACGACUUCCAGCUCUGCAGCCUGAUGCCCCAGUCCAGGACCCAGUGAUCA
 UCCCCUUUCCAAGCAAAGUCUGCUCGAGGAGUCUGUAAGGUCAUGUGCUUCCACCC
 CUGGUCGGAUGUAACGCUGCCACUCAUGUCGGUCCUGAGAUCCGGGCUGUUGUUGA
 UGCAUGGGCCUCAGUCACAGAGGAGCUGGGUGCCAGUACCCUUGGGUGCAGAUUU
 15 UGAAAACAAAGGUGCCAUGAUGGGCUGUUCUAACCCCCACCCCCACUGCCAGGUAUG
 GGCCAGCAGUUUCCUGCCAGAUUUGCCCAGCGUGAGGAGCGAUCUCAGCAGGCCUA
 UAAGAGUCAGCAUGGAGAGCCCCUGCUAAUGGAGUACAGCCGCCAGGAGCUACUCAG
 GAAGGAACGUCUGGUCCUAACCAGUGAGCACUGGUUAGUACUGGUCCCCUUCUGGGC
 20 AACAUUGGGCCUACCAGACACUGCUGCUGCCCCGUCGGCAUGUGCGGGCGGUACCUGA
 GCUGACCCUCUGCUGAGCGUGAUGAUCUAGCCUCCAUCAUGAAGAAGCUCUUGACCAA
 GUAUGACAACCUCUUUGAGACGUCUUUCCCUACUCCAUGGGCUGGCAUGGGGCUCC
 CACAGGAUCAGAGGCUGGGGGCAAACUGGAACCAUUGGCAGCUGCACGCUCAUUAUA
 CCCUCCGCUCUCCUGCGCUCUGCCACUGUCCGAAAUUCAUGGUUGGCUACGAAAUGCU
 25 UGCUCAGGCUCAGAGGGACCUCACCCCUGAGCAGGCUGCAGAGAGACUAAGGGCACU
 UCCUGAGGUUCAUUAACCACUGGGGCAGAAGGACAGGGAGACAGCAACCAUCGCCUG
AY (SEQ ID NO: 2)

30
 ARNm de EPO humana:

XAUGGGGGUGCAGGAAUGUCCUGCCUGGCUGUGGCUUCUCCUGUCCUGCUGUCGCU
 CCCUCUGGGCCUCCAGUCCUGGGCGCCCCACCACGCCUCAUCUGUGACAGCCGAGU
 35 CCUGGAGAGGUACCUCUUGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAAUAUCACGACGGGCUGUGC
 UGAACACUGCAGCUUGAAUGAGAAUAUCACUGUCCAGACACCAAAGUUAUUUUCUA
 UGCCUGGAAGAGGAUGGAGGUCGGGCAGCAGGCCGUAGAAGUCUGGCAGGGCCUGGC
 CCUGCUGUCGGAAGCUGUCCUGCGGGGCCAGGCCUGUUGGUCAACUCUCCCAGCC
 40 GUGGGAGCCCCUGCAGCUGCAUGUGGAUAAAAGCCGUCAGUGGCCUUCGCAGCCUCAC
 CACUCUGCUUCGGGCUCUGGGAGCCCAGAAGGAAGCCAUCUCCCCUCCAGAUGC
 CUCAGCUGCUCCACUCCGAACAAUCACUGCUGACACUUUCCGCAAACUCUUCGAGU
 CUACUCCA AUUCCUCCGGGGAAAGCUGAAGCUGUACACAGGGGAGGCCUGCAGGAC
 45 AGGGGACAGAUG**AY** (SEQ ID NO: 3)

Secuencias UTR 5' y 3'
X = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 4)

50 o GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUC CAUAGAAGACACCGG
 GACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUCCCCGUGCC
 55 AAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ ID NO: 5)

Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 6)

60 o CGGGUGGCAUCCCUGUGACCCCUCUCCAGUGCCUCUCCUGGCCUUGGAAGUUGCCAC
 UCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 7)

65
 Protocolo de formulación ejemplar

Se formaron nanopartículas lipídicas (LNP) por medio de métodos de inyección de etanol estándar (Ponsa, M.; Foradada, M.; Estelrich, J. "Liposomes obtained by the ethanol injection method". Int. J. Pharm 1993, 95, 51-56). Las soluciones madre etanólicas de los lípidos se prepararon con anticipación a 50 mg/ml y se almacenaron a -20°C. El ARNm de FFL se almacenó en agua a una concentración final de 1 mg/ml a -80°C hasta el momento del uso. Todas las concentraciones de ARNm se determinaron mediante el ensayo Ribogreen (Invitrogen). La encapsulación del ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1%. Se determinaron los tamaños de partículas (dispersión dinámica de la luz (DLS)) y los potenciales zeta utilizando un instrumento Malvern Zetasizer en 1x PBS y soluciones de KCl 1 mM, respectivamente.

10 *Ejemplo de Formulación 1:*

Se mezclaron alícuotas de 50 mg/ml de soluciones etanólicas del lípido catiónico basado en imidazol ICE, DOPE y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Separadamente, se preparó una solución acuosa tamponada (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de FFL a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8°C. Concentración final = 1,73 mg/ml de ARNm de COFF (encapsulado). Z_{ave} = 68,0 nm ($Dv_{(50)}$ = 41,8 nm; $Dv_{(90)}$ = 78,0 nm). Potencial Zeta = +25,7 mV.

20 *Ejemplo de Formulación 2:*

Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de DLinKC2DMA, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Separadamente, se preparó una solución acuosa tamponada (acetato 10 mM, pH 6,5) de ARNm de FFL a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8°C. Concentración final = 3,47 mg/mL de ARNm de CO-FF (encapsulado). Z_{ave} = 74,3 nm ($Dv_{(50)}$ = 58,6 nm; $Dv_{(90)}$ = 95,2 nm).

30 Todas las formulaciones se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en *el Ejemplo de Formulación 1*, con la excepción de las formulaciones DLinKC2DMA, que se formularon de acuerdo con *el Ejemplo de Formulación 2*. Varias formulaciones de nanopartículas lipídicas ejemplares se describen en la Tabla 1. Todas las proporciones de lípidos son calculadas como porcentaje molar.

35 **Tabla 1.** Formulaciones de nanopartículas lipídicas ejemplares.

Formulación de lípidos (componente total)	Proporción de lípidos (% en moles)	Proporción N/P
C12-200:DOPE:CHOL:DMGPEG2K	40:30:25:5	4
C12-200:DOPE:CHOL:DMGPEG2K	40:30:20:10	4
C12-200:DOPE:CHOL:DMGPEG2K	40:30:20:10	2
C12-200:DOPE:CHOL:DMGPEG2K	25:35:30:10	2
DLin-KC2-DMA:DOPE:CHOL:DMGPEG2K	50:25:20:5	5
DLin-KC2-DMA:DOPE:CHOL:DMGPEG2K	50:20:20:10	5
HGT4003:DOPE:Chol:DMGPEG2K	70:10:10:10	5
HGT4003:DOPE:Chol:DMGPEG2K	25:35:30:10	5
HGT4003:DOPE:Chol:DMGPEG2K	50:25:20:5	5
HGT4003:DOPE:Chol:DMGPEG2K	40:30:20:10	5
ICE:DOPE:DMGPEG2K	90:5:5	16
ICE:DOPE:DMGPEG2K	70:20:10	16
ICE:DOPE:DMGPEG2K	70:25:5	16
ICE:DOPE:DMGPEG2K	90:5:5	8
ICE:DOPE:DMGPEG2K	70:20:10	8
ICE:DOPE:DMGPEG2K	70:25:5	8
DODAP:DOPE:Chol:DMGPEG2K	18:57:20:5	4
DODAP:DOPE:Chol:DMGPEG2K	18:56:20:6	4
DODAP:DOPE:Chol:DMGPEG2K	18:52:20:10	4
DLin-KC2-DMA:C12-200:DOPE:CHOL:DMGPEG2K	30:20:25:20:5	5
C12-200:DOPE:ICE:DMGPEG2K	40:30:20:10	4
C12-200:DOPE:ICE:DMGPEG2K	40:30:20:10	2

Formulación de lípidos (componente total)	Proporción de lípidos (% en moles)	Proporción N/P
C12-200:ICE:DMGPEG2K	20:70:10	4
DODAP:DOPE:ICE:DMGPEG2K	18:57:20:5	4
DODAP:DOPE:ICE:DMGPEG2K	18:37:40:5	4

Formulaciones "mezcladas":

Una porción de una formulación de lípido catiónico se combinó con una alícuota separada de una formulación de lípido catiónico diferente en una relación deseada, en base a las concentraciones de ARNm encapsuladas y se dosificó en consecuencia.

Formulaciones "mixtas":

Una única formulación sintetizada a partir de una solución orgánica previamente combinada de lípidos auxiliares, lípidos PEGilados y múltiples lípidos catiónicos/ionizables no idénticos.

Como se usa en el presente documento, el término "mezcla" se refiere a una combinación de dos o más formulaciones separadas no idénticas. Típicamente, las dos o más formulaciones separadas, no idénticas, se combinan o se mezclan en una composición, tal como, una suspensión, como se representa, por ejemplo, en la FIG. 1. Como se usa en este documento, las formulaciones no idénticas se refieren a formulaciones que contienen al menos un componente lipídico distinto. En algunas realizaciones, las formulaciones no idénticas adecuadas para la mezcla contienen al menos un componente lipídico catiónico distinto. El término "mezcla", como se usa en este documento, se distingue de los términos "mezcla" o "combinación", que se usan en la presente memoria para definir una única formulación que contiene múltiples lípidos catiónicos/ionizables no idénticos, múltiples lípidos auxiliares no idénticos, y/o múltiples lípidos PEGilados no idénticos. En algunas realizaciones, una formulación de "mezcla" contiene al menos dos o más lípidos catiónicos/ionizables no idénticos. Típicamente, una formulación de "mezcla" contiene una única población homogénea de nanopartículas lipídicas.

Ejemplo 2. Protocolo de inyección y ensayos de expresión y biodistribución in vivo.

Protocolo de inyección

Todos los estudios se realizaron usando ratones CD-1 machos o hembras de aproximadamente 6-8 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Las muestras se introdujeron mediante una única administración en bolo de vena de cola o administración intracerebroventricular (ICV) de una dosis total equivalente de ARNm de FFL encapsulado hasta una dosis de 230 microgramos. Cuatro horas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y perfundieron con solución salina.

Aislamiento de tejidos de órganos para el análisis

Se recogió el hígado, el bazo y, cuando fue necesario, el cerebro de cada ratón, se repartió en dos partes y se almacenó en: (1) - formalina tamponada neutra al 10% o; (2) - congelado instantáneamente y almacenado a -80°C para análisis de bioluminiscencia.

Ensayo de bioluminiscencia

Homogeneización de tejidos

El ensayo de bioluminiscencia se realizó usando un Promega Luciferase Assay System (Promega). La preparación del tejido se realizó de la siguiente manera: brevemente, se descongelaron porciones de la muestra de tejido deseada (congelada instantáneamente), se lavó con agua DI y se colocó en un tubo de homogeneización de perlas de cerámica. El tejido se trató con tampón de lisis y se homogenizó. Tras someterse a cinco ciclos de congelación/descongelación seguidos de centrifugación a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifuga y se almacenó a -80°C.

Ensayo de luciferasa

El Reactivo de Ensayo de Luciferasa se preparó añadiendo 10 mL de Tampón de Ensayo de Luciferasa al Sustrato de Ensayo de Luciferasa y se mezcló mediante vórtice. Se cargaron veinte microlitros de cada homogeneizado en una placa de 96 pocillos seguida, junto con 20 microlitros de control de placa. Separadamente, se cargaron 120 microlitros de reactivo de ensayo de luciferasa en cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos y se analizaron usando un instrumento Biotek Synergy 2 para medir la luminiscencia (las mediciones se

registraron en unidades de luz relativa (RLU)).

Ensayo EPO

5 Se detectó la proteína EPO humana a través del sistema de hEPO ELISA (R&D Systems). Se realizaron análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo anti-hEPO MAB2871 (R&D Systems) y proteína EPO humana ultrapura (R&D Systems) como control.

10 **Ejemplo 3. Administración de ARNm de CO-FFL a través de nanopartículas derivadas de lípidos**

10 Para el estudio, a los animales se les inyectó por vía intravenosa una dosis única de ARNm encapsulado y se sacrificaron después de cuatro horas. La actividad de la proteína de luciferasa de luciérnaga expresada en hígados y bazo se determinó usando un ensayo de concentración de bioluminiscencia. Se observó señal detectable sobre la línea de base para cada animal ensayado para determinar la expresión de la proteína de luciferasa de luciérnaga del ARNm exógeno.

15 Como se ilustra en la Figura 2, todas las formulaciones ensayadas proporcionaron una salida de luminiscencia mejorada con respecto a diferentes controles (por ejemplo, nanopartículas lipídicas no encapsuladas por FFL-ARNm, nanopartículas vacías y PBS). En la Tabla 2 se presenta una representación detallada de los valores brutos del producto de luminiscencia (expresado como la mediana de RLU/mg de proteína total) de la proteína luciferasa de luciérnaga detectada en los hígados de ratones 4 horas después de la administración de una dosis única de las formulaciones lipídicas en la Tabla 2 abajo. Los controles utilizados en el presente estudio incluyeron una nanopartícula lipídica catiónica basada en C12-200 que encapsula un ARNm no fluorescente (dosis de 30 µg) y vehículo PBS.

25

Tabla 2. Salida de luminiscencia de la proteína CO-FFL en ratones con hígado

Formulación de lípidos (componente catiónico)	Dosis de ARNm de CO-FFL encapsulado (ug)	Salida luminiscente media (RLU/mg de proteína)
C12-200	30	2.770.000
DLin-KC2-DMA	90	2.280.000
HGT4003	200	2.420.000
ICE	200	557.000
DODAP	200	14.000
*C12-200 (Control)	30	500
PBS (Control/No lípidos)	--	100

* Control C12-200 - Es una nanopartícula lipídica catiónica basada en C12-200 encapsulada 30 ug de ARNm que codifica una proteína no fluorescente
 -- = Sin control de lípidos

40

45 **Ejemplo 4. La mezcla de dos nanopartículas lipídicas separadas, no idénticas, conduce a una mejora sinérgica de la expresión**

45 Con el fin de evaluar la eficacia de transfección de diversas formulaciones de encapsulación lipídica de CO-FFL ARNm, tanto las mezclas como las combinaciones de diversas formulaciones de nanopartículas lipídicas, así como las nanopartículas lipídicas constituyentes individuales se prepararon y se ensayaron por su capacidad para transfectar y expresar ARNm en diversas células y tejidos diana (según lo determinado por la luminiscencia de la proteína luciferasa de luciérnaga) *in vivo*.

50

55 Específicamente, se prepararon dos formulaciones de nanopartículas lipídicas que encapsulan FFL ARNm y que comprende o bien C12-200 o DLin-KC2-DMA como el lípido catiónico de acuerdo con el protocolo de formulación descrita en el Ejemplo 1 (tales formulaciones se denominan aquí como Formulación 1 y 2, respectivamente). Se preparó una tercera formulación de nanopartículas lipídicas que encapsulaba el ARNm de FFL que comprendía una mezcla de los lípidos catiónicos C12-200 y DLin-KC2-DMA en una única nanopartícula lipídica (denominada aquí Formulación 3). Finalmente, se preparó una cuarta formulación de nanopartículas lipídicas que comprendía una mezcla de Formulaciones 1 y 2 en una relación 1:3 basada en la dosis de ARNm de FFL encapsulado (denominado en este documento Formulación 4). La Tabla 3 representa el (los) componente(s) lipídico(s) catiónico(s) de las Formulaciones 1, 2, 3 y 4, así como la dosis total de ARNm de FFL encapsulado.

60

Tabla 3. Intensidad de fluorescencia hepática para formulaciones de lípidos simples, mezclados y combinados

Formulación	Lípido (componente catiónico)	Dosis de ARNm de FFL encapsulado (ug)	Salida luminiscente media (RLU/mg de proteína)
Nº 1	C12-200	30	2.770.000
Nº 2	DLin-KC2-DMA	90	2.280.000
Nº 3	C12-200/DLin-KC2- DMA "Mezcla"	30	1.530.000
Nº 4	"Mezcla" de Formulaciones Nº1 y Nº3	120	46.800.000

Los valores brutos de la luminiscencia media se producen a partir de la proteína FFL en hígados de ratones después del tratamiento con nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de FFL que demuestran la diferencia entre una formulación "mixta" frente a una formulación "mezclada". La formulación nº 3 representa una única formulación de lípidos catiónicos "mixtos" (dosis de 30 µg) mientras que la formulación nº 4 representa una "mezcla" de formulaciones nº 1 y nº 2 como proporción 1:3 (basada en la dosis de ARNm encapsulado). Los valores se representan como RLU media/mg de proteína total en hígado cuatro horas después de la administración.

Los animales se inyectaron por vía intravenosa (a través de una inyección en la vena de la cola) con una dosis única de ARNm de FFL encapsulada en las Formulaciones 1, 2, 3 o 4 y se sacrificaron después de cuatro horas. La actividad del ARNm de luciferasa de luciérnaga expresada en los hígados y bazos de los animales se determinó en un ensayo de bioluminiscencia. Se observó una señal detectable sobre la línea de base en cada animal probado, deduciendo la expresión del ARNm de FFL encapsulado administrado exógenamente y la producción correspondiente de la proteína de luciferasa de luciérnaga.

Se evaluó una comparación de la salida de luminiscencia de la proteína FFL expresada en el hígado tras la administración a través de diversas nanopartículas liposómicas. La luminiscencia de una única formulación variaba en intensidad en función del lípido catiónico empleado. Tal luminiscencia también puede depender de (pero no exclusivamente) la composición lipídica, el contenido total de lípidos y la dosis. Todas las formulaciones probadas, sin embargo, produjeron un rendimiento de luz mejorado con respecto a diferentes controles (nanopartículas cargadas de ARNm no FFL, nanopartículas vacías, PBS, etc.) (Figura 2). Una representación más detallada de la salida luminiscente (valores brutos) de estas formulaciones se enumera en la Tabla 3.

Como se muestra en la Tabla 3, la mezcla de diferentes lípidos catiónicos dentro de una única formulación (C12-200, DLin-KC2-DMA) todavía permite la administración con éxito del ARNm deseado en el tejido diana con la producción total comparable de la proteína (en base a la producción de RLU medida de la proteína FFL) en comparación con la formulación basada en C12-200 o DLin-KC2-DMA. Sin embargo, al mezclar dos formulaciones separadas, no idénticas, se observó una mejora sinérgica (no aditiva) en la producción de luz (Figura 3, Tabla 3). Específicamente, como se enumera en la Tabla 3, cuando se mezcla una nanopartícula lipídica basada en C12-200 que encapsula el ARNm de FFL (Formulación nº 1) con una nanopartícula de lípidos cargada con ARNm de FFL basada en DLin-KC2-DMA (Formulación nº 2). Relación 1:3 (30 ug FFL ARNm: 90 ug FFL ARNm, respectivamente), se observa un valor medio de RLU de $46,8 \times 10^6$ RLU/mg de proteína (Formulación nº 4). Esto se compara con un valor de aditivo esperado de $5,05 \times 10^6$ RLU/mg de proteína, basado en la suma de cada formulación ensayada individualmente ($2,77 \times 10^6$ y $2,28 \times 10^6$ RLU/mg de proteína para la Formulación Nº 1 y Nº 2, respectivamente (Figura 3, Tabla 3)). Al administrar una mezcla de las dos formulaciones, se logra un rendimiento luminiscente 9 veces mayor (es decir, una producción más eficaz de la proteína deseada).

Por el contrario, la simple mezcla de dos lípidos dentro de una nanopartícula lipídica no dio lugar a ninguna mejora observable (Formulación nº 3, Tabla 3). Por ejemplo, una dosis de 30 µg de una nanopartícula de lípidos mixta C12-200/DLin-KC2-DMA FFL cargada con ARNm produjo un rendimiento luminiscente comparable, aunque menor, que una nanopartícula lipídica cargada con ARNm C12-200 o DLin-KC2-DMA FFL sola ($1,53 \times 10^6$ RLU/mg de proteína frente a $2,77 \times 10^6$ y $2,28 \times 10^6$ RLU/mg de proteína, respectivamente) (Figura 3, Tabla 3). Al dosificar tal "mezcla" a 120 ug, la formulación resultante fue letal. Es digno de mención que la mezcla de dos formulaciones separadas a esta dosis (120 ug) fue bien tolerada en ratones después de 4 horas.

El efecto de la mezcla, se evaluó adicionalmente usando dos mezclas de lípidos CO-FFL de ARNm adicionales: C12-200/ICE FFL y DODAP FFL/ICE. Cuando la formulación mixta C12-200/ICE FFL se dosificó a 30 µg, la producción luminiscente media resultante fue de $2,71 \times 10^6$ RLU/mg de proteína, comparable a una formulación de lípidos basada en C12-200 individual ($2,77 \times 10^6$ RLU/mg de proteína). La formulación mixta DODAP/ICE FFL dio como resultado una producción media de 7.300 RLU/mg de proteína en comparación con una formulación única basada en DODAP (~14.000 RLU/mg de proteína). Como se indicó anteriormente, una formulación mixta ha producido resultados comparables a las formulaciones basadas en lípidos catiónicos

individuales pero no mejoradas.

Ejemplo 5. Sinergia observada a través de una variedad de diferentes mezclas de nanopartículas lipídicas

5 Este ejemplo demuestra que la sinergia observada en el Ejemplo 4 no está limitada a formulaciones específicas mezcladas. De hecho, esta sinergia se observa a través de una amplia variedad de diferentes nanopartículas lipídicas mezcladas en diversas proporciones. Los resultados ejemplares de diferentes experimentos se resumen en la Tabla 4.

10 Específicamente, se prepararon múltiples formulaciones de nanopartículas lipídicas que encapsulan FFL ARNm y que comprende o bien C12-200, Dlin-KC2-DMA, ICE, DODAP o HGT4003 como el lípido catiónico de acuerdo con el protocolo de formulación descrito en el Ejemplo 1, y posteriormente se mezcló en diversas proporciones para preparar la formulación de nanopartículas lipídicas mezcladas (Tabla 4). Además, las formulaciones de lípidos designadas como "(A)" comprenden una concentración del 5% del lípido modificado con PEG DMG-PEG2000, mientras que las formulaciones de lípidos designadas como "(B)" comprenden un 10% de DMG-PEG2000. Los animales se inyectaron por vía intravenosa (a través de una inyección en la vena de la cola) con una única dosis en embolada de ARNm de FFL encapsulada en una formulación de lípidos mezclados de la formulación de lípidos constituyente y se sacrificaron después de cuatro horas. La actividad del ARNm de luciferasa de luciérnaga expresada en el hígado se determinó en un ensayo de bioluminiscencia. Incrementa el rango de 1,1-10 veces la luminiscencia sobre la suma de cada formulación individual respectiva que demuestra una mejora sinérgica.

25 Como se muestra en la Tabla 4, cada combinación dio como resultado un aumento de la luminiscencia cuando se administra el ARNm de FFL en comparación con la suma de la producción de sus formulaciones individuales. Los Experimentos N^{os} 1-4 (Tabla 4) fueron similares a lo que se ha descrito anteriormente (Ejemplo 4). Los resultados mostrados en la Tabla 4 también indican que al variar los parámetros de formulación (porcentaje de PEG) para cada nanopartícula, se puede ajustar y controlar con eficacia la cantidad de potencia sinérgica. Además, esta mejora sinérgica en la producción de proteínas puede verse afectada o adaptada por la composición lipídica (distinta de los lípidos PEGilados) y el contenido total de lípidos.

30 Otro ejemplo de potenciación sinérgica que usa diferentes formulaciones de lípidos catiónicos está representado por el Experimento n^o 8. Cuando se combina una nanopartícula de lípidos basada en HGT4003 con ARNm de FFL con una nanopartícula de lípidos basada en ICE con ARNm de FFL en una relación 1:1 (100 µg de ARNm encapsulado: 100 µg de ARNm encapsulado, respectivamente), se observa un valor de proteína medio de RLU/mg de 4,39 x 10⁵. Esto se compara con un valor de aditivo esperado de 2,77 x 10⁵ RLU/mg de proteína, basado en la suma de cada formulación probada individualmente ((2,53 x 10⁵ y 2,40 x 10⁴ RLU/mg de proteína, respectivamente (Tabla 4, Figura 4)).

40 Otro factor es la relación a la que se mezclan las formulaciones. Como se representa en la Figura 4, dos formulaciones que encapsulan el ARNm de FFL se dosifican individualmente y como mezclas que emplean dos relaciones de mezcla diferentes, 1:1 y 3:1 (HGT4003:ICE) (Tabla 4, Experimento N^o8 y N^o9, respectivamente). Mientras que se observa un aumento sinérgico en la luminiscencia para ambas mezclas, se observa una mejora mucho mayor cuando las dos formulaciones se mezclan en una proporción de 3:1 (HGT4003:ICE). Las formulaciones mezcladas en una proporción de 1:1 produjeron una mejora de 1,59 veces sobre la suma de sus contrapartes individuales, mientras que las formulaciones mezcladas en una proporción de 3:1 proporcionaron una mejora aproximada de 4,4 veces.

50 Los resultados descritos en este documento demuestran que la mezcla de dos nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm FFL separadas permite mecánicamente la producción de más proteínas FFL en el hígado del ratón de una manera sinérgica que en comparación con sus contrapartes separadas. Sin desear estar sujeto a ninguna teoría, se contempla que las posibles explicaciones para la sinergia incluyen: a) rutas no competitivas de entrada celular, b) combinación de diferentes mecanismos de tráfico intracelular (proton-sponge vs. fusogenicidad, c) "fusión endosomal" que combina propiedades de liberación del fármaco con propiedades de liberación endosomal (es decir, una célula puede absorber ambas nanopartículas separadas y a medida que se procesan a través de la vía endosomal, los endosomas se fusionan y luego un conjunto de lípidos potencia al otro en términos de liberación de ARNm), d) modulación de las vías inhibitorias activas que permiten una mayor absorción de nanopartículas.

Tabla 4. Diversas mezclas de lípidos y nanopartículas catiónicas y potenciación sinérgica de la luminiscencia de la proteína CO-FFL en el hígado

Experimento	Formulación de lípidos n° 1 (ARNm de FFL)	Proteína RLU/mg de Formulación n° 1	Formulación de lípidos n° 2 (ARNm de FFL)	Proteína RLU/mg de Formulación n° 2	Proporción	Dosis total (ug ARNm)	Proteína RLU/mg de mezcla	Incremento de veces en luminiscencia
1	C12-200 (A)	200.526	DLin-KC2-DMA (A)	47.231	1:3	120	775.275	3,12
2	C12-200 (A)	1.299.758	DLin-KC2-DMA (B)	26.661	1:3	120	2.523.496	1,90
3	C12-200 (B)	396.134	DLin-KC2-DMA (A)	47.231	1:3	120	1.766.473	3,98
4	C12-200 (B)	396.134	DLin-KC2-DMA (B)	26.661	1:3	120	1.673.159	3,96
5	C12-200 (A)	1.062.038	ICE	---2	1:6.67	230	4.325.041	3,98
6	C12-200 (A)	2.101.685	DODAP	12.000 ^c	1:3	120	1.985.508	0
7	DLin-KC2-DMA (A)	1.634.139	DODAP	12.000 ^c	3:1	120	2.650.865	1,61
8	HGT4003	252.884	ICE	24.134	1:1	200	439.228	1,59
9	HGT4003	---4	ICE	---4	3:1	200	1.225.835	4,43 ^d
10	ICE	24.134	DODAP	7.649	1:1	200	105.230	3,31

Resumen de la mejora sinérgica de la luminiscencia de la proteína FFL en hígados de ratones tratados (N = 4) cuatro horas después de la administración cuando se mezclan dos nanopartículas lipídicas cargadas con mRNA fluorescente por separado (ARNm de FFL). Incrementa el rango de 1,1- 10x la luminiscencia sobre la suma de cada formulación individual respectiva que demuestra una mejora sinérgica. Los lípidos enumerados representan el componente lipídico catiónico de cada formulación. Una formulación de (A) consiste en 5% de DMGPEG2K mientras que (B) incorpora 10% de DMGPEG2K en la formulación. Los valores son representativos de la mejora observable cuatro horas después de la administración. a. No dosificado como formulación separada este experimento. b. El aumento del doblez se determina usando el valor promedio para la formulación de ICE previamente medida. c. Luminiscencia de datos históricos del experimento anterior. d. Incremento de veces en base a la comparación del Experimento 8 como proporción 1:1.

Ejemplo 6. El efecto sinérgico es independiente del ácido nucleico incorporado

Esta potenciación sinérgica de la producción de luz es incluso más evidente cuando se sustituyen las nanopartículas lipídicas de ARNm (no FFL) "dummy" no fluorescentes como un componente de combinación. Específicamente, se llevaron a cabo experimentos representativos que incorporan ARNm que codifica transferasa de uridilo de galactosa-1-fosfato (GALT) como componente no fluorescente para demostrar que la noción de sinergia con respecto a mezclas de formulaciones separadas es independiente del ácido nucleico incorporado (Figura 5).

La Figura 5 ilustra una comparación de la luminiscencia media observada cuando se estudian formulaciones mezcladas que encapsulan ARNm fluorescente (FFL) y no fluorescente (GALT). Las formulaciones de nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 se administraron a una dosis de 30 µg de ARNm, mientras que las formulaciones de nanopartículas lipídicas basadas en DLin-KC2-DMA se administraron a una dosis de 90 µg de ARNm. Las formulaciones mezcladas se administraron ambas a dosis de 120 µg de ARNm total. Como se ilustra en la Figura 5, se observó una luminiscencia media mejorada en ambas formulaciones combinadas con respecto a la luminiscencia observada cuando se administran individualmente las nanopartículas lipídicas constituyentes.

La Tabla 5 enumera algunos ejemplos representativos de diversos sistemas catiónicos basados en lípidos que demuestran una producción sintética de proteína FFL cuando incorporan un mensaje GALT no fluorescente en una de las formulaciones.

Como puede verse en la Tabla 5, la sinergia es evidente a través de una gama de lípidos catiónicos empleados (C12-200, DLin-KC2-DMA, HGT4003, ICE, DODAP, etc., Tabla 5). En algunos casos, se observan mejoras de más de 30 veces más altas que las formulaciones individuales administradas por separado (Tabla 5, Experimento N° 14). Esto fue evidente cuando se mezcló una formulación del ARNm de FFL que encapsulaba el lípido HGT4003 basado en disulfuro con una formulación basada en C12-200 que encapsulaba ARNm de GALT (Tabla 5, Experimento 17). La RLU media observada medida en los hígados de ratones cuatro horas después de la administración fue de $8,38 \times 10^6$ RLU para la combinación en comparación con $3,85 \times 10^5$ RLU de la nanopartícula cargada con ARNm de FFL basada en HGT4003 de forma independiente. Se observó una fluorescencia de fondo insignificante para todos los grupos de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm GALT no fluorescentes.

Otro ejemplo de potenciación sinérgica observada cuando se combina una nanopartícula lipídica cargada con ARNm de FFL con una nanopartícula lipídica cargada con ARNm de GALT se representa en el Experimento n° 18 (Tabla 5). Una mezcla de una nanopartícula lipídica basada en ICE con carga de ARNm de FFL con una nanopartícula de lípidos DLin-KC2-DMA cargada con ARNm GALT no fluorescente (relación 1:1 basada en la dosis de ARNm encapsulado) produjo una RLU/mg media observada. valor de proteína de $1,84 \times 10^5$. Esto se compara con un valor de $3,76 \times 10^4$ RLU/mg de proteína para la formulación basada en ICE con carga de ARNm de FFL administrada de forma independiente. Dicha mezcla proporcionó una mejora aproximada de 4,85 veces en la salida luminiscente.

Por lo tanto, los experimentos mostrados en la Tabla 5 demuestran claramente que la mejora sinérgica con respecto a la producción de luz no depende de que *ambas* nanopartículas tengan un mensaje fluorescente incorporado, lo que sugiere que los efectos sinérgicos con respecto a la mezcla de formulaciones lipídicas separadas son independientes del ácido nucleico incorporado.

Tabla 5. Diversas mezclas catiónicas de lípidos y nanopartículas y mejora sinérgica de la luminiscencia de la proteína CO-FFL en el hígado

Experimento	Formulación de lípidos n° 1 (ARNm de FFL)	Proteína RLU/mg de Formulación n° 1	Formulación de lípidos n° 2 (ARNm de GALT)	Proporción	Dosis total (ug ARNm)	Proteína RLU/mg de mezcla	Incremento de veces en luminiscencia
11	C12-200	6.866.021	DLin-KC2-DMA	1:3	120	23.752.692	3,46
12	C12-200	32.560.660	HGT4003	1:3.33	130	51.323.277	1,58
13	DLin-KC2-DMA	4.983.048	C12-200	3:1	120	22.124.581	4,41
14	DLin-KC2-DMA	255.921	ICE	1:1	200	7.711.698	30,10
15	DLin-KC2-DMA	1.382.039	HGT4003	1:1	120	1.555.411	1,13
16	HGT4003	137.068	DLin-KC2-DMA	1:1	120	305.285	2,22
17	HGT4003	385.110	C12-200	3.33:1	130	8.376.000	21,72
18	ICE	37.571	DLin-KC2-DMA	1:1	200	184.322	4,85
19	ICE	68.562	DODAP	1:1	200	69.480	1,01
20	DODAP	8.425	ICE	1:1	200	18.736	2,20
21	C12-200	50.500.335	DODAP	1:5	150	29.515.643	0
22	DODAP	25.745	C12-200	5:1	150	22.064.370	857

Resumen de la mejora sinérgica de la luminiscencia de la proteína FFL en hígados de ratones tratados (N = 4) cuatro horas después de la administración cuando se mezcla una nanopartícula lipídica cargada con mRNA fluorescente (ARNm de FFL) con una nanopartícula lipídica cargada de mRNA no fluorescente (ARNm de GALT). Incrementa el rango de 0 a 30x de luminiscencia en comparación con la formulación única que demuestra una mejora sinérgica. Las proporciones enumeradas son representativas de la dosis de formulación fluorescente:dosis de formulación no fluorescente. Los lípidos enumerados representan el componente lipídico catiónico de cada formulación. Los valores se basan en la mejora observable cuatro horas después de la administración.

- 5 A continuación examinamos si el efecto sinérgico con respecto a la combinación de diferentes formulaciones de lípidos depende de la presencia de ARN mensajero. Con ese fin, se ensayaron nanopartículas liposómicas vacías (sin ningún ARNm encapsulado) como posibles agentes sinérgicos. Curiosamente, la combinación de una nanopartícula lipídica catiónica con base en C12-200 vacía con una nanopartícula lipídica catiónica basada en DLin-KC2-DMA cargada con ARNm de FFL dio como resultado una fuerte mejora sinérgica de la luminiscencia (aumento de 4 veces) (Figura 6, Tabla 6, Experimento n° 24) mientras que las respectivas nanopartículas C12-200 inversas (cargadas de ARNm de FFL con la mezcla de nanopartículas liposómicas DLin-KC2-DMA vacías) no produjeron una mejora (Figura 6, Tabla 6 (Experimento n° 23)).
- 10 Estos resultados indican que el efecto sinérgico puede depender de la presencia del mensaje, al menos en algunos casos. Sin desear estar ligado a ninguna teoría particular, se contempla que dos posibles mecanismos específicos de lípidos pueden estar conduciendo a un efecto sinérgico con o sin la presencia de ARNm.

Tabla 6. Efecto de la encapsulación de ARNm en la mejora de la mezcla

Experimento	Formulación de lípidos n° 1 (ARNm de FFL)	Proteína RLU/mg de Formulación n° 1	Formulación de lípidos n° 2 (ARNm de GALT)	Proporción	Dosis total (ug ARNm)	Proteína RLU/mg de mezcla	Incremento de veces en luminescencia
23	C12-200	6.407.934	DLin-KC2-DMA	1:3	120	3.940.501	0
24	DLin-KC2-DMA	5.694.440	C12-200	3:1	120	23.272.244	4,09

Ejemplo 7. Efecto sinérgico de nanopartículas derivadas de liposomas a través de la administración de ICV

Como se muestra en los ejemplos anteriores, se ha observado el aumento sinérgico en la producción de proteína en el hígado en múltiples sistemas cuando los artículos de prueba se han administrado por vía intravenosa como se describe (*vide supra*). Se considera que el efecto sinérgico puede aplicarse aún más, no solo a enfermedades específicas del hígado, sino a cualquier lugar donde se requiera tratamiento, es decir, pulmón, bazo, riñón, corazón, ojo, sistema nervioso central, cerebro, etc. Para confirmar esto, el presente ejemplo demuestra una potenciación sinérgica de la luminiscencia de la proteína FFL cuando se administra una combinación de dos nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de FFL separadas mediante administración intracerebroventricular (ICV).

Como se muestra en la Figura 7, las nanopartículas lipídicas encapsuladas por ARNm FFL basadas en C12-200 mezcladas con nanopartículas lipídicas basadas en DLin-KC2-DMA cargadas en FFL ARNm en una proporción de 1:3 (basada en dosis de ARNm) dio lugar a un aumento de aproximadamente 2,0 veces de la luminiscencia de la proteína FFL en comparación con la suma de la producción luminiscente de cada formulación individual ($1,11 \times 10^5$ RLU vs $5,57 \times 10^4$ RLU, respectivamente). Para evaluar si las formulaciones combinadas eran capaces de demostrar una mejora sinérgica de la luminiscencia observada en las células y tejidos del sistema nervioso central, se llevaron a cabo estudios adicionales en los que se administraron formulaciones combinadas a animales mediante la vía de administración intracerebroventricular (ICV). En particular, se evaluó la mejora sinérgica en la expresión de ARNm exógeno administrado por ICV encapsulado en una formulación de nanopartículas lipídicas mezcladas y la producción correspondiente de la proteína de luciferasa de luciérnaga codificada de ese modo (demostrada por la potencia luminiscente media mejorada) comparando la mediana salida de luminiscencia observada después de la administración de ICV de las formulaciones de lípidos mezclados a la salida observada de la luminiscencia media observada después de la administración de ICV de las formulaciones de nanopartículas lipídicas constituyentes individuales.

Ejemplo 8. Mejora sinérgica de la expresión de proteínas secretadas

Este ejemplo demuestra que el fenómeno sinérgico también se aplica a la idea de un efecto de "depósito" para la secreción de una proteína deseada en el torrente sanguíneo. Por ejemplo, el suministro de ARNm que codifica la eritropoyetina humana (EPO) se puede empaquetar a través de una nanopartícula lipídica y se puede inyectar en un ratón. La formulación puede acumularse dentro del hígado y/u otros órganos y transcribir el ARNm a la proteína EPO deseada. Tras su expresión, la proteína puede secretar desde el hígado (órgano) y funcionar según sea necesario.

Esta noción se ensayó usando una nanopartícula lipídica basada en C12-200 cargada con ARNm de EPO humana, una nanopartícula lipídica basada en DLin-KC2-DMA cargada con ARNm de EPO humana y una combinación de las dos formulaciones en diversas relaciones. La EPO humana completamente secretada se detectó mediante ELISA y análisis de inmunotransferencia (Figuras 8 y 9, respectivamente) cuatro horas después de la administración intravenosa de estas nanopartículas en ratones. Además, tras el tratamiento con una combinación de las dos formulaciones individuales, se observó una potenciación sinérgica de la proteína EPO humana secretada en el torrente sanguíneo en comparación con la suma de cada contraparte de la formulación individual (Figura 8). Esta mejora fue más pronunciada tras la mezcla en una proporción de 1:3 (~2 veces) en comparación con 1:1 (~1,4 veces) (formulación basada en C12-200: formulación basada en DLin-KC2-DMA).

Este aumento sinérgico de la producción de proteínas es más pronunciado cuando se analiza por transferencia Western. Como se representa en la Figura 9, una mezcla de una nanopartícula lipídica basada en C12-200 cargada con ARNm de EPO humana con una nanopartícula lipídica DLin-KC2-DMA análoga muestra una banda fuerte (carril 4) significativa de proteína EPO humana aislada del suero cuatro horas después de la administración. El carril correspondiente a una formulación individual C12-200 (carril 2) produce una banda detectada moderadamente mientras que la formulación basada en DLin-KC2-DMA (carril 3) es indetectable. Se puede observar *cualitativamente* una mejora de la producción de proteínas en comparación con el "total de aditivos" de cada formulación individual.

Estas observaciones confirman que este fenómeno sinérgico no es específico de un sistema de luciferasa, pero puede ser aplicable a otras proteínas diana en general. Además, como se demuestra en el Ejemplo 7, el fenómeno sinérgico se observa no solo por vía intravenosa en el hígado, sino también por administración intracerebroventricular al cerebro. Además de administrar a órganos diana específicos, la combinación de dos formulaciones puede potenciar sinérgicamente la producción de proteínas secretadas como se demostró con nuestro sistema humano de EPO.

La mejora sinérgica presentada aquí sugiere que se puede lograr una eficacia terapéutica equivalente mediante la administración de una dosis significativamente inferior a la anticipada previamente. La capacidad de crear una producción sinérgica de proteínas a través de la administración de ARNm de nanopartículas basadas en lípidos permite una ventana terapéutica mucho mayor para el tratamiento de una serie de enfermedades. El suministro con éxito de dicho ARNm al hígado y, en particular, a los hepatocitos, puede usarse para el tratamiento y

la corrección de errores de metabolismo innato que se localizan en el hígado. Enfermedades tales como ASD y OTC entre otros trastornos del ciclo de la urea pueden tratarse a través de la terapia de ARNm del gen faltante. La zonación metabólica del ciclo de la urea a los hepatocitos significa que proporcionar la enzima faltante en estas células debería mejorar en gran medida el procesamiento bioquímico normal en individuos con estos trastornos. Para lograr esto de forma sinérgica a través del proceso descrito anteriormente, se podría administrar una dosis mucho más baja (~ 2 a 30 veces menor) y lograr una eficacia igual o mayor al mediar cualquier evento adverso o tóxico.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Translate Bio, Inc.
- <120> MEJORA SINERGICA DE LA ADMINISTRACION DE ACIDOS NUCLEICOS MEDIANTE FORMULACIONES MEZCLADAS
- 15 <130> P072421EP
- <140> No asignado todavía
- <141> 2014-03-14
- 20 <150> EP14721647.7
- <151> 2014-03-14
- <150> PCT/US2014/028498
- 25 <151> 2014-03-14
- <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
- <211> 1653
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> nucleótido sintetizado químicamente
- <400> 1
- 40

ES 2 795 249 T3

	auggaagaug ccaaaaacau uaagaagggc ccagcgccau ucuacccacu cgaagacggg	60
	accgccggcg agcagcugca caaagccaug aagcgcuacg cccuggugcc cggcaccauc	120
5	gccuuuaccg acgcacauau cgagguggac auuaccuacg ccgaguacuu cgagaugagc	180
	guucggcugg cagaagcuau gaagcgcuau gggcugaaua caaaccaucg gaucguggug	240
10	ugcagcgaga auagcuugca guucuucaug cccguguugg gugcccuguu caucggugug	300
	gcuguggccc cagcuaacga caucuacaac gagcgcgagc ugcugaacag caugggcauc	360
15	agccagccca ccgucguauu cgugagcaag aaagggcugc aaaagaucuu caacgugcaa	420
	aagaagcuac cgaucauaca aaagaucauc aucauggaua gcaagaccga cuaccagggc	480
20	uuccaaagca uguacaccuu cgugacuucc cauuugccac cgggcuucaa cgaguacgac	540
	uucgugcccg agagcuucga cccgggacaaa accaucgccc ugaucaugaa caguaguggc	600
25	aguaccggau ugcccgaagg cguagccua cgcaccgca cgcuuugugu ccgauucagu	660
	caugcccgcg accccaucuu cggcaaccag aucauccccg acaccgcuau ccucagcgug	720
30	gugccauuuc accacggcuu cggcauguuc accacgcugg gcuacuugau cugcggcuuu	780
	cgggucgugc ucauguaccg cuucgaggag gagcuauucu ugcgcagcuu gcaagacuau	840
35	aagauucaau cugcccugcu ggugcccaca cuauuuagcu ucuucgcuaa gagcacucuc	900
	aucgacaagu acgaccuaag caacuugcac gagaucgcca gcgcgggggc gccgcucagc	960
40	aaggagguag gugaggccgu ggccaaacgc uuccaccuac caggcauccg ccagggcuac	1020
	ggccugacag aaacaaccag cgccauucug aucacccccg aaggggacga caagccuggc	1080
45	gcaguaggca agguggugcc cuucuucgag gcuaaggugg uggacuugga caccgguaag	1140
	acacugggug ugaaccagcg cggcgagcug ugcguccgug gcccacugau caugagcggc	1200
50	uacguuaaca accccgaggc uacaaacgcu cucaucgaca aggacggcug gcugcacagc	1260
	ggcgacaucg ccuacuggga cgaggacgag cacuucuuca ucguggaccg gcugaagagc	1320
55	cugaucaau acaagggcua ccagguagcc ccagccgaac uggagagcau ccugcugcaa	1380
	cacccaaca ucuucgacgc cggggucgcc ggccugcccg acgacgaugc cggcgagcug	1440
60	cccgccgag ucgucgugcu ggaacacggu aaaaccauga ccgagaagga gaucguggac	1500
	uauguggcca gccagguuac aaccgccaag aagcugcgcg gugguguugu guucguggac	1560
65	gaggugccua aaggacugac cggcaaguug gacgcccgca agauccgcca gauucucauu	1620
	aaggccaaga agggcggcaa gaucgcccug uaa	1653
	<210> 2	
	<211> 1140	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 795 249 T3

<220>

<223> nucleótido sintetizado químicamente

<400> 2

5
 augucgcgca guggaaccga uccucagcaa cgccagcagg cgucagagggc ggacgccgca 60
 gcagcaaccu uccgggcaaa cgaccaucag cauauccgcu acaacccgcu gcaggauagag 120
 10
 ugggugcugg ugucagcuca ccgcaugaag cggcccuggc agggucaagu ggagccccag 180
 cuucugaaga cagugccccg ccaugacccu cucaaccuc uguguccugg ggccauccga 240
 15
 gccaacggag aggugaaucc ccaguacgau agcaccuucc uguuugacaa cgacuuccca 300
 gcucugcagc cugaugcccc caguccagga cccagugauc aucccccuuu ccaagcaaag 360
 ucugcucgag gagucuguaa ggucaugugc uuccaccccu ggucggaugu aacgcugcca 420
 20
 cucaugucgg ucccugagau ccgggcuguu guugaugcau gggccucagu cacagaggag 480
 cuggggugccc aguaccuuug ggugcagauc uuugaaaaca aaggugccau gaugggcugu 540
 25
 ucuaaccccc acccccacug ccagguaugg gccagcaguu uccugccaga uauugcccag 600
 cgugaggagc gaucucagca ggccuauaag agucagcaug gagagccccu gcuaauggag 660
 30
 uacagccgcc aggagcuacu caggaaggaa cgucuggucc uaaccaguga gcacugguua 720
 guacuggucc ccuucugggc aacauggccc uaccagacac ugcugcugcc ccgucggcgu 780
 gugcggcggc uaccugagcu gaccccugcu gagcgugaug aucuagccuc caucaugaag 840
 35
 aagcucuuga ccaaguauga caaccucuuu gagacguccu uucccuacuc caugggcugg 900
 cauggggcuc ccacaggau agagggcugg gccaacugga accauuggca gcugcacgcu 960
 40
 cauuaquacc cuccgcuccu ggcgucugcc acuguccgga aauncauggu uggcuacgaa 1020
 augcuugcuc aggcucagag ggaccucacc ccugagcagg cugcagagag acuaagggca 1080
 45
 cuuccugagg uucauuacca ccuggggcag aaggacaggg agacagcaac caucgccuga 1140

<210> 3

<211> 582

<212> ARN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> nucleótido sintetizado químicamente

55 <400> 3

ES 2 795 249 T3

5 **augggggugc acgaaugucc ugccuggcug uggcuucucc ugucccugcu gucgcucccu** 60
 cugggccucc caguccuggg cgtcccacca cgccucaucu gugacagccg aguccuggag 120
 10 **agguaccucu uggaggccaa ggaggccgag aauaucacga cgggcugugc ugaacacugc** 180
 agcuugaaug agaauaucac ugucccagac accaaaguua auuucuaugc cuggaagagg 240
 auggaggucg ggcagcaggg cguagaaguc uggcagggcc uggcccugcu gucggaagcu 300
 guccugcggg gccaggcccu guuggucaac ucuucccagc cgugggagcc ccugcagcug 360
 cauguggaua aagccgucag uggccuucgc agccucacca cucugcuucg ggcucuggga 420
 15 **gcccagaagg aagccaucuc ccuccagau gcgccucag cugcuccacu ccgaacaauc** 480
 acugcugaca cuuuccgcaa acucuuccga gucuacucca auuuccuccg gggaaagcug 540
 20 **aagcuguaca caggggaggg cugcaggaca ggggacagau ga** 582

25 <210> 4
 <211> 11
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> nucleótido sintetizado químicamente

 <400> 4
 gggauccuac c 11

35 <210> 5
 <211> 140
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> nucleótido sintetizado químicamente

 <400> 5

45 **ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac** 60

cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120

50 **gacucaccgu ccuugacacg** 140

55 <210> 6
 <211> 8
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> nucleótido sintetizado químicamente

 <400> 6
 uuugaauu 8

65 <210> 7
 <211> 100

ES 2 795 249 T3

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> nucleótido sintetizado químicamente

<400> 7

10 **cggguggcau cccugugacc ccucuccagu gccucuccug gccuggaag uugccacucc 60**
agugcccacc agccuugucc uaauaaaauu aaguugcauc 100

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición farmacéutica para la administración de uno o más polinucleótidos encapsulados a una o más células diana, dicha composición comprendiendo un ARNm como un primer polinucleótido encapsulado y una mezcla de por lo menos una primera nanopartícula lipídica y una segunda nanopartícula lipídica, en donde la primera nanopartícula lipídica encapsula el ARNm; y en donde la primera nanopartícula lipídica comprende por lo menos un lípido distinto de la segunda nanopartícula lipídica.
- 10 **2.** La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la segunda nanopartícula lipídica comprende un segundo polinucleótido encapsulado que es (i) idéntico al ARNm en la primera nanopartícula lipídica o (ii) no idéntico al ARNm en la primera nanopartícula lipídica.
- 15 **3.** La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde la administración es para tratar un trastorno o deficiencia, y en donde el primer y el segundo polinucleótido encapsulados funcionan mediante un mecanismo de acción diferente.
- 4.** La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde el segundo polinucleótido encapsulado es un ARNip.
- 20 **5.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde por lo menos un lípido distinto es un lípido catiónico, opcionalmente en donde el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste de C12-200, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenoil-3-trimetilamonio propano), DLinDMA, DLin-KC2-DMA, HGT4003 (2-((2,3-Bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propilo)disulfanilo)-N,N-dimetiletanamina) e ICE (éster de imidazol-colesterol).
- 25 **6.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera nanopartícula lipídica y la segunda nanopartícula lipídica comprenden:
- 30 (i) uno o más lípidos auxiliares, opcionalmente en donde el uno o más lípidos auxiliares se seleccionan del grupo que consiste de DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DOPE (1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), 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)) y colesterol, o
- 35 (ii) uno o más lípidos modificados con PEG, opcionalmente en donde el uno o más lípidos modificados con PEG comprende una cadena de poli(etilen)glicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido que comprende una o más cadenas de alquilo de C₆-C₂₀ de longitud.
- 7.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera nanopartícula lipídica o la segunda nanopartícula lipídica comprende (i) DLinDMA, CHOL, DOPE y DMG-PEG-2000, (ii) C12-200, CHOL, DOPE y DMG-PEG-2000, (iii) DLinKC2, CHOL, DOPE y DMG-PEG-2000, (iv) uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste de ICE, DSPC, CHOL, DODAP, DOTAP y C8-PEG-2000, (v) DSPC, CHOL, DODAP y C8-PEG-2000, (vi) ICE, DOPE y DMG-PEG-2000, o (vii) HGT4003, DOPE, CHOL y DMG-PEG-2000.
- 40 **8.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ARNm codifica:
- 45 (i) una enzima, opcionalmente en donde la enzima se secreta de una o más células diana;
- (ii) una proteína que se secreta de la célula diana; o
- (iii) un polipéptido que se expresa aberrantemente por el sujeto, opcionalmente en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste de agalsidasa alfa, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, beta-glucosidasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, glucocerebrosidasa, heparan sulfamidasa, hialuronidasa, galactocerebrosidasa, ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamato-fosfato sintetasa 1 (CPS1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL) y arginasa 1 (ARG1);
- 50 opcionalmente, en donde el ARNm se selecciona de la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3.
- 9.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ARNm comprende una modificación química, opcionalmente en donde
- 60 (i) la modificación química hace que el ARNm sea más estable;
- (ii) la modificación química comprende una modificación de bloqueo terminal de una región 5' no traducida del ARNm;
- (iii) la modificación química comprende una modificación de bloqueo terminal de una región 3' no traducida del ARNm;
- 65 (iv) la modificación química comprende la inclusión de una secuencia parcial de un gen CMV inmediato-temprano

1 (IE1) en la región 5' no traducida del ARNm;

(v) la modificación química comprende la inclusión de una cola de poli A en la región 3' no traducida del ARNm;

(vi) la modificación química comprende la inclusión de una estructura Cap1 en la región 5' no traducida del ARNm; o

5 (vii) la modificación química comprende la inclusión de una secuencia que codifica la hormona de crecimiento humano (hGH) en la región 3' no traducida del ARNm.

10 **10.** La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación de la primera nanopartícula lipídica a la segunda nanopartícula lipídica en la composición farmacéutica es de aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1 o aproximadamente 4:1.

11. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso como medicamento.

15 **12.** La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el ARNm se administra a células diana seleccionadas del grupo que consiste de hepatocitos, células epiteliales, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células de pulmón, células óseas, células madre, células mesenquimales., células neurales, células cardíacas, adipocitos, células del músculo liso vascular, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células beta, células pituitarias, células del revestimiento sinovial, células ováricas, células testiculares, fibroblastos, células B, células T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos y células tumorales, opcionalmente en donde
20 la administración de la composición da como resultado la expresión del ARNm en las células diana.

13. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde la expresión del ARNm después de la administración de la composición farmacéutica a un sujeto excede la expresión del ARNm administrado con la primera nanopartícula lipídica pero sin la segunda nanopartícula lipídica, opcionalmente en
25 donde la expresión del ARNm después de la administración de la composición farmacéutica al sujeto excede la expresión del ARNm administrado con la primera nanopartícula lipídica pero sin la segunda nanopartícula lipídica en por lo menos aproximadamente dos veces, por lo menos aproximadamente cinco veces o por lo menos aproximadamente diez veces.

30 **14.** La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la composición farmacéutica se administra a un sujeto mediante una o más de las siguientes vías de administración: intravenosa, oral, rectal, vaginal, transmucosal, sublingual, subdural, nasal, intramuscular, subcutánea, inyección intramedular, intratecal, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, intracerebroventricular (ICV), oftálmica e
35 intraocular.

Representación esquemática de una formulación "mezcla"

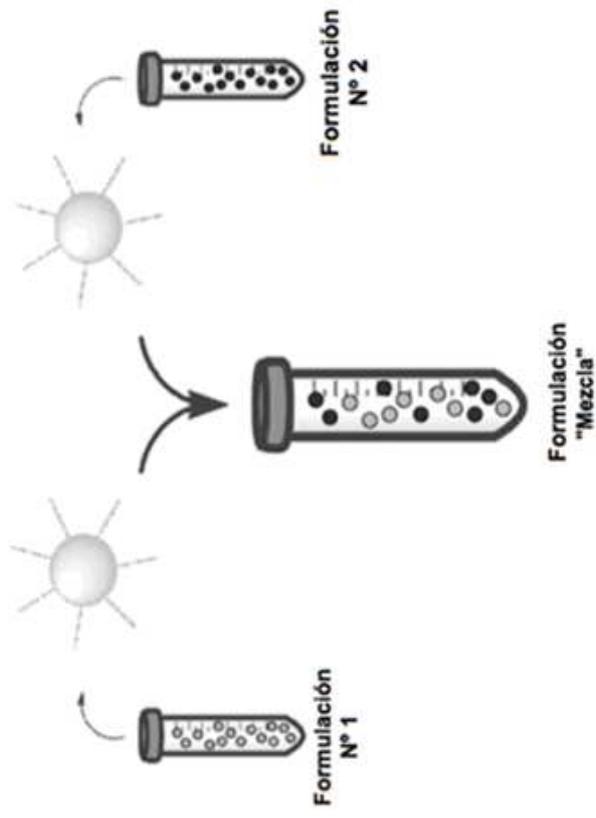


Figura 1

Salida de luminiscencia en hígado de ratón tras administración de CO-FFL ARNm por nanopartículas derivadas de lípidos

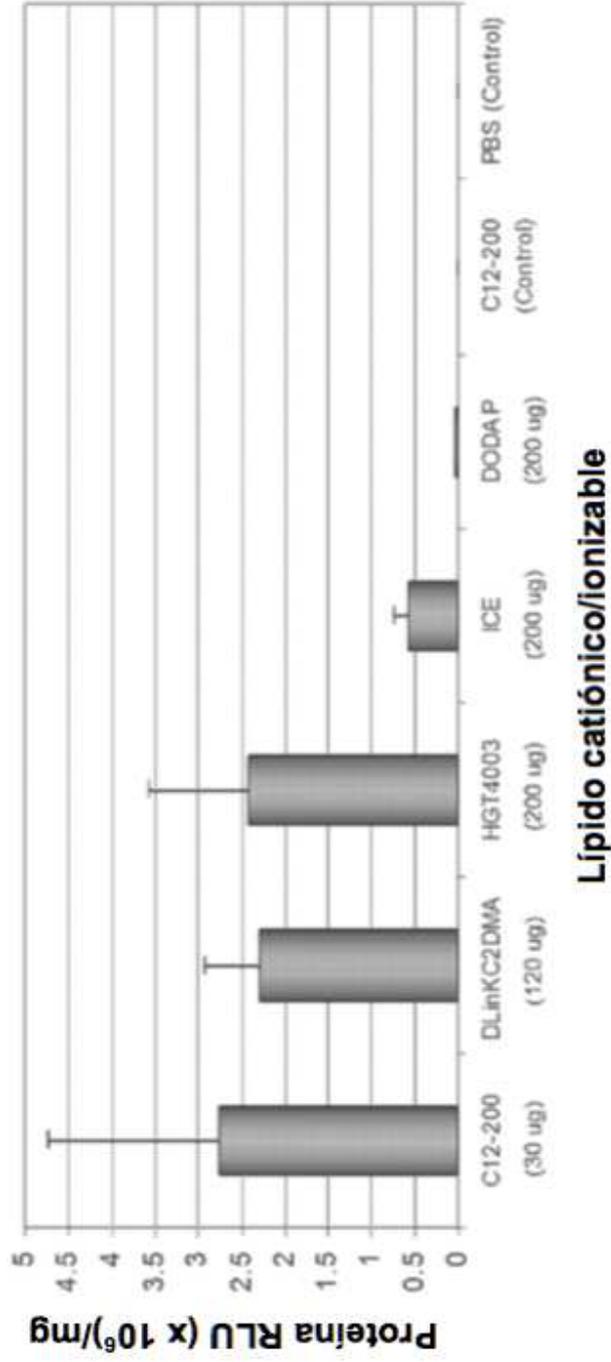


Figura 2

Salida de luminiscencia en hígado de ratón tras administración de CO-FFL ARNm por nanopartículas derivadas de lípidos mezcladas y combinadas

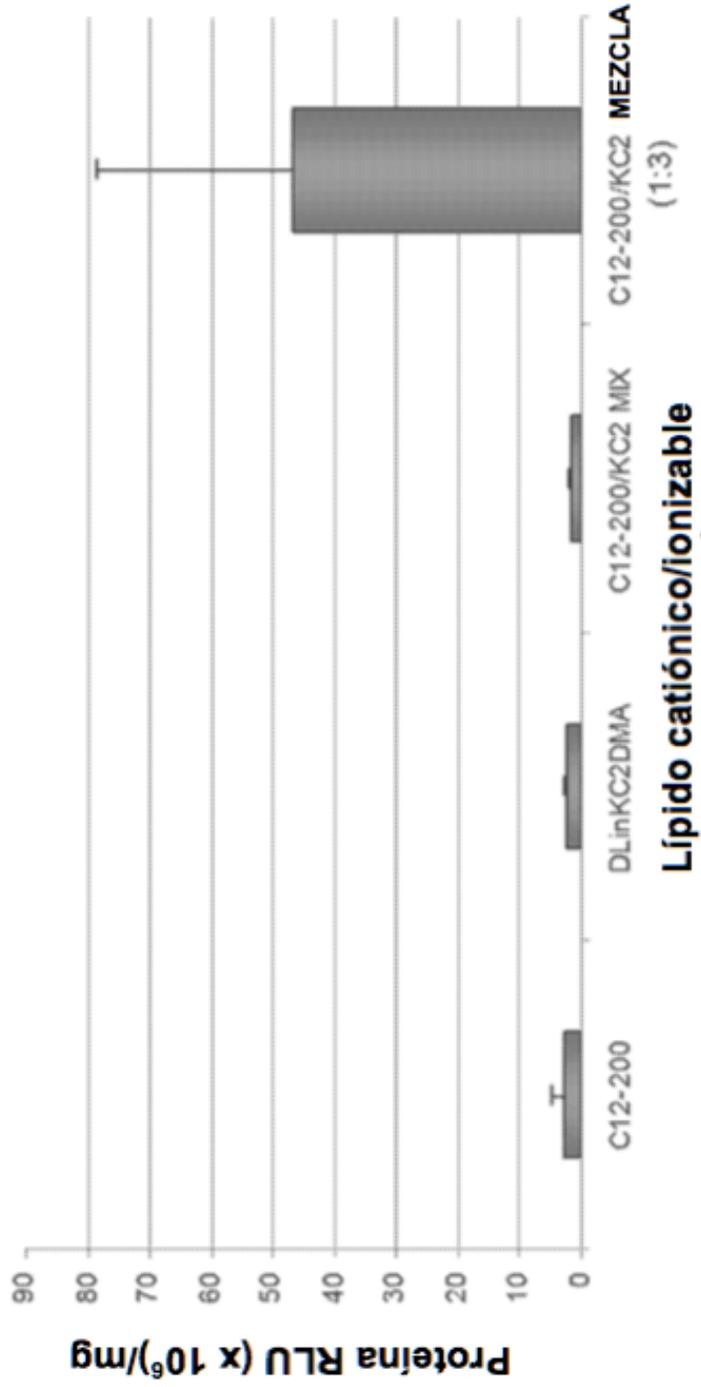


Figura 3

Salida de luminiscencia en hígado de ratón tras administración de CO-FFL ARNm usando diferentes proporciones de mezcla

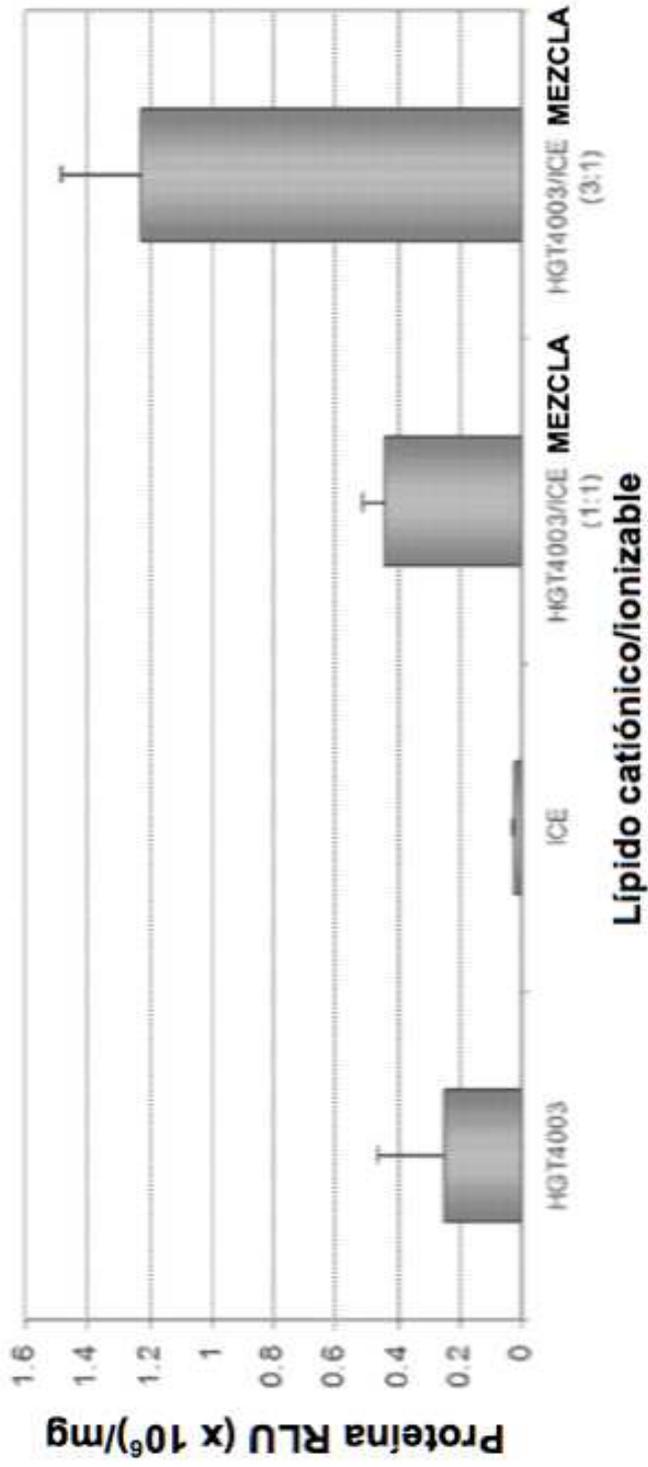
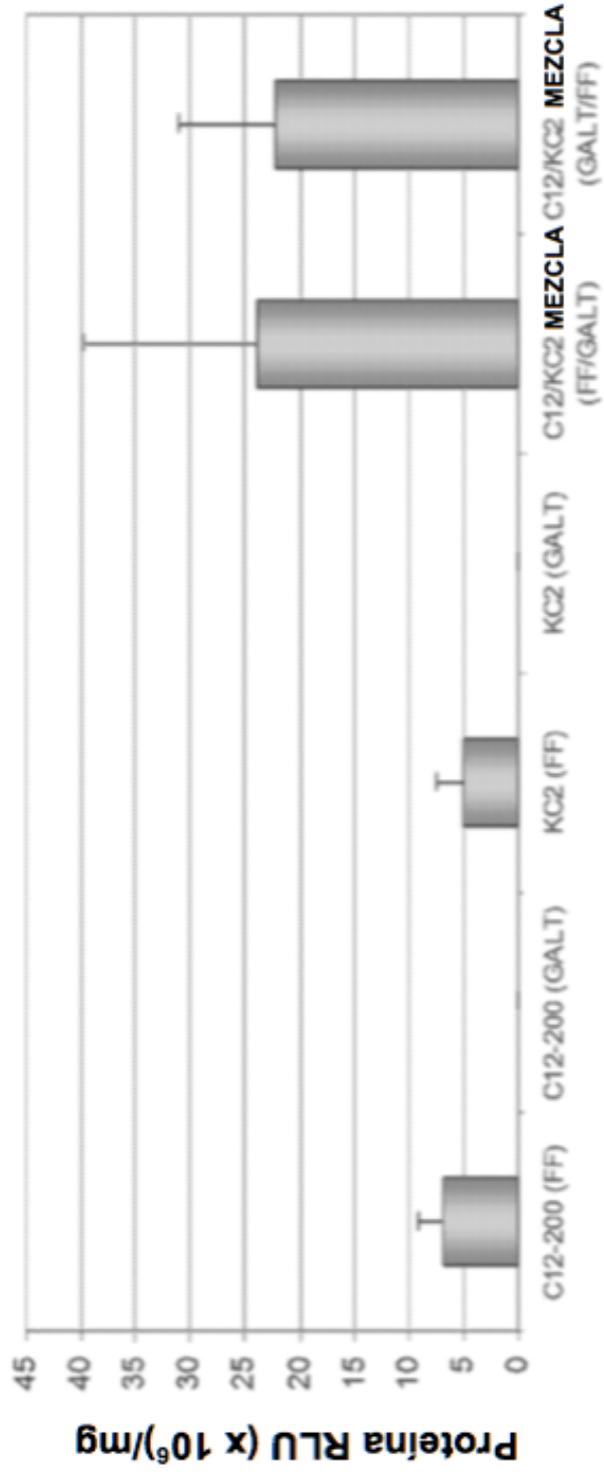


Figura 4

Comparación de luminiscencia para formulaciones de mezcla que encapsulan CO-FFL ARNm y GALT ARNm



Lípido catiónico/ionizable

Figura 5

Comparación de luminiscencia para formulaciones de mezcla que encapsulan FFL ARNm con nanopartículas de lípidos vacíos

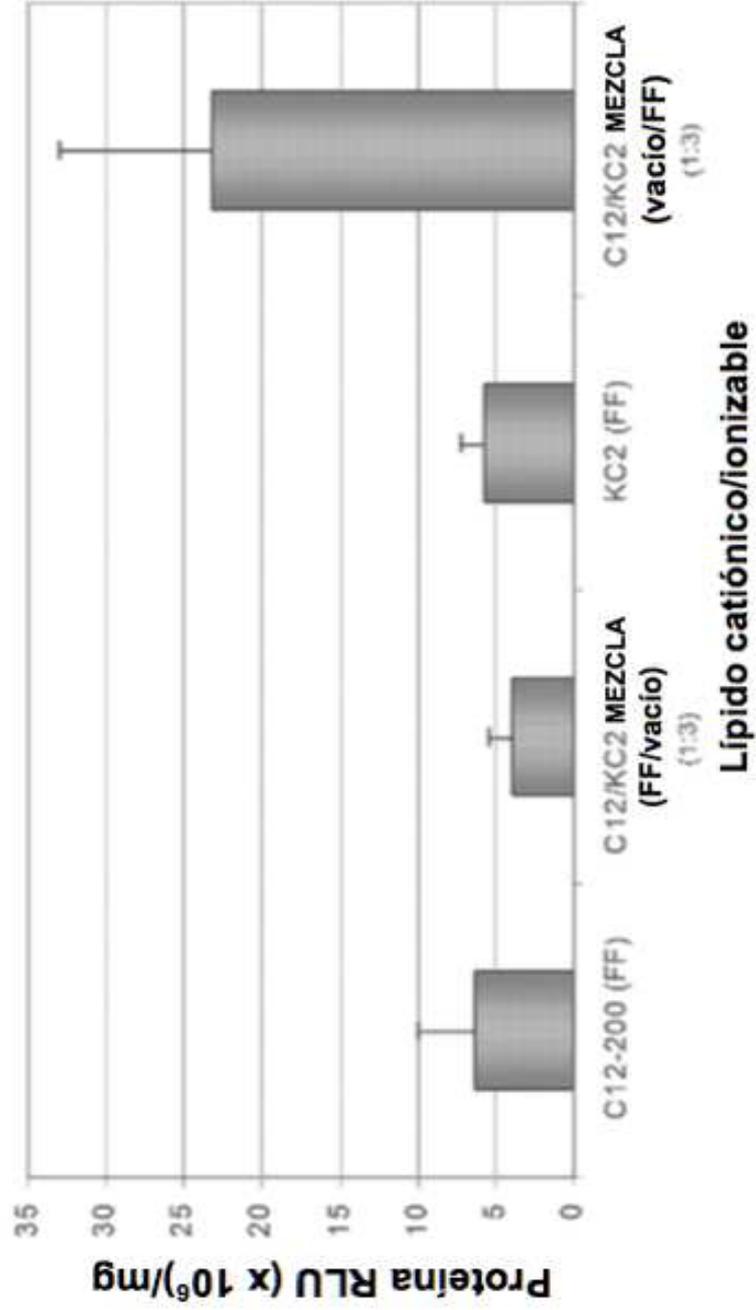


Figura 6

Salida de luminiscencia de proteina de CO-FFL en cerebro de ratón tras administración ICV

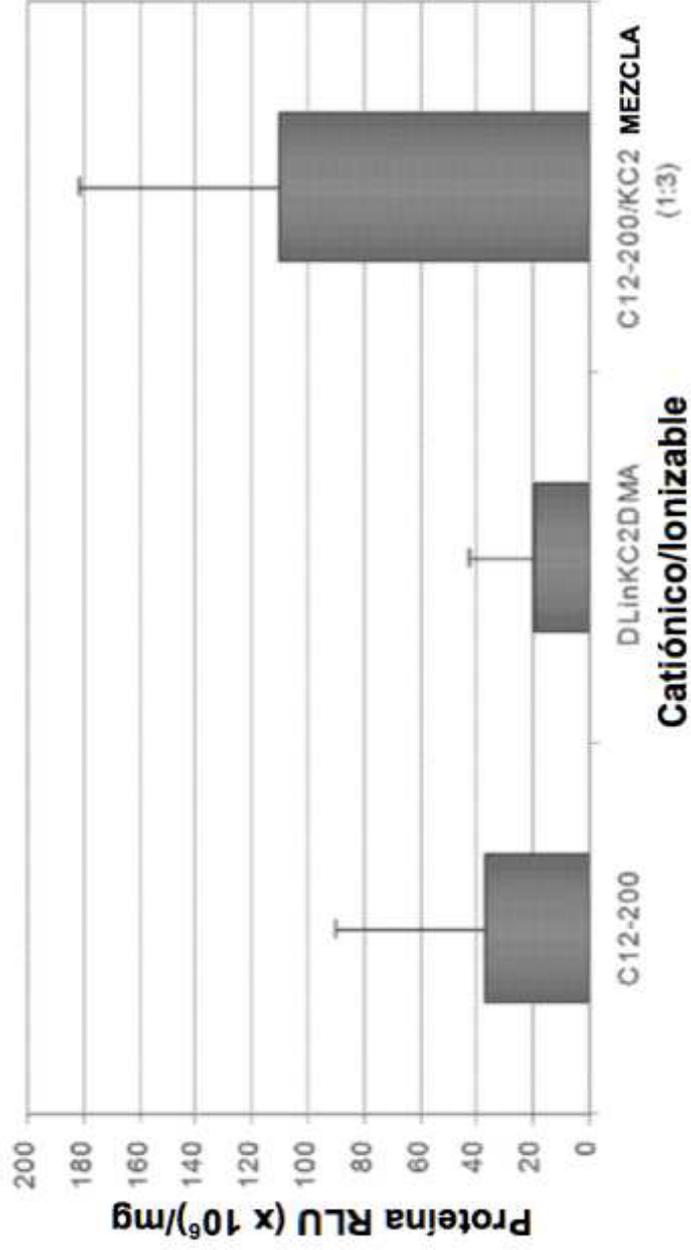


Figura 7

Comparación de EPO humana secretada tras administración IV de nanopartículas lipídicas cargadas con EPO ARNm

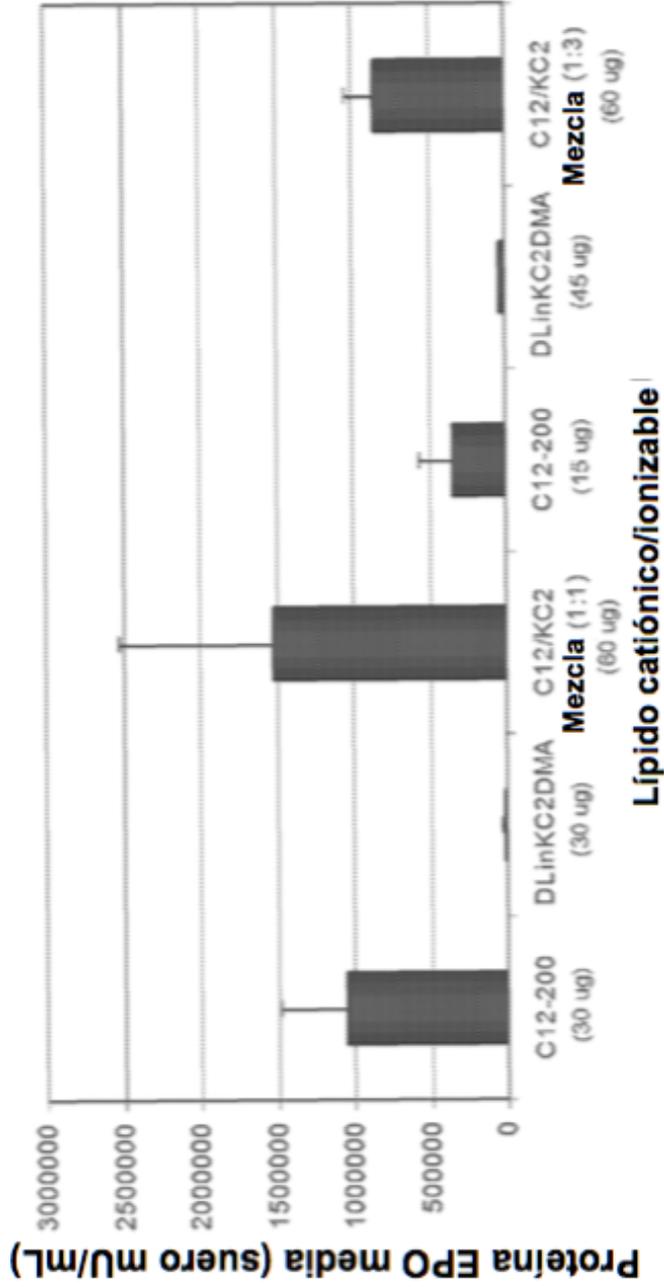


Figura 8

Detección de inmunotransferencia de proteína EPO humana en suero tras la administración IV de nanopartículas lipídicas mezcladas

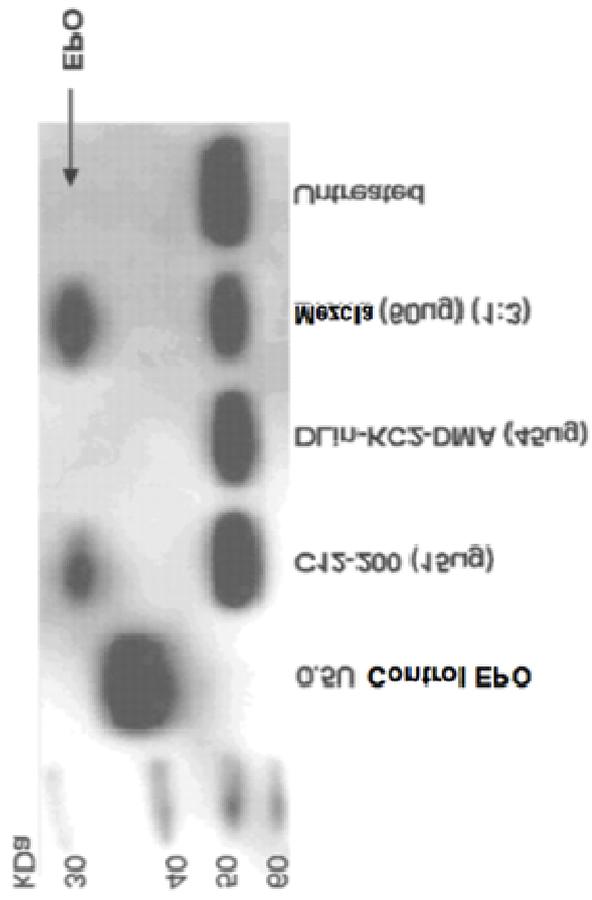


Figura 9