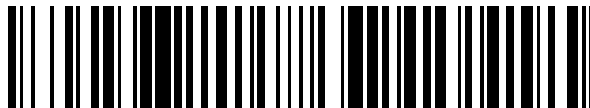


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 911 653**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/131** (2006.01)  
**A61K 31/132** (2006.01)  
**A61K 31/215** (2006.01)  
**A61K 31/56** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 38/47** (2006.01)  
**A61P 3/08** (2006.01)  
**C12N 9/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 19172992 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022 EP 3586861**

54 Título: **Composiciones de nanopartículas lipídicas y métodos para el suministro de ARNm**

30 Prioridad:

**08.06.2011 US 201161494881 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.05.2022**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 911 653 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

Composiciones de nanopartículas lipídicas y métodos para el suministro de ARNm

5 Todavía se necesitan nuevos enfoques y terapias para el tratamiento de las deficiencias de proteínas y enzimas. Por ejemplo, las enfermedades de almacenamiento lisosomal son un grupo de aproximadamente 50 trastornos metabólicos hereditarios raros que resultan de defectos en la función lisosomal, generalmente debido a una deficiencia de una enzima necesaria para el metabolismo. La enfermedad de Fabry es una enfermedad de almacenamiento lisosomal que resulta de una deficiencia de la enzima alfa galactosidasa (GLA), que hace que un glicolípido conocido como globotriaosilceramida se acumule en los vasos sanguíneos y otros tejidos, lo que provoca diversas manifestaciones dolorosas. Para ciertas enfermedades, como la enfermedad de Fabry, existe la necesidad de reemplazar una proteína o enzima que normalmente secretan las células en el torrente sanguíneo. Las terapias, tal como la terapia génica, que aumentan el nivel o la producción de una proteína o enzima afectada podrían proporcionar un tratamiento o incluso una cura para tales trastornos. Sin embargo, ha habido varias limitaciones en el uso de la terapia génica convencional para este propósito.

15 La terapia génica convencional implica el uso de ADN para la inserción de la información genética deseada en las células huésped. El ADN introducido en la célula suele estar integrado hasta cierto punto en el genoma de una o más células transfectadas, lo que permite una acción duradera del material genético introducido en el huésped. Si bien puede haber beneficios sustanciales para dicha acción sostenida, la integración de ADN exógeno en el genoma del huésped también puede tener muchos efectos nocivos. Por ejemplo, es posible que el ADN introducido se inserte en un gen intacto, dando como resultado una mutación que impida o incluso elimine totalmente la función del gen endógeno. Por lo tanto, la terapia génica con ADN puede resultar en el deterioro de una función genética vital en el huésped tratado, tal como por ejemplo, la eliminación o la producción perjudicialmente reducida de una enzima esencial o la interrupción de un gen crítico para la regulación del crecimiento celular, lo que resulta en la proliferación de células no regulada o cancerosa. Además, con la terapia génica basada en ADN convencional, es necesario que la expresión eficaz del producto génico deseado incluya una secuencia promotora fuerte, que de nuevo puede conducir a cambios no deseados en la regulación de la expresión génica normal en la célula. También es posible que el material genético basado en el ADN provoque la inducción de anticuerpos anti-ADN no deseados, lo que a su vez puede desencadenar una respuesta inmunitaria posiblemente letal. Los enfoques de terapia génica que utilizan vectores virales también pueden provocar una respuesta inmunitaria adversa. En algunas circunstancias, el vector viral puede incluso integrarse en el genoma del huésped. Además, la producción de vectores virales de grado clínico también es costosa y requiere mucho tiempo. Dirigir el suministro del material genético introducido usando vectores virales también puede ser difícil de controlar. Por lo tanto, mientras que la terapia génica basada en ADN se ha evaluado para el suministro de proteínas secretadas utilizando vectores virales (patente de los Estados Unidos No. 6,066,626; US2004/0110709), estos enfoques pueden estar limitados por estas diversas razones.

35 Otro obstáculo evidente en estos enfoques previos en la administración de ácidos nucleicos que codifican proteínas secretadas está en los niveles de proteína que finalmente se producen. Es difícil alcanzar niveles significativos de la proteína deseada en la sangre y las cantidades no se mantienen en el tiempo. Por ejemplo, la cantidad de proteína producida por el suministro de ácido nucleico no alcanza los niveles fisiológicos normales. Véase por ejemplo, el documento US2004/0110709.

40 En contraste con el ADN, el uso de ARN como agente de terapia génica es sustancialmente más seguro porque (1) el ARN no implica el riesgo de integrarse de manera estable en el genoma de la célula transfectada, eliminando así la preocupación de que el material genético introducido altere el funcionamiento normal de un gen esencial, o provoque una mutación que produzca efectos nocivos u oncogénicos; (2) no se requieren secuencias promotoras extrañas para la traducción eficaz de la proteína codificada, evitando de nuevo posibles efectos secundarios nocivos; (3) en contraste con el ADN plasmídico (ADNp), el ARN mensajero (ARNm) está desprovisto de motivos CpG inmunogénicos, por lo que no se generan anticuerpos anti-ARN; y (4) cualquier efecto nocivo que resulte del ARNm basado en la terapia génica sería de duración limitada debido a la vida media relativamente corta del ARN. Además, no es necesario que el ARNm ingrese al núcleo para realizar su función, mientras que el ADN debe superar esta importante barrera.

50 Una de las razones por las que la terapia génica basada en ARNm no se ha usado más en el pasado es que el ARNm es mucho menos estable que el ADN, especialmente cuando llega al citoplasma de una célula y se expone a enzimas degradantes. La presencia de un grupo hidroxilo en el segundo carbono de la fracción de azúcar en el ARNm provoca un impedimento estérico que evita que el ARNm forme la estructura de doble hélice más estable del ADN y, por lo tanto, hace que el ARNm sea más propenso a la degradación hidrolítica. Como resultado, hasta hace poco tiempo, se creía ampliamente que el ARNm era demasiado lábil para soportar los protocolos de transfección. Los avances en las modificaciones estabilizadoras del ARN han despertado un mayor interés en el uso del ARNm en lugar del ADN plasmídico en la terapia génica. Ciertos vehículos de suministro, tal como los vehículos de suministro lipídicos o poliméricos catiónicos, también pueden ayudar a proteger el ARNm transfectado de las RNasas endógenas. Sin embargo, a pesar de la mayor estabilidad del ARNm modificado, el suministro de ARNm a las células *in vivo* de una manera que permita niveles terapéuticos de producción de proteínas sigue siendo un desafío, particularmente para el ARNm que codifica proteínas de longitud completa. Si bien se ha contemplado el suministro de ARNm que codifica proteínas secretadas (documento US2009/0286852), los niveles de una proteína secretada de longitud completa que

en realidad se produciría a través del suministro de ARNm *in vivo* no se conocen y no hay razón para esperar que los niveles excedan los observados con la terapia génica basada en ADN.

Hasta la fecha, solo se ha logrado un progreso significativo con el uso de la terapia génica de ARNm en aplicaciones para las que los bajos niveles de traducción no han sido un factor limitante, tales como la inmunización con antígenos que codifican ARNm. Los ensayos clínicos que involucran la vacunación contra antígenos tumorales mediante inyección intradérmica de ARNm desnudo o complejado con protamina han demostrado viabilidad, falta de toxicidad y resultados prometedores. X. Su et al., *Mol. Pharmaceutics* 8: 774-787 (2011). Desafortunadamente, los bajos niveles de traducción han restringido en gran medida la explotación de la terapia génica basada en ARNm en otras aplicaciones que requieren niveles más altos de expresión sostenida de la proteína codificada por ARNm para ejercer un efecto biológico o terapéutico.

La invención proporciona métodos para la administración de ARNm como se define en la reivindicación 1 que conducen a la producción de niveles terapéuticamente efectivos de proteínas secretadas a través de un "efecto de depósito". En realizaciones de la invención, el ARNm que codifica una proteína secretada se carga en nanopartículas lipídicas y se suministra a las células diana *in vivo*. Luego, las células diana actúan como una fuente de depósito para la producción de proteína secretada soluble en el sistema circulatorio a niveles terapéuticos. En algunas realizaciones, los niveles de proteína secretada producidos están por encima de los niveles fisiológicos normales.

La invención proporciona composiciones y métodos para el suministro intracelular de ARNm en un vehículo de transferencia liposomal a una o más células diana para la producción de niveles terapéuticos de proteína funcional secretada.

Las composiciones y métodos de la invención son útiles en el manejo y tratamiento de enfermedades que resultan de deficiencias de proteínas y/o enzimas, en las que normalmente se secreta la proteína o la enzima. Las personas que padecen tales enfermedades pueden tener defectos genéticos subyacentes que conducen a la expresión comprometida de una proteína o enzima, lo que incluye, por ejemplo, la no síntesis de la proteína secretada, la síntesis reducida de la proteína secretada o la síntesis de una proteína secretada que carece o que tiene una menor actividad biológica.

Las composiciones de la invención comprenden un ARNm, un vehículo de transferencia y, opcionalmente, un agente para facilitar el contacto y la subsiguiente transfección de una célula diana. El ARNm codifica la  $\alpha$ -galactosidasa (por ejemplo, la  $\alpha$ -galactosidasa humana (GLA humana)).

En algunas realizaciones, el ARNm puede comprender una o más modificaciones que confieren estabilidad al ARNm (por ejemplo, en comparación con una versión nativa o de tipo silvestre del ARNm) y también puede comprender una o más modificaciones relativas al tipo silvestre que corrigen un defecto implicado en la expresión aberrante asociada de la proteína. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la presente invención pueden comprender modificaciones en una o ambas regiones no traducidas 5' y 3'. Dichas modificaciones pueden incluir, pero sin limitarse a, la inclusión de una secuencia parcial de un gen inmediato temprano 1 (IE1) del citomegalovirus (CMV), una cola de poli A, una estructura Cap1 o una secuencia que codifica la hormona del crecimiento humano (hGH). En algunas realizaciones, el ARNm se modifica para disminuir la inmunogenicidad del ARNm.

El ARNm en las composiciones de la invención se formula en un vehículo de transferencia liposomal para facilitar el suministro a la célula diana. Los vehículos de transferencia contemplados comprenden uno o más lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos modificados con PEG. Por ejemplo, el vehículo de transferencia puede comprender al menos uno de los siguientes lípidos catiónicos: C12-200, DLin-KC2-DMA, DODAP, HGT4003, ICE, HGT5000 o HGT5001. En realizaciones, el vehículo de transferencia comprende colesterol (col) y un lípido modificado con PEG. En algunas realizaciones, los vehículos de transferencia comprenden DMG-PEG2K. En ciertas realizaciones, el vehículo de transferencia comprende una de las siguientes formulaciones de lípidos: C12-200, DOPE, chol, DMG-PEG2K; DODAP, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K; HGT5000, DOPE, chol, DMG-PEG2K, HGT5001, DOPE, chol, DMG-PEG2K.

En realizaciones, la proteína secretada es producida por la célula diana durante cantidades de tiempo sostenidas. Por ejemplo, la proteína secretada puede producirse durante más de una hora, más de cuatro, más de seis, más de 12, más de 24, más de 48 horas o más de 72 horas después de la administración. En algunas realizaciones, el polipéptido se expresa en un nivel máximo aproximadamente seis horas después de la administración. En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido se mantiene al menos a un nivel terapéutico. En algunas realizaciones, el polipéptido se expresa al menos a un nivel terapéutico durante más de uno, más de cuatro, más de seis, más de 12, más de 24, más de 48 horas o más de 72 horas después de la administración. En algunas realizaciones, el polipéptido es detectable al nivel del suero o tejido del paciente (por ejemplo, hígado o pulmón). En algunas realizaciones, el nivel de polipéptido detectable proviene de la expresión continua de la composición de ARNm durante períodos de tiempo de más de uno, más de cuatro, más de seis, más de 12, más de 24, más de 48 horas o más de 72 horas después de la administración.

En ciertas realizaciones, la proteína secretada se produce a niveles por encima de los niveles fisiológicos normales. El nivel de proteína secretada puede aumentar en comparación con un control.

En algunas realizaciones, el control es el nivel fisiológico inicial del polipéptido en un individuo normal o en una población de individuos normales. En otras realizaciones, el control es el nivel fisiológico inicial del polipéptido en un individuo que tiene una deficiencia en la proteína o polipéptido relevante o en una población de individuos que tiene una deficiencia en la proteína o polipéptido relevante. En algunas realizaciones, el control puede ser el nivel normal de la proteína o polipéptido relevante en el individuo al que se administra la composición. En otras realizaciones, el control es el nivel de expresión del polipéptido tras otra intervención terapéutica, por ejemplo, tras la inyección directa del polipéptido correspondiente, en uno o más puntos de tiempo comparables.

En determinadas realizaciones, la célula diana expresa el polipéptido a un nivel que es al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, 30 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 5000 veces, al menos 50,000 veces o al menos 100,000 veces mayor que un control. En algunas realizaciones, las veces que aumenta la expresión mayor que el control se mantiene durante más de una, más de cuatro, más de seis, más de 12, más de 24 o más de 48 horas o más de 72 horas después de la administración. Por ejemplo, en una realización, los niveles de proteína secretada se detectan en el suero al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, 30 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 5000 veces, al menos 50,000 veces o al menos 100,000 veces mayor que un control durante al menos 48 horas o 2 días. En ciertas realizaciones, los niveles de proteína secretada son detectables a los 3 días, 4 días, 5 días o 1 semana o más después de la administración. Pueden observarse niveles aumentados de proteína secretada en el suero y/o en un tejido (por ejemplo, hígado, pulmón).

En algunas realizaciones, el método produce una vida media de circulación sostenida de la proteína secretada deseada. Por ejemplo, la proteína secretada puede detectarse durante horas o días más que la vida media observada mediante inyección subcutánea de la proteína secretada. En realizaciones, la vida media de la proteína secretada se mantiene durante más de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 1 semana o más.

En algunas realizaciones, la administración comprende dosis únicas o repetidas. En ciertas realizaciones, la dosis se administra por vía intravenosa.

El polipéptido es galactosidasa.

Ciertas realizaciones se relacionan con composiciones y métodos que proporcionan a una célula o sujeto ARNm, al menos una parte del cual codifica una proteína funcional, en una cantidad que es sustancialmente menor que la cantidad de proteína funcional correspondiente generada a partir de ese ARNm. Dicho de otro modo, en ciertas realizaciones, el ARNm suministrado a la célula puede producir una cantidad de proteína que es sustancialmente mayor que la cantidad de ARNm suministrado a la célula. Por ejemplo, en una cantidad de tiempo determinada, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o 24 horas desde la administración del ARNm a una célula o sujeto, la cantidad de proteína correspondiente generada por ese ARNm puede ser al menos 1.5, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 o más veces mayor que la cantidad de ARNm realmente administrado a la célula o sujeto. Esto se puede medir masa por masa, mol por mol y/o molécula por molécula. La proteína se puede medir de varias maneras. Por ejemplo, para una célula, la proteína medida se puede medir como proteína intracelular, proteína extracelular o una combinación de las dos. Para un sujeto, la proteína medida puede ser proteína medida en suero; en un tejido o tejidos específicos como el hígado, riñón, corazón o cerebro; en un tipo de célula específico tal como uno de los diversos tipos de células del hígado o del cerebro; o en cualquier combinación de tipo de suero, tejido y/o célula. Además, se puede medir una cantidad inicial de proteína endógena en la célula o sujeto antes de la administración del ARNm y luego restarla de la proteína medida después de la administración del ARNm para producir la cantidad de proteína correspondiente generada a partir del ARNm. De esta forma, el ARNm puede proporcionar una fuente de reserva o depósito de una gran cantidad de material terapéutico a la célula o sujeto, por ejemplo, en comparación con la cantidad de ARNm administrado a la célula o sujeto. La fuente de depósito puede actuar como una fuente continua para la expresión de polipéptidos a partir del ARNm durante periodos prolongados de tiempo.

Las características expuestas anteriormente y muchas otras y las ventajas concomitantes de la presente invención se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención cuando se toma junto con los ejemplos adjuntos. Algunos ejemplos corresponden a realizaciones que no forman parte de la invención reivindicada y se incluyen únicamente con fines de referencia.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de CMV 5' (SEQ ID NO: 1), en la que X, si está presente, es GGA.

La Fig. 2 muestra la secuencia de nucleótidos de una secuencia de hGH 3' (SEQ ID NO: 2).

La Fig. 3 muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm eritropoyética humana (EPO) (SEQ ID NO: 3). Esta secuencia puede estar flanqueada en el extremo 5' con la SEQ ID NO: 1 y en el extremo 3' con la SEQ ID NO: 2.

La Fig. 4 muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm de la alfa-galactosidasa (GLA) humana (SEQ ID NO: 4). Esta secuencia puede estar flanqueada en el extremo 5' con la SEQ ID NO: 1 y en el extremo 3' con la SEQ ID NO: 2.

La Fig. 5 muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm de alfa-1 antitripsina humana (A1AT) (SEQ ID NO: 5). Esta secuencia puede estar flanqueada en el extremo 5' con la SEQ ID NO: 1 y en el extremo 3' con la SEQ ID NO: 2.

La Fig. 6 muestra la secuencia de nucleótidos del ARNm del factor IX humano (FIX) (SEQ ID NO: 6). Esta secuencia puede estar flanqueada en el extremo 5' con la SEQ ID NO: 1 y en el extremo 3' con la SEQ ID NO: 2.

La Fig. 7 muestra la cuantificación de los niveles de proteína hEPO secretada medidos mediante ELISA. La proteína detectada es el resultado de su producción a partir de ARNm de hEPO suministrado por vía intravenosa a través de una dosis única de varias formulaciones de nanopartículas lipídicas. Las formulaciones C12-200 (30 µg), HGT4003 (150 µg), ICE (100 µg), DODAP (200 µg) se representan como el componente lipídico catiónico/ionizable de cada artículo de prueba (Formulaciones 1-4). Los valores se basan en una muestra de sangre cuatro horas después de la administración.

La Fig. 8 muestra la medición del hematocrito de ratones tratados con una única dosis IV de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de EPO humana (Formulaciones 1-4). Se tomaron muestras de sangre entera a las 4 h (Día 1), 24 h (Día 2), 4 días, 7 días y 10 días después de la administración.

La Fig. 9 muestra las mediciones de hematocritos de ratones tratados con nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de EPO humana con una sola dosis IV o tres inyecciones (día 1, día 3, día 5). Se tomaron muestras de sangre completa antes de la inyección (día -4), día 7 y día 15. Se administró la Formulación 1: (30 µg, dosis única) o (3 × 10 µg, dosis día 1, día 3, día 5); se administró la Formulación 2: (3 × 50 µg, dosis día 1, día 3, día 5).

La Fig. 10 muestra la cuantificación de los niveles de proteína secretada α-galactosidasa humana (hGLA) medidos mediante ELISA. La proteína detectada es el resultado de la producción de ARNm de hGLA administrado a través de nanopartículas lipídicas (Formulación 1; dosis intravenosa única de 30 µg, con base en ARNm encapsulado). La proteína hGLA se detecta a las 48 horas.

La Fig. 11 muestra actividad de hGLA en suero. La actividad de hGLA se midió utilizando el sustrato 4-metilumbeliferil-α-D-galactopiranosido (4-MU-α-gal) a 37 °C. Los datos son el promedio de 6 a 9 mediciones individuales.

La Fig. 12 muestra la cuantificación de los niveles de proteína hGLA en suero medidos mediante ELISA. La proteína se produce a partir del ARNm de hGLA administrado a través de nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 (C12-200:DOPE:Col:DMGPEG2K, 40:30:25:5 (Formulación 1); 30 µg de ARNm basado en ARNm encapsulado, dosis única IV). La proteína hGLA se controla durante 72 horas por dosis intravenosa única, basada en ARNm encapsulado). La proteína hGLA se controla durante 72 horas.

La Fig. 13 muestra la cuantificación de los niveles de proteína hGLA en hígado, riñón y bazo medidos mediante ELISA. La proteína se produce a partir del ARNm de hGLA administrado a través de nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 (Formulación 1; 30 µg de ARNm basado en ARNm encapsulado, dosis única IV). La proteína hGLA se controla durante 72 horas.

La Fig. 14 muestra un estudio de respuesta a la dosis controlando la producción de proteína de hGLA como proteína GLA humana secretada derivada de MRT en suero (A) e hígado (B). Las muestras se midieron 24 horas después de la administración (Formulación 1; dosis única, IV, N = 4 ratones/grupo) y cuantificada mediante ELISA.

La Fig. 15 muestra los perfiles farmacocinéticos de la alfa-galactosidasa basada en ERT en ratones desnudos atómicos (dosis de 40 µg/kg) y la proteína hGLA producida a partir de MRT (Formulación 1; dosis de ARNm de 1.0 mg/kg).

La Fig. 16 muestra la cuantificación de los niveles de proteína hGLA secretada en ratones Fabry tratados con MRT medidos usando ELISA. La proteína hGLA se produce a partir del ARNm de hGLA suministrado a través de nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 (Formulación 1; 10 µg de ARNm por dosis única intravenosa, con base en ARNm encapsulado). El suero se controla durante 72 horas.

La Fig. 17 muestra la cuantificación de los niveles de proteína hGLA en hígado, riñón, bazo y corazón de ratones Fabry inactivados tratados con MRT medidos mediante ELISA. La proteína se produce a partir del ARNm de hGLA suministrado a través de nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 (Formulación 1; 30 µg de ARNm basado en ARNm encapsulado, dosis única IV). La proteína hGLA se controla durante 72 horas. Los valores de la literatura que representan los niveles fisiológicos normales se representan gráficamente como líneas discontinuas.

La Fig. 18 muestra la cuantificación de los niveles de proteína hGLA secretada en ratones Fabry tratados con MRT y alfa-galactosidasa medidos usando ELISA. Ambas terapias se dosificaron como una dosis intravenosa única de 1.0 mg/kg.

La Fig. 19 muestra la cuantificación de los niveles de proteína hGLA en hígado, riñón, bazo y corazón de ratones Fabry inactivados tratados con MRT y ERT (alfa-galactosidasa) medidos mediante ELISA. La proteína producida a partir de ARNm de hGLA suministrado a través de nanopartículas lipídicas (Formulación 1; 1.0 mg/kg de ARNm basado en ARNm encapsulado, dosis única IV).

La Fig. 20 muestra la cuantificación relativa de globotriaosilceramida (Gb3) y liso-Gb3 en los riñones de ratones tratados y no tratados. Los ratones Fabry inactivados macho se trataron con una dosis única de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de GLA o alfa-galactosidasa a razón de 1.0 mg/kg. Las cantidades reflejan la cantidad de Gb3/liso-Gb3 una semana después de la administración.

La Fig. 21 muestra la cuantificación relativa de globotriaosilceramida (Gb3) y liso-Gb3 en el corazón de ratones tratados y no tratados. Los ratones Fabry inactivados macho se trataron con una dosis única de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de GLA o alfa-galactosidasa a razón de 1.0 mg/kg. Las cantidades reflejan la cantidad de Gb3/liso-Gb3 una semana después de la administración.

La Fig. 22 muestra un estudio de respuesta a la dosis que controla la producción de proteína de GLA como proteína GLA humana secretada derivada de MRT en suero. Las muestras se midieron 24 horas después de la administración (dosis única, IV, N = 4 ratones/grupo) de nanopartículas lipídicas basadas en HGT4003 (Formulación 3) o HGT5000 (Formulación 5) y cuantificadas por ELISA.

La Fig. 23 muestra la producción de proteína hGLA medida en suero (A) o en hígado, riñón y bazo (B). Las muestras se midieron 6 horas y 24 horas después de la administración (dosis única, IV, N = 4 ratones/grupo) de nanopartículas lipídicas basadas en HGT5001 (Formulación 6) y cuantificadas por ELISA.

La Fig. 24 muestra la cuantificación de los niveles de proteína Factor IX humana secretada medidos mediante ELISA (media ng/mL  $\pm$  desviación estándar). La proteína FIX se produce a partir del ARNm de FIX administrado a través de nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 (C12-200:DOPE:Col:DMGPEG2K, 40:30:25:5 (Formulación 1); 30  $\mu$ g de ARNm por dosis intravenosa única, basada en ARNm encapsulado). La proteína FIX se controla durante 72 horas (n = 24 ratones).

La Fig. 25 muestra la cuantificación de los niveles de proteína  $\alpha$ -1-antitripsina humana secretada (A1AT) medidos mediante ELISA. La proteína A1AT se produce a partir del ARNm de A1AT suministrado a través de nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 (C12-200:DOPE:Col:DMGPEG2K, 40:30:25:5 (Formulación 1); 30  $\mu$ g de ARNm por dosis intravenosa única, basado en ARNm encapsulado). La proteína A1AT se controla durante 24 horas.

La Fig. 26 muestra una cuantificación basada en ELISA de la proteína hEPO detectada en los pulmones y el suero de ratones tratados después de la administración intratraqueal de nanopartículas cargadas con ARNm de hEPO (medidas en mUI) (nanopartículas lipídicas basadas en C12-200, HGT5000 o HGT5001; Formulaciones 1, 5, 6 respectivamente). Los animales se sacrificaron 6 horas después de la administración (n = 4 ratones por grupo).

#### Descripción de ejemplos de realizaciones

La invención proporciona composiciones y métodos para el suministro intracelular de ARNm en un vehículo de transferencia liposomal a una o más células diana para la producción de niveles terapéuticos de proteína funcional secretada, como se define en las reivindicaciones.

El término "funcional", como se usa en el presente documento para calificar una proteína o enzima, significa que la proteína o enzima tiene actividad biológica, o alternativamente es capaz de realizar la misma función o una función similar a la proteína o enzima nativa o que funciona normalmente. Las composiciones de ARNm de la invención son útiles para el tratamiento de diversos trastornos metabólicos o genéticos, y en particular aquellos trastornos genéticos o metabólicos que implican la falta de expresión, expresión errónea o deficiencia de una proteína o enzima. El término "niveles terapéuticos" se refiere a niveles de proteína detectados en la sangre o tejidos que están por encima de los niveles de control, en los que el control puede ser niveles fisiológicos normales o los niveles en el sujeto antes de la administración de la composición de ARNm. El término "secretado" se refiere a la proteína que se detecta fuera de la célula diana, en el espacio extracelular. La proteína puede detectarse en la sangre o en los tejidos. En el contexto de la presente invención, el término "producido" se usa en su sentido más amplio para referirse a la traducción de al menos un ARNm en una proteína o enzima. Como se proporciona en el presente documento, las composiciones incluyen un vehículo de transferencia. Como se usa en el presente documento, el término "vehículo de transferencia" incluye cualquiera de los vehículos, diluyentes, excipientes y similares farmacéuticos estándar que generalmente están destinados a usarse en relación con la administración de agentes biológicamente activos, incluidos los ácidos nucleicos. Las composiciones y, en particular, los vehículos de transferencia descritos en el presente documento son capaces de suministrar ARNm a la célula diana. El vehículo de transferencia es una nanopartícula lipídica.

#### ARNm

El ARNm en las composiciones de la invención codifica alfa-galactosidasa.

En una realización de la invención, el ARNm puede tener opcionalmente modificaciones químicas o biológicas que, por ejemplo, mejoran la estabilidad y/o la vida media de dicho ARNm o que mejoran o facilitan la producción de proteínas.

La presente invención también contempla el suministro conjunto y/o la administración conjunta de un primer ARNm terapéutico y un segundo ácido nucleico para facilitar y/o mejorar la función o el suministro del primer ARNm terapéutico. Por ejemplo, dicho segundo ácido nucleico (por ejemplo, ARNm exógeno o sintético) puede codificar una proteína transportadora de membrana que tras la expresión (por ejemplo, traducción del ARNm exógeno o sintético) facilita el suministro o mejora la actividad biológica del primer ARNm. Alternativamente, el primer ARNm terapéutico puede administrarse con un segundo ácido nucleico que funciona como "chaperona", por ejemplo, para dirigir el plegamiento del primer ARNm terapéutico.

Los métodos de la invención también proporcionan el suministro de uno o más ácidos nucleicos terapéuticos para tratar un solo trastorno o deficiencia, en el que cada ácido nucleico terapéutico funciona mediante un mecanismo de acción diferente. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden comprender un primer ARNm terapéutico que, por ejemplo, se administra para corregir una deficiencia de una proteína o enzima endógena, y que va acompañado de un segundo ácido nucleico, que se administra para desactivar o "inactivar" un ácido nucleico endógeno que funciona mal y su proteína o producto enzimático. Dichos "segundos" ácidos nucleicos pueden codificar, por ejemplo, ARNm o ARNpi.

Tras la transfección, un ARNm natural en las composiciones de la invención puede decaer con una vida media de entre 30 minutos y varios días. El ARNm en las composiciones de la invención preferiblemente retiene al menos alguna capacidad para traducirse, produciendo así una proteína o enzima funcional secretada. Por consiguiente, la invención proporciona composiciones que comprenden y métodos para administrar un ARNm estabilizado. En algunas realizaciones de la invención, la actividad del ARNm se prolonga durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, la actividad del ARNm se puede prolongar de manera que las composiciones de la presente invención se

administren a un sujeto semanalmente o cada dos semanas, o más preferiblemente cada mes, cada dos meses, cada tres meses o cada año. La actividad extendida o prolongada del ARNm de la presente invención está directamente relacionada con la cantidad de proteína o enzima funcional secretada producida a partir de dicho ARNm. De manera similar, la actividad de las composiciones de la presente invención puede extenderse o prolongarse más mediante modificaciones realizadas para mejorar o potenciar la traducción del ARNm. Además, la cantidad de proteína o enzima funcional producida por la célula diana es función de la cantidad de ARNm suministrado a las células diana y de la estabilidad de tal ARNm. En la medida en que se pueda mejorar o potenciar la estabilidad del ARNm de la presente invención, la vida media, la actividad de la proteína o enzima secretada producida y la frecuencia de dosificación de la composición se pueden ampliar aún más.

En consecuencia, en algunas realizaciones, el ARNm en las composiciones de la invención comprende al menos una modificación que confiere una estabilidad aumentada o mejorada al ácido nucleico, que incluye, por ejemplo, una resistencia mejorada a la digestión con nucleasas *in vivo*. Como se usa en el presente documento, los términos "modificación" y "modificado" en relación con los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento incluyen al menos una alteración que preferiblemente mejora la estabilidad y hace que el ARNm sea más estable (por ejemplo, resistente a la digestión con nucleasas) que versión silvestre o natural del ARNm. Como se usa en el presente documento, los términos "estable" y "estabilidad" se refieren a los ácidos nucleicos de la presente invención, y en particular con respecto al ARNm, se refieren a una resistencia mayor o mejorada a la degradación por, por ejemplo, nucleasas (es decir, endonucleasas o exonucleasas) que normalmente son capaces de degradar dicho ARNm. El aumento de la estabilidad puede incluir, por ejemplo, una menor sensibilidad a la hidrólisis u otra destrucción por parte de enzimas endógenas (por ejemplo, endonucleasas o exonucleasas) o condiciones dentro de la célula o tejido diana, lo que aumenta o mejora la residencia de dicho ARNm en la célula, tejido, sujeto y/o citoplasma diana. Las moléculas de ARNm estabilizadas proporcionadas en el presente documento demuestran vidas medias más prolongadas en relación con sus contrapartes naturales no modificadas (por ejemplo, la versión de tipo silvestre del ARNm). También están contemplados por los términos "modificación" y "modificado" términos tales relacionados con el ARNm de la presente invención que son alteraciones que mejoran o potencian la traducción de los ácidos nucleicos del ARNm, incluida, por ejemplo, la inclusión de secuencias que funcionan en la iniciación de la traducción de proteínas (por ejemplo, la secuencia de consenso de Kozak (Kozak, M., *Nucleic Acids Res.* 15 (20): 8125-48 (1987)).

En algunas realizaciones, el ARNm de la invención ha sufrido una modificación química o biológica para hacerlo más estable. Ejemplos de modificaciones a un ARNm incluyen el agotamiento de una base (por ejemplo, por eliminación o sustitución de un nucleótido por otro) o modificación de una base, por ejemplo, la modificación química de una base. La frase "modificaciones químicas", tal como se usa en el presente documento, incluye modificaciones que introducen químicas que difieren de las observadas en el ARNm natural, por ejemplo, modificaciones covalentes como la introducción de nucleótidos modificados (por ejemplo, análogos de nucleótidos o la inclusión de grupos colgantes que no se encuentran naturalmente en dichas moléculas de ARNm).

Además, las modificaciones adecuadas incluyen alteraciones en uno o más nucleótidos de un codón de modo que el codón codifique el mismo aminoácido pero sea más estable que el codón que se encuentra en la versión de tipo silvestre del ARNm. 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 de C y de U es estable a la mayoría de las RNAsas (Heidenreich, et al., *J. Biol Chem* 269, 2131-8 (1994)). En algunas realizaciones, se reduce el número de residuos de C y/o de U en una secuencia de ARNm. En otra realización, el número de residuos de C y/o de U se reduce mediante la sustitución de un codón que codifica un aminoácido particular por otro codón que codifica el mismo aminoácido o uno relacionado. Las modificaciones contempladas en los ácidos nucleicos de ARNm de la presente invención también incluyen la incorporación de pseudouridinas. La incorporación de pseudouridinas en los ácidos nucleicos de ARNm de la presente invención puede mejorar la estabilidad y la capacidad de traducción, así como disminuir la inmunogenicidad *in vivo*. Véase, por ejemplo, Karikó, K., et al., *Molecular Therapy* 16 (11): 1833-1840 (2008). Las sustituciones y modificaciones del ARNm de la presente invención se pueden realizar mediante métodos fácilmente conocidos por un experto en la materia.

Las restricciones para reducir el número de residuos de C y de U en una secuencia probablemente serán mayores dentro de la región codificante de un ARNm, en comparación con una región no traducida (es decir, probablemente no será posible eliminar todos los residuos de C y de U presentes en el mensaje mientras conserva la capacidad del mensaje para codificar la secuencia de aminoácidos deseada). Sin embargo, la degeneración del código genético presenta una oportunidad para permitir que se reduzca el número de residuos de C y/o de U que están presentes en la secuencia, mientras 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.

El término modificación también incluye, por ejemplo, la incorporación de enlaces no nucleotídicos o nucleótidos modificados en las secuencias de ARNm de la presente invención (por ej., modificaciones en uno o ambos extremos 3' y 5' de una molécula de ARNm que codifica una proteína o enzima secretada funcional). Dichas modificaciones incluyen la adición de bases a una secuencia de ARNm (por ejemplo, la inclusión de una cola de poli A o una cola de poli A más larga), la alteración de la UTR 3' o la UTR 5', la formación de complejos del ARNm con un agente (por ejemplo, una proteína o una molécula de ácido nucleico complementaria), y la inclusión de elementos que cambian la estructura de una molécula de ARNm (por ejemplo, que forman estructuras secundarias).

Se cree que la cola de poli A estabiliza a los mensajeros naturales. Por lo tanto, en una realización se puede añadir una cola de poli A larga a una molécula de ARNm, lo que hace que el ARNm sea más estable. Las colas de poli A se pueden agregar usando una variedad de técnicas reconocidas en el arte. Por ejemplo, se pueden agregar colas de poli A al ARNm sintético o transcrito *in vitro* usando polimerasa de poli A (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Un vector de transcripción también puede codificar colas de poli A largas. Además, las colas de poli A se pueden agregar mediante transcripción directamente a partir de productos de PCR. En una realización, la longitud de la cola de poli A es de al menos aproximadamente 90, 200, 300, 400 y al menos 500 nucleótidos. En una realización, la longitud de la cola de poli A se ajusta para controlar la estabilidad de una molécula de ARNm modificada 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, la longitud de la cola de poli A se puede ajustar para modificar el nivel de resistencia del ARNm a las nucleasas y, por lo tanto, controlar el curso temporal de expresión de proteínas en una célula. En una realización, las moléculas de ARNm estabilizadas son suficientemente resistentes a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por nucleasas), de modo que puedan ser suministradas a la célula diana sin un vehículo de transferencia.

En una realización, un ARNm puede modificarse mediante la incorporación de secuencias no traducidas (UTR) 3' y/o 5' que no se encuentran naturalmente en el ARNm de tipo silvestre. En una realización, la secuencia flanqueante 3' y/o 5' que flanquea naturalmente un ARNm y codifica una segunda proteína no relacionada puede incorporarse en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm que codifica una proteína terapéutica o funcional para modificarla. Por ejemplo, las secuencias 3' o 5' de moléculas de ARNm que son estables (por ejemplo, globina, actina, GAPDH, tubulina, histona o enzimas del ciclo del ácido cítrico) pueden incorporarse en la región 3' y/o 5' de un molécula de ácido nucleico de ARNm sentido para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm sentido. Véase, por ejemplo, US2003/0083272.

En algunas realizaciones, el ARNm en las composiciones de la invención incluye la modificación del extremo 5' del ARNm para incluir una secuencia parcial de un gen 1 temprano inmediato (IE1) del CMV, o un fragmento del mismo (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1) para mejorar la resistencia a la nucleasa y/o mejorar la vida media del ARNm. Además de aumentar la estabilidad de la secuencia de ácido nucleico del ARNm, se ha descubierto sorprendentemente que la inclusión de una secuencia parcial del gen 1 temprano inmediato (IE1) del CMV mejora la traducción del ARNm y la expresión de la proteína o enzima funcional. También se contempla la inclusión de una secuencia del gen de la hormona del crecimiento humano (hGH), o un fragmento de la misma (por ejemplo, la SEQ ID NO: 2) en los extremos 3' del ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) para estabilizar aún más el ARNm. En general, las modificaciones preferidas mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, la vida media) del ARNm en relación con sus homólogos no modificados e incluyen, por ejemplo, modificaciones realizadas para mejorar la resistencia de dicho ARNm a la digestión por nucleasas *in vivo*.

Además, se contemplan variantes de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2, en las que las variantes mantienen las propiedades funcionales de los ácidos nucleicos, incluida la estabilización del ARNm y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, la vida media). Las variantes pueden tener más del 90 %, más del 95 %, más del 98 % o más del 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender un reactivo estabilizador. Las composiciones pueden incluir uno o más reactivos de formulación que se unen directa o indirectamente al ARNm y lo estabilizan, mejorando así el tiempo de residencia en la célula diana. Dichos reactivos conducen preferiblemente a una vida media mejorada del ARNm en las células diana. Por ejemplo, la estabilidad de un ARNm y la eficiencia de la traducción pueden incrementarse mediante la incorporación de "reactivos estabilizadores" que forman complejos con el ARNm que se produce naturalmente dentro de una célula (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 5,677,124). La incorporación de un reactivo estabilizador se puede lograr, por ejemplo, combinando poli A y una proteína con el ARNm que se va a estabilizar *in vitro* antes de cargar o encapsular el ARNm dentro de un vehículo de transferencia. Los ejemplos de reactivos estabilizadores incluyen una o más proteínas, péptidos, aptámeros, proteína accesoria de traducción, proteínas de unión al ARNm y/o factores de iniciación de la traducción.

La estabilización de las composiciones también puede mejorarse mediante el uso de fracciones inhibidoras de la opsonización, que suelen ser grandes polímeros hidrofílicos que se unen química o físicamente al vehículo de transferencia (por ejemplo, mediante la intercalación de un ancla soluble en lípidos en la membrana misma, o uniéndose directamente a grupos activos de lípidos de membrana). Estos polímeros hidrofílicos que inhiben la opsonización forman una capa superficial protectora que disminuye significativamente la absorción de los liposomas por el sistema de macrófagos-monocitos y el sistema retículo-endotelial (por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos N° 4,920,016, cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento como referencia). Los vehículos de transferencia modificados con fracciones de inhibición de la opsonización permanecen en circulación mucho más tiempo que sus homólogos no modificados.

Cuando el ARN se hibrida con una molécula de ácido nucleico complementaria (por ejemplo, ADN o ARN), puede protegerse de las nucleasas (Krieg, et al., Melton. Methods in Enzymology. 1987; 155, 397-415). La estabilidad del ARNm hibridado probablemente se deba a la especificidad inherente de cadena sencilla de la mayoría de las RNAsas. En algunas realizaciones, el reactivo estabilizador seleccionado para complejar un ARNm es una proteína eucariota (por ejemplo, una proteína de mamífero). En otra realización más, el ARNm puede modificarse mediante hibridación



con una segunda molécula de ácido nucleico. Si una molécula de ARNm entera se hibridara con una molécula de ácido nucleico complementaria, la iniciación de la traducción podría reducirse. En algunas realizaciones, la región 5' no traducida y la región de inicio AUG de la molécula de ARNm pueden dejarse opcionalmente sin hibridar. Después del inicio de la traducción, la actividad de desenrollado del complejo de ribosomas puede funcionar incluso en dúplex de alta afinidad para que pueda continuar la traducción (Liebhaber. J. Mol. Biol. 1992; 226: 2-13; Monia, et al., J Biol Chem. 1993; 268: 14514-22).

Se entenderá que cualquiera de los métodos descritos anteriormente para mejorar la estabilidad del ARNm puede usarse solo o en combinación con uno o más de cualquiera de los otros métodos y/o composiciones descritos anteriormente.

El ARNm de la presente invención puede combinarse opcionalmente con un gen informador (por ejemplo, secuencia arriba o secuencia abajo de la región codificante del ARNm) que, por ejemplo, facilita la determinación del suministro de ARNm a las células o tejidos diana. Los genes indicadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, ARNm de proteína fluorescente verde (ARNm de GFP), ARNm de luciferasa Renilla (ARNm de luciferasa), ARNm de luciferasa de luciérnaga o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el ARNm de GFP puede fusionarse con un ARNm que codifica una proteína secretable para facilitar la confirmación de la localización del ARNm en las células diana que actuarán como depósito para la producción de proteínas.

Como se usa en el presente documento, los términos "transfectar" o "transfección" significan la introducción intracelular de un ARNm en una célula, o preferiblemente en una célula diana. El ARNm introducido puede mantenerse de forma estable o transitoria en la célula diana. El término "eficacia de transfección" se refiere a la cantidad relativa de ARNm absorbida por la célula diana que se somete a transfección. En la práctica, la eficacia de la transfección se estima por la cantidad de un producto de ácido nucleico informador expresado por las células diana después de la transfección. Las realizaciones preferidas incluyen composiciones con altas eficacias de transfección y, en particular, aquellas composiciones que minimizan los efectos adversos que están mediados por la transfección de células no diana. Las composiciones de la presente invención que demuestran altas eficacias de transfección mejoran la probabilidad de que las dosis apropiadas del ARNm se administren a la célula diana, al mismo tiempo que minimizan los posibles efectos adversos sistémicos. En una realización de la presente invención, los vehículos de transferencia de la presente invención son capaces de suministrar secuencias de ARNm grandes (por ejemplo, ARNm de al menos 1 kDa, 1.5 kDa, 2 kDa, 2.5 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa o más). El ARNm se puede formular con uno o más reactivos aceptables, que proporcionan un vehículo para suministrar dicho ARNm a las células diana. Los reactivos apropiados generalmente se seleccionan teniendo en cuenta una serie de factores, que incluyen, pero sin limitarse a cosas, las propiedades biológicas o químicas del ARNm, la vía de administración prevista, el entorno biológico anticipado al que estará expuesto dicho ARNm y las propiedades específicas de las células diana deseadas. En algunas realizaciones, los vehículos de transferencia, tales como los liposomas, encapsulan el ARNm sin comprometer la actividad biológica. En algunas realizaciones, el vehículo de transferencia demuestra una unión preferencial y/o sustancial a una célula diana en relación con las células no diana. En una realización preferida, el vehículo de transferencia suministra su contenido a la célula diana de manera que el ARNm se suministra al compartimento subcelular apropiado, tal como el citoplasma.

#### Vehículo de transferencia

El vehículo de transferencia en las composiciones de la invención es un vehículo de transferencia liposomal, por ejemplo, una nanopartícula lipídica. En una realización, el vehículo de transferencia se puede seleccionar y/o preparar para optimizar el suministro del ARNm a una célula diana. Por ejemplo, si la célula diana es un hepatocito, las propiedades del vehículo de transferencia (por ejemplo, tamaño, carga y/o pH) pueden optimizarse para suministrar de forma eficaz dicho vehículo de transferencia a la célula diana, reducir la eliminación inmunitaria y/o promover la retención en esa célula diana. Alternativamente, si la célula diana es el sistema nervioso central (por ejemplo, el ARNm administrado para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas puede dirigirse específicamente al tejido cerebral o espinal), la selección y preparación del vehículo de transferencia debe considerar la penetración y la retención dentro de la barrera hematoencefálica y/o el uso de medios alternativos para suministrar directamente dicho vehículo de transferencia a dicha célula objetivo. En una realización, las composiciones de la presente invención se pueden combinar con agentes que facilitan la transferencia de ARNm exógeno (por ejemplo, agentes que interrumpen o mejoran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, mejoran la transferencia de ARNm exógeno a las células diana).

La presente invención contempla el uso de vehículos de transferencia liposómicos para facilitar el suministro de ácidos nucleicos a las células diana. Los liposomas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas liposomales) son generalmente útiles en una variedad de aplicaciones en investigación, industria y medicina, particularmente para su uso como vehículos de transferencia de compuestos terapéuticos o de diagnóstico *in vivo* (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998; Drummond et al., Pharmacol. Rev., 51: 691-743, 1999) y generalmente se caracterizan como vesículas microscópicas que tienen un espacio acuoso interior aislado de un medio externo por una membrana de una o más bicapas. Las membranas bicapa de los liposomas suelen estar formadas por moléculas anfifílicas, tales como lípidos de origen sintético o natural que comprenden dominios hidrofílicos e hidrófobos espacialmente separados (Lasic, Trends Biotechnol., 16: 307-321, 1998). Las membranas bicapa de los liposomas también pueden estar formadas por polímeros anfifílicos y tensioactivos (por ejemplo, polimerosomas, niosomas, etc.).

En el contexto de la presente invención, un vehículo de transferencia liposomal sirve para transportar el ARNm a la célula diana. Para los fines de la presente invención, los vehículos de transferencia liposómicos se preparan para contener los ácidos nucleicos deseados. El proceso de incorporación de una entidad deseada (por ejemplo, un ácido nucleico) en un liposoma a menudo se denomina "carga" (Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992). Los ácidos nucleicos incorporados al liposoma pueden estar total o parcialmente ubicados en el espacio interior del liposoma, dentro de la membrana bicapa del liposoma o asociados con la superficie exterior de la membrana del liposoma. La incorporación de un ácido nucleico en los liposomas también se denomina en el presente documento "encapsulación", en la que el ácido nucleico está completamente contenido dentro del espacio interior del liposoma. El propósito de incorporar un ARNm en un vehículo de transferencia, tal como un liposoma, suele ser proteger el ácido nucleico de un entorno que puede contener enzimas o productos químicos que degradan los ácidos nucleicos y/o los sistemas o receptores que provocan la rápida excreción de los ácidos nucleicos. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, el vehículo de transferencia seleccionado es capaz de mejorar la estabilidad del ARNm contenido en él. El liposoma puede permitir que el ARNm encapsulado llegue a la célula diana y/o puede permitir preferiblemente que el ARNm encapsulado llegue a la célula diana o, alternativamente, limitar el suministro de dicho ARNm a otros sitios o células donde la presencia del ARNm administrado puede ser inútil o indeseable. Además, la incorporación del ARNm en un vehículo de transferencia, tal como por ejemplo, un liposoma catiónico, también facilita el suministro de dicho ARNm en una célula diana.

Idealmente, los vehículos de transferencia liposómicos se preparan para encapsular uno o más ARNm deseados de modo que las composiciones demuestren una alta eficiencia de transfección y una mayor estabilidad. Si bien los liposomas pueden facilitar la introducción de ácidos nucleicos en las células diana, la adición de policationes (por ejemplo, poli L-lisina y protamina), como copolímero, puede facilitar y, en algunos casos, mejorar notablemente la eficiencia de transfección de varios tipos de liposomas catiónicos en 2 - 28 veces en un número de líneas celulares tanto *in vitro* como *in vivo* (véase N J Caplen, et al., Gene Ther. 1995; 2: 603; S. Li, et al., Gene Ther. 1997; 4, 891.)

#### Nanopartículas lipídicas

En una realización preferida de la presente invención, el vehículo de transferencia se formula como una nanopartícula lipídica. Como se usa en el presente documento, la frase "nanopartícula lipídica" se refiere a un vehículo de transferencia que comprende uno o más lípidos (por ejemplo, lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos modificados con PEG). Preferiblemente, las nanopartículas lipídicas se formulan para suministrar uno o más ARNm a una o más células diana. Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen, por ejemplo, los compuestos de fosfatidilo (por ejemplo, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrosidos y gangliósidos). También se contempla el uso de polímeros como vehículos de transferencia, ya sea solos o en combinación con otros vehículos de transferencia. Los polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliácridatos, polialquilacrilatos, polilactida, copolímeros de polilactida-poliglicólido, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas, dendrímeros y polietilimina. En una realización, el vehículo de transferencia se selecciona en función de su capacidad para facilitar la transfección de un ARNm en una célula diana.

La invención contempla el uso de nanopartículas lipídicas como vehículos de transferencia que comprenden un lípido catiónico para encapsular y/o mejorar el suministro de ARNm en la célula diana que actuará como depósito para la producción de proteínas. Como se usa en el presente documento, la frase "lípido catiónico" se refiere a cualquiera de una serie de 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 multicomponentes de proporciones variables empleando uno o más lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y lípidos modificados con PEG. En la bibliografía se han descrito varios lípidos catiónicos, muchos de los cuales están disponibles comercialmente.

Los lípidos catiónicos particularmente adecuados para usar en las composiciones y métodos de la invención incluyen los descritos en la publicación internacional de patente WO 2010/053572, incorporada en el presente documento como referencia, y más particularmente, C12-200 descrito en el párrafo [00225] del documento WO 2010/053572. En ciertas realizaciones, las composiciones y métodos de la invención emplean nanopartículas lipídicas que comprenden un lípido catiónico ionizable descrito en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 61/617,468, presentada el 29 de marzo de 2012, tal como, por ejemplo, (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-15,18-dien-1-amina (HGT5000), (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-4,15,18-trien-1-amina (HGT5001) y (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-5,15,18-trien-1-amina (HGT5002).

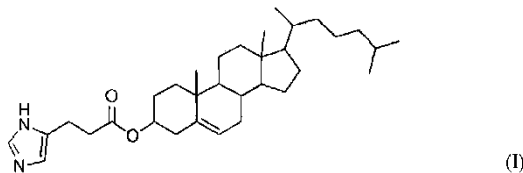
En algunas realizaciones, se usa el lípido catiónico cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio o "DOTMA" (Felgner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); Patente de los Estados Unidos N° 4,897,355). DOTMA se puede formular solo o se puede combinar con el lípido neutro, dioleoilfosfatidil-etanolamina o "DOPE" u otros lípidos catiónicos o no catiónicos en un vehículo de transferencia liposomal o una nanopartícula lipídica, y dichos liposomas se pueden usar para mejorar el suministro de ácidos nucleicos en las células diana. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, 5-carboxiespermidinadiodecylamida o "DOGS", 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino o "DOSPA" (Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989); Patente de los Estados Unidos No. 5,171,678; Patente de los Estados Unidos No. 5,334,761), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano o "DODAP", 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano o "DOTAP". Los lípidos catiónicos contemplados también

incluyen 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLenDMA", cloruro de N-dioleil-N,N-dimetilamonio o "DODAC", bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio o "DDAB", bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio 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-dimetil-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'-dilinoilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-dilinoleoilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-DMA", 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA", y 2-(2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)-1,3-dioxolan-4-il)-N,N-dimetiletanamina (DLin-KC2-DMA) (véase, el documento WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), o mezclas de los mismos (Heyes, J., et al., J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., et al., Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); publicación PCT WO2005/121348A1).

La presente invención también contempla el uso de lípidos catiónicos basados en colesterol. Dichos lípidos catiónicos basados en colesterol se pueden usar solos o en combinación con otros lípidos catiónicos o no catiónicos. Los lípidos catiónicos basados en colesterol adecuados incluyen, por ejemplo, DC-Col (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilamino-propil)piperazina (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al., BioTechniques 23, 139 (1997); patente de los Estados Unidos No. 5,744,335), e ICE.

Además, varios reactivos están disponibles comercialmente para mejorar la eficacia de la transfección. Los ejemplos adecuados incluyen LIPOFECTINA (DOTMA:DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), LIPOFECTAMINA (DOSPA:DOPE) (Invitrogen), LIPOFECTAMINA 2000 (Invitrogen), FUGENE, TRANSFECTAM (DOGS) y EFFECTENE.

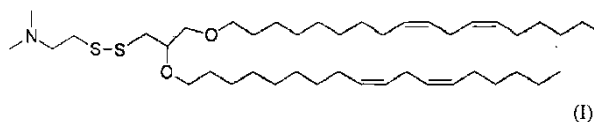
También se contemplan lípidos catiónicos tales como los lípidos basados en dialquilamino, basados en imidazol y basados en guanidinio. Por ejemplo, ciertas realizaciones están dirigidas a una composición que comprende uno o más lípidos catiónicos basados en imidazol, por ejemplo, el éster de colesterol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



Sin pretender limitarse a una teoría particular, se cree que la fusogenicidad del lípido catiónico basado en imidazol ICE está relacionada con la ruptura endosómica facilitada por el grupo imidazol, que tiene un pKa más bajo en relación con los lípidos catiónicos tradicionales. La ruptura endosómica a su vez promueve el hinchamiento osmótico y la ruptura de la membrana liposomal, seguido por la transfección o liberación intracelular del contenido de ácido o ácidos nucleicos cargados en la célula diana.

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

De manera similar, ciertas realizaciones están dirigidas a nanopartículas lipídicas que comprenden el lípido catiónico HGT4003 2-((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)-N,N-dimetiletanamina, como se representa mediante la estructura (II) a continuación, y como se describe con más detalle en la solicitud provisional de los Estados Unidos No: 61/494,745, presentada el 8 de junio de 2011, cuyas enseñanzas completas se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad:



En otras realizaciones, las composiciones y los métodos descritos en el presente 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 disulfuro (S-S) escindible (por ejemplo, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y HGT4005), como se describe con más detalle en la solicitud provisional de los Estados Unidos No: 61/494,745, cuyas enseñanzas completas se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

El uso de fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG) y lípidos derivados, tales como las ceramidas derivadas (PEG-CER), incluida la N-octanoil-esfingosina-1-[succinil(metoxi polietilenglicol)-2000] (ceramida C8 PEG-2000) también está contemplado por la presente invención, ya sea solo o preferiblemente en combinación con otros lípidos que juntos comprenden el vehículo de transferencia (por ejemplo, una nanopartícula lipídica). Los lípidos modificados con PEG contemplados incluyen, pero sin limitarse a, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena o cadenas de alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> de longitud. La adición de tales componentes puede prevenir la agregación compleja y también puede proporcionar un medio para aumentar la vida útil en circulación y aumentar el suministro de la composición de lípido y ácido nucleico a la célula diana, (Klibanov et al., (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), o se pueden seleccionar para cambiar rápidamente fuera de la formulación *in vivo* (véase la patente de los Estados Unidos No. 5,885,613). Los lípidos intercambiables particularmente útiles son las PEG-ceramidas que tienen cadenas de acilo más cortas (por ejemplo, C14 o C18). El fosfolípido modificado con PEG y los lípidos derivados de la presente invención pueden comprender una proporción molar de aproximadamente 0 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 10 %, o aproximadamente del 2 % del lípido total presente en el vehículo de transferencia liposomal.

La presente invención también contempla el uso de lípidos no catiónicos. Como se usa en el presente documento, la frase "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido neutro, zwitteriónico o aniónico. Como se usa en el presente documento, la frase "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que portan una carga neta negativa a un pH seleccionado, tal como el pH fisiológico. Los lípidos no catiónicos incluyen, pero no se limitan a, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoileoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoileoilfosfatidiletanolamina (POPE), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoilfosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (SOPE), colesterol o una mezcla de los mismos. Dichos lípidos no catiónicos se pueden usar solos, pero se usan preferiblemente en combinación con otros excipientes, por ejemplo, lípidos catiónicos. Cuando se usa en combinación con un lípido catiónico, el lípido no catiónico puede comprender una proporción molar de 5 % a aproximadamente 90 %, o preferiblemente de aproximadamente 10 % a aproximadamente 70 % del lípido total presente en el vehículo de transferencia.

Preferiblemente, el vehículo de transferencia (por ejemplo, una nanopartícula de lípido) se prepara combinando múltiples componentes de lípidos y/o polímeros. Por ejemplo, se puede preparar un vehículo de transferencia utilizando C12-200, DOPE, chol, DMG-PEG2K en una relación molar de 40:30:25:5, o DODAP, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K en una relación molar de 18:56:20:6, o HGT5000, DOPE, chol, DMG-PEG2K en una relación molar de 40:20:35:5, o HGT5001, DOPE, chol, DMG-PEG2K en una relación molar de 40:20:35:5. La selección de lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y/o lípidos modificados con PEG que comprenden la nanopartícula lipídica, así como la relación molar relativa de dichos lípidos entre sí, se basa en las características del lípido o lípidos seleccionados, la naturaleza de las células diana previstas, las características del ARNm a suministrar. Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena de alquilo, así como el tamaño, la carga, el pH, el pKa, la fusogenicidad y la toxicidad del lípido o lípidos seleccionados. Por lo tanto, las relaciones molares pueden ajustarse en consecuencia. Por ejemplo, en realizaciones, el porcentaje de lípido catiónico en la nanopartícula lipídica puede ser superior al 10 %, superior al 20 %, superior al 30 %, superior al 40 %, superior al 50 %, superior al 60 % o superior al 70 %. El porcentaje de lípido no catiónico en la nanopartícula lipídica puede ser superior al 5 %, superior al 10 %, superior al 20 %, superior al 30 % o superior al 40 %. El porcentaje de colesterol en la nanopartícula lipídica puede ser superior al 10 %, superior al 20 %, superior al 30 % o superior al 40 %. El porcentaje de lípido modificado con PEG en la nanopartícula lipídica puede ser superior al 1 %, superior al 2 %, superior al 5 %, superior al 10 % o superior al 20 %.

En determinadas realizaciones preferidas, las nanopartículas lipídicas de la invención comprenden al menos uno de los siguientes lípidos catiónicos: C12-200, DLin-KC2-DMA, DODAP, HGT4003, ICE, HGT5000 o HGT5001. En realizaciones, el vehículo de transferencia comprende colesterol y/o un lípido modificado con PEG. En algunas realizaciones, los vehículos de transferencia comprenden DMG-PEG2K. En ciertas realizaciones, el vehículo de transferencia comprende una de las siguientes formulaciones de lípidos: C12-200, DOPE, chol, DMG-PEG2K; DODAP, DOPE, colesterol, DMG-PEG2K; HGT5000, DOPE, chol, DMG-PEG2K, HGT5001, DOPE, chol, DMG-PEG2K.

Los vehículos de transferencia liposómicos para usar en las composiciones de la invención se pueden preparar mediante diversas técnicas que se conocen actualmente en el arte. Las vesículas multilaminares (MLV) se pueden preparar con técnicas convencionales, por ejemplo, depositando un lípido seleccionado en la pared interior de un

contenedor 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 aspersión. Luego se puede agregar una fase acuosa al recipiente con un movimiento tipo vórtice que da como resultado la formación de MLV. A continuación, se pueden formar vesículas unilamelares (ULV) mediante homogeneización, sonicación o extrusión de las vesículas multilaminares. Además, las vesículas unilaminares pueden formarse mediante técnicas de eliminación con detergente.

En ciertas realizaciones de esta invención, las composiciones de la presente invención comprenden un vehículo de transferencia en el que el ARNm está asociado tanto en la superficie del vehículo de transferencia como encapsulado dentro del mismo vehículo de transferencia. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, los vehículos de transferencia liposómicos catiónicos pueden asociarse con el ARNm a través de interacciones electrostáticas.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden cargar con radionucleidos 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 rodamina-dioleoilfosfatidiletanolamina (Rh-PE), ARNm de proteína fluorescente verde (ARNm de GFP), ARNm de luciferasa de Renilla y ARNm de luciferasa de luciérnaga.

La selección del tamaño apropiado de un vehículo de transferencia de liposomas debe tener en cuenta el sitio de la célula o tejido diana y, hasta cierto punto, la aplicación para la que se fabrica el liposoma. En algunas realizaciones, puede ser deseable limitar la transfección del ARNm a ciertas células o tejidos. Por ejemplo, para dirigirse a los hepatocitos, se puede dimensionar un vehículo de transferencia liposomal de modo que sus dimensiones sean más pequeñas que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos en el hígado; en consecuencia, el vehículo de transferencia liposomal puede penetrar fácilmente tales fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos diana. Alternativamente, un vehículo de transferencia liposomal puede tener un tamaño tal que las dimensiones del liposoma tengan un diámetro suficiente para limitar o evitar expresamente la distribución en ciertas células o tejidos. Por ejemplo, se puede dimensionar un vehículo de transferencia liposomal de modo que sus dimensiones sean mayores que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos para limitar así la distribución del vehículo de transferencia liposomal a los hepatocitos. Generalmente, el tamaño del vehículo de transferencia está dentro del intervalo de aproximadamente de 25 a 250 nm, preferiblemente menos de aproximadamente de 250 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o 10 nm.

Están disponibles una variedad de métodos alternativos conocidos en la técnica para determinar el tamaño de una población de vehículos de transferencia liposómicos. Uno de estos métodos de dimensionamiento se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4,737,323, incorporado en el presente documento como referencia. La sonicación de una suspensión de liposomas, ya sea mediante baño o sonicación con sonda, produce una reducción progresiva del tamaño hasta un ULV pequeño de menos de aproximadamente 0.05 micrómetros de diámetro. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de corte para fragmentar liposomas grandes en otros más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, las MLV se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados, normalmente entre aproximadamente 0.1 y 0.5 micrómetros. El tamaño de las vesículas liposomales puede determinarse mediante dispersión de luz cuasi eléctrica (QELS) como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10: 421-450 (1981), incorporado en el presente documento como referencia. El diámetro promedio de los liposomas puede reducirse mediante sonicación de los liposomas formados. Los ciclos de sonicación intermitentes se pueden alternar con la evaluación por QELS para guiar la síntesis eficiente de liposomas.

#### Células diana

Como se usa en el presente documento, el término "célula diana" se refiere a una célula o tejido al que se dirige o direcciona una composición de la invención. En algunas realizaciones, las células diana son deficientes en una proteína o enzima de interés. Por ejemplo, cuando se desea administrar un ácido nucleico a un hepatocito, el hepatocito representa la célula diana. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención transfectan las células diana sobre una base discriminatoria (es decir, no transfectan células no diana). Las composiciones de la invención también se pueden preparar para dirigirse preferiblemente a una variedad de células diana, que incluyen, pero sin limitarse a, hepatocitos, células epiteliales, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células pulmonares, células óseas, células madre, células mesenquimales, células neurales (por ejemplo, meninges, astrocitos, neuronas motoras, células de los ganglios de la raíz dorsal y neuronas motoras del asta anterior), células fotorreceptoras (por ejemplo, bastones y conos), células epiteliales pigmentadas de la retina, células secretoras, 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.

Las composiciones de la invención pueden prepararse para distribuirse preferiblemente a células diana tales como en el corazón, pulmones, riñones, hígado y bazo. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se distribuyen en las células del hígado para facilitar el suministro y la posterior expresión del ARNm contenido en ellas por las células del hígado (por ejemplo, hepatocitos). Los hepatocitos objetivo pueden funcionar como un "reservorio"

o "depósito" biológico capaz de producir y excretar sistémicamente una proteína o enzima funcional. Por consiguiente, en una realización de la invención, el vehículo de transferencia liposomal puede dirigirse a los hepatocitos y/o distribuirse preferiblemente a las células del hígado tras el suministro. Después de la transfección de los hepatocitos diana, el ARNm cargado en el vehículo liposomal se traduce y se produce, excreta y distribuye sistémicamente un producto de proteína funcional. En otras realizaciones, las células distintas de los hepatocitos (por ejemplo, células de pulmón, bazo, corazón, oculares o del sistema nervioso central) pueden servir como ubicación de depósito para la producción de proteínas.

En una realización, las composiciones de la invención facilitan la producción endógena de una o más proteínas y/o enzimas funcionales de un sujeto, y en particular la producción de proteínas y/o enzimas que demuestran menos inmunogenicidad en relación con sus contrapartes preparadas de forma recombinante. En una realización preferida de la presente invención, los vehículos de transferencia comprenden ARNm que codifica una proteína o enzima deficiente. Tras la distribución de dichas composiciones a los tejidos diana y la subsiguiente transfección de dichas células diana, el ARNm exógeno cargado en el vehículo de transferencia liposomal (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) puede traducirse *in vivo* para producir una proteína o enzima funcional codificada por el ARNm administrado exógenamente (por ejemplo, una proteína o enzima en la que el sujeto es deficiente). En consecuencia, las composiciones de la presente invención aprovechan la capacidad de un sujeto para traducir ARNm preparado de forma exógena o recombinante para producir una proteína o enzima traducida endógenamente y, por lo tanto, producir (y cuando sea aplicable excretar) una proteína o enzima funcional. Las proteínas o enzimas expresadas o traducidas también pueden caracterizarse por la inclusión *in vivo* de modificaciones postraduccionales nativas que a menudo pueden estar ausentes en proteínas o enzimas preparadas de forma recombinante, reduciendo así aún más la inmunogenicidad de la proteína o enzima traducida.

La administración de ARNm que codifica una proteína o enzima deficiente evita la necesidad de suministrar los ácidos nucleicos a orgánulos específicos dentro de una célula diana (por ejemplo, mitocondrias). Más bien, tras la transfección de una célula diana y el suministro de los ácidos nucleicos al citoplasma de la célula diana, el contenido de ARNm de un vehículo de transferencia puede traducirse y expresarse una proteína o enzima funcional.

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

Alternativamente, la presente invención contempla el direccionamiento activo, que implica el uso de excipientes adicionales, denominados en el presente documento "ligandos de direccionamiento" que pueden unirse (ya sea de forma covalente o no covalente) al vehículo de transferencia para fomentar la localización de dicho vehículo de transferencia en ciertas células diana o tejidos diana. Por ejemplo, el direccionamiento puede estar mediado por la inclusión de uno o más ligandos de direccionamiento endógenos (por ejemplo, apolipoproteína E) en o sobre el vehículo de transferencia para estimular la distribución a las células o tejidos diana. El reconocimiento del ligando dirigido por los tejidos diana facilita activamente la distribución tisular y la absorción celular del vehículo de transferencia y/o su contenido en las células y tejidos diana (por ejemplo, la inclusión de un ligando dirigido a la apolipoproteína E en o sobre el vehículo de transferencia fomenta reconocimiento y unión del vehículo de transferencia a los receptores endógenos de lipoproteínas de baja densidad expresados por los hepatocitos). Como se proporciona en el presente documento, la composición puede comprender un ligando capaz de potenciar la afinidad de la composición por la célula diana. Los ligandos dirigidos pueden unirse a la bicapa externa de la partícula lipídica durante la formulación o después de la formulación. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Además, algunas formulaciones de partículas lipídicas pueden emplear polímeros fusogénicos tales como PEAA, hemaglutinina, otros lipopéptidos (véase la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 08/835,281, y 60/083,294, que se incorporan en el presente documento como referencia) y otras características útiles para el suministro *in vivo* y/o intracelular. En algunas otras realizaciones, las composiciones de la presente invención demuestran eficacias de transfección mejoradas y/o demuestran una selectividad mejorada hacia células diana o tejidos de interés. Por lo tanto, se contemplan composiciones que comprenden uno o más ligandos (por ejemplo, péptidos, aptámeros, oligonucleótidos, una vitamina u otras moléculas) que son capaces de potenciar la afinidad de las composiciones y su contenido de ácido nucleico por las células o tejidos diana. Los ligandos adecuados pueden unirse o enlazarse opcionalmente a la superficie del vehículo de transferencia. En algunas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede abarcar la superficie de un vehículo de transferencia o estar encapsulado dentro del vehículo de transferencia. Los ligandos adecuados se seleccionan en función de 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 células y su ligando de direccionamiento correspondiente pueden variar ampliamente. Los ligandos de direccionamiento adecuados se seleccionan de manera que se exploten las características únicas de una célula diana, lo que permite que la composición discrimine entre células diana y no diana. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden incluir marcadores de superficie (por ejemplo, apolipoproteína-B o apolipoproteína E) que mejoran selectivamente el reconocimiento o la afinidad por los hepatocitos (por ejemplo, mediante el reconocimiento mediado por receptores y la unión a tales marcadores de superficie). Además, se esperaría que el uso de galactosa como

ligando de direccionamiento dirija las composiciones de la presente invención a los hepatocitos parenquimatosos, o alternativamente se esperaría que el uso de residuos de azúcar que contienen manosa como ligando de direccionamiento dirija las composiciones de la presente invención a células endoteliales del hígado (por ejemplo, residuos de azúcar que contienen manosa que pueden unirse preferiblemente al receptor de 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 dichos ligandos de direccionamiento que se han conjugado con fracciones presentes en el vehículo de transferencia (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) facilita por lo tanto el reconocimiento y la absorción de las composiciones de la presente invención en células y tejidos diana. Los ejemplos de ligandos de direccionamiento adecuados incluyen uno o más péptidos, proteínas, aptámeros, vitaminas y oligonucleótidos.

#### Aplicación y administración

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluidos, pero sin limitarse a, humanos, primates no humanos, roedores y similares, a los cuales se administran las composiciones y los métodos de la presente invención. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

Las composiciones y los métodos de la invención proporcionan el suministro de ARNm para tratar enfermedades o trastornos relacionados con la deficiencia de proteínas y/o enzimas que son excretadas o secretadas por la célula diana en el fluido extracelular circundante (por ejemplo, ARNm que codifica hormonas y neurotransmisores). En realizaciones, la enfermedad puede implicar un defecto o deficiencia en una proteína secretada (por ejemplo, enfermedad de Fabry).

Las composiciones de la invención se pueden administrar a un sujeto. En algunas realizaciones, la composición se formula en combinación con uno o más ácidos nucleicos, vehículos, ligandos de direccionamiento o reactivos estabilizadores adicionales, o en composiciones farmacológicas en las que se mezcla con excipientes adecuados. Por ejemplo, en una realización, las composiciones de la invención se pueden preparar para suministrar ARNm que codifica dos o más proteínas o enzimas distintas. Las técnicas para la formulación y administración de medicamentos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, última edición.

Una amplia gama de moléculas que pueden ejercer efectos farmacéuticos o terapéuticos pueden administrarse en células diana usando composiciones y métodos de la invención. Las moléculas pueden ser orgánicas o inorgánicas. Las moléculas orgánicas pueden ser péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, esteroides, ácidos nucleicos (incluidos los ácidos nucleicos peptídicos) o cualquier combinación de los mismos. Una formulación para el suministro a las células diana puede comprender más de un tipo de molécula, por ejemplo, dos secuencias de nucleótidos diferentes, o una proteína, una enzima o un esteroide.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse y dosificarse de acuerdo con la práctica médica actual, teniendo en cuenta la condición clínica del sujeto, el sitio y el método de administración, el programa de administración, la edad, el sexo, el peso corporal y otros factores relevantes del sujeto para los médicos con experiencia ordinaria en la técnica. La "cantidad eficaz" para los fines del presente documento puede determinarse mediante consideraciones relevantes como las conocidas por los expertos en investigación clínica experimental, artes farmacológicas, clínicas y médicas. En algunas realizaciones, la cantidad administrada es eficaz para lograr al menos alguna estabilización, mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores seleccionados como medidas apropiadas del progreso, regresión o mejora de la enfermedad por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una cantidad y un régimen de dosificación adecuados son aquellos que provocan al menos una producción transitoria de proteínas.

Las vías de administración adecuadas incluyen inyecciones intravenosas.

Alternativamente, las composiciones de la invención pueden administrarse de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en un tejido diana, preferiblemente en una formulación de liberación sostenida. El suministro local puede verse afectado de varias maneras, según el tejido al que se destine.

Las formulaciones que contienen composiciones 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 pueda permitir que las composiciones se difundan desde el sitio de implantación a las células circundantes. Alternativamente, pueden aplicarse quirúrgicamente sin el uso de polímeros o soportes.

En una realización, las composiciones de la invención se formulan de manera que sean adecuadas para la liberación prolongada del ARNm contenido en ellas. Tales composiciones de liberación prolongada pueden administrarse convenientemente a un sujeto a intervalos de dosificación prolongados. Por ejemplo, en una realización, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces al día, diariamente o cada dos días. En una realización preferida, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces por semana, una vez por 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 vehículos liposómicos que se formulan para administración de depósito (por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea, intravítrea) para administrar o liberar un ARNm durante períodos de tiempo prolongados. Preferiblemente, los medios de liberación prolongada empleados se combinan con modificaciones realizadas en el ARNm para mejorar la estabilidad.

También se contemplan en el presente documento composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden una o más de las nanopartículas liposomales divulgadas en el presente documento y métodos relacionados para el uso de dichas composiciones liofilizadas como se divulga, por ejemplo, en la solicitud provisional de patente de los Estados Unidos No. 61/494,882, presentada el 8 de junio de 2011. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas liofilizadas de acuerdo con la invención pueden reconstituirse antes de la administración o pueden reconstituirse *in vivo*. Por ejemplo, una composición farmacéutica liofilizada puede formularse en una forma de dosificación adecuada (por ejemplo, una forma de dosificación intradérmica tal como un disco, varilla o membrana) y administrarse de manera que la forma de dosificación se rehidrate con el tiempo *in vivo* por los fluidos corporales del individuo.

Si bien ciertos compuestos, composiciones y métodos de la presente invención se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos de la invención y no pretenden limitarlos.

Los artículos "un" y "uno, una" como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, debe entenderse que incluyen los referentes en plural. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o son relevantes para un determinado producto o proceso, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplee o sea relevante para un producto o proceso determinado. La invención también incluye realizaciones en las que más de uno, o la totalidad de los miembros del grupo, están presentes, se emplean o son relevantes para un producto o proceso determinado. Las publicaciones y otros materiales de referencia a los que se hace referencia en el presente documento describen los antecedentes de la invención y proporcionan detalles adicionales sobre su práctica.

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Depósito de producción de proteínas mediante administración intravenosa de composiciones de polinucleótidos

#### ARN mensajero

Eritropoyetina humana (EPO) (SEQ ID NO: 3; Fig. 3), alfa-galactosidasa humana (GLA) (SEQ ID NO: 4; Fig. 4), alfa-1 antitripsina humana (A1AT) (SEQ ID NO: 5; Fig. 5), y factor IX humano (FIX) (SEQ ID NO: 6; Fig. 6) fueron sintetizados por transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN de plásmido que codifica el gen, que fue seguida por la adición de una estructura de protección de 5' (Cap1) (Fechter y Brownlee, J. Gen. Virology 86:1239-1249 (2005)) y una cola poli(A) en 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud determinada por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' estaban presentes en cada producto de ARNm en los siguientes ejemplos y están definidas por las SEQ ID NOs: 1 y 2 (Fig. 1 y Fig. 2) respectivamente.

#### Formulaciones de nanopartículas lipídicas

Formulación 1: Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/mL de C12-200, DOPE, Col y DMG-PEG2K (40:30:25:5) y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 mL. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4.5) de ARNm a partir de un patrón 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 PBS 1x (pH 7.4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C.

Formulación 2: Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/mL de DODAP, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K (18:56:20:6) y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 mL. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4.5) de ARNm de EPO a partir de un patrón 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 PBS 1x (pH 7.4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C. Concentración final = 1.35 mg/mL de ARNm de EPO (encapsulado).  $Z_{\text{promedio}} = 75.9 \text{ nm}$  ( $DV_{(50)} = 57.3 \text{ nm}$ ;  $DV_{(90)} = 92.1 \text{ nm}$ ).

Formulación 3: Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/mL de HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K (50:25:20:5) y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 mL. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4.5) de ARNm a partir de un patrón 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 PBS 1x (pH 7.4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C.



5 Formulación 4: Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/mL de ICE, DOPE y DMG-PEG2K (70:25:5) y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 mL. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4.5) de ARNm a partir de un patrón 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 PBS 1x (pH 7.4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C.

10 Formulación 5: Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/mL de HGT5000, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K (40:20:35:5) y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 mL. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4.5) de ARNm de EPO a partir de un patrón 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 PBS 1x (pH 7.4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C. Concentración final = 1.82 mg/mL de ARNm de EPO (encapsulado).  $Z_{promedio} = 105.6$  nm ( $Dv_{(50)} = 53.7$ nm;  $Dv_{(90)} = 157$ nm).

15 Formulación 6: Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/mL de HGT5001, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K (40:20:35:5) y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 mL. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4.5) de ARNm de EPO a partir de un patrón 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 PBS 1x (pH 7.4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C.

20 Análisis de proteína producida a través de nanopartículas cargadas con ARNm administradas por vía intravenosa

#### Protocolo de inyección

25 Los estudios se realizaron utilizando ratones CD-1 macho de aproximadamente 6-8 semanas de edad al comienzo de cada experimento, a menos que se indique lo contrario. Las muestras se introdujeron mediante una inyección única en bolo en la vena de la cola de una dosis total equivalente de 30-200 microgramos de ARNm encapsulado. Los ratones fueron sacrificados y perfundidos con solución salina en los puntos de tiempo designados.

#### Aislamiento de tejidos de órganos para análisis.

Se recogieron el hígado y el bazo de cada ratón, se repartieron en tres partes y se almacenaron en formalina tamponada neutra al 10 % o se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80 °C para su análisis.

#### Aislamiento de suero para análisis.

30 Todos los animales fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub> 48 horas después de la administración de la dosis ( $\pm 5$  %), seguida de toracotomía y extracción de sangre cardíaca terminal. Se recolectó sangre total (volumen máximo obtenible) mediante punción cardíaca en animales sacrificados en tubos separadores de suero, se dejó coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, se centrifugó a 22 °C  $\pm$  5 °C a 9300 g durante 10 minutos y se extrajo suero. Para las recolecciones de sangre provisionales, se recogieron aproximadamente 40-50  $\mu$ L de sangre entera mediante punción en la vena facial o corte de la cola. Las muestras recolectadas de animales sin tratamiento se usaron como referencia para la comparación con los animales de estudio.

#### Análisis de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

40 ELISA de EPO: La cuantificación de la proteína EPO se realizó siguiendo los procedimientos informados para el kit ELISA de EPO humana (Quantikine IVD, R&D Systems, Catálogo # Dep-00). Los controles positivos empleados consistieron en proteína eritropoyetina humana recombinante ultrapura y de grado de cultivo tisular (R&D Systems, catálogo # 286-EP y 287-TC, respectivamente). La detección se controló mediante absorción (450 nm) en un instrumento Molecular Device Flex Station.

45 ELISA de GLA: Se siguieron procedimientos ELISA estándar empleando IgG anti-alfa-galactosidasa G-188 de oveja como anticuerpo de captura con IgG anti-alfa-galactosidasa TK-88 de conejo como anticuerpo secundario (de detección) (Shire Human Genetic Therapies). Se usó IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para la activación de la solución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se inactivó usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N después de 20 minutos. La detección se controló mediante absorción (450 nm) en un instrumento Molecular Device Flex Station. Se usaron scrum de ratón sin tratar y proteína alfa-galactosidasa humana como controles negativos y positivos, respectivamente.

50 ELISA de FIX: La cuantificación de la proteína FIX se realizó siguiendo los procedimientos informados para el kit ELISA de FIX humana (AssayMax, Assay Pro, catálogo # EF1009-1).

ELISA de A1AT: La cuantificación de la proteína A1AT se realizó siguiendo los procedimientos informados para el kit ELISA de A1AT humana (Innovative Research, Catálogo # IRAPKT015).

## Análisis de transferencia Western

(EPO): Los análisis de transferencia Western se realizaron usando un anticuerpo anti-hEPO (R&D Systems # MAB2871) y proteína EPO humana ultrapura (R&D Systems # 286-EP) como control.

## Resultados

5 El trabajo descrito en este ejemplo demuestra el uso de nanopartículas lipídicas con ARNm encapsulado como fuente de depósito para la producción de proteínas. Tal efecto de depósito se puede lograr en múltiples sitios dentro del cuerpo (es decir, hígado, riñón, bazo y músculo). Se logró y cuantificó la medición de la proteína exógena deseada derivada del ARN mensajero administrado a través de nanopartículas liposomales, y la secreción de proteína de un depósito usando eritropoyetina humana (hEPO), alfa-galactosidasa humana (hGLA), alfa-1 antitripsina humana (hA1AT) y el ARNm del factor IX humano (hFIX).

10 1A. Resultados de la producción de la proteína EPO humana *in vivo*

15 La producción de proteína hEPO se demostró con varias formulaciones de nanopartículas lipídicas. De cuatro sistemas de lípidos catiónicos diferentes, las nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 produjeron la mayor cantidad de proteína hEPO después de cuatro horas después de la administración intravenosa según lo medido por ELISA (Fig. 7). Esta formulación (Formulación 1) resultó en 18.3 µg/mL de proteína hEPO secretada en el torrente sanguíneo. Los niveles normales de proteína hEPO en suero para humanos son de 3.3-16.6 mUI/mL (Documento NCCLS C28-P; Vol. 12, No. 2). Basado en una actividad específica de 120,000 UI/mg de proteína EPO, eso produce una cantidad de proteína hEPO de 27.5-138 pg/mL en individuos humanos normales. Por lo tanto, una sola dosis de 30 µg de una formulación lipídica catiónica basada en C12-200 que encapsulaba el ARNm de hEPO produjo un aumento en la proteína respectiva de más de 100,000 veces los niveles fisiológicos.

20 De los sistemas de lípidos probados, la formulación de nanopartículas lipídicas basada en DODAP fue la menos eficaz. Sin embargo, la cantidad observada de proteína EPO humana derivada de la administración a través de una nanopartícula lipídica basada en DODAP que encapsulaba el ARNm de EPO fue de 4.1 ng/mL, que aún es más de 30 veces superior a los niveles fisiológicos normales de proteína EPO (Tabla 1).

25 Tabla 1. Valores sin procesar de la proteína hEPO secretada para varios sistemas de nanopartículas basados en lípidos catiónicos medidos mediante análisis de ELISA (como se muestra en la Fig. 8). Las dosis se basan en el ARNm de hEPO encapsulado. Los valores de proteína se representan como nanogramos de proteína EPO humana por mililitro de suero. Los cambios en el hematocrito se basan en la comparación del sangrado previo (Día -1) y el Día 10.

Componente lipídico catiónico/ionizable	Dosis de ARNm encapsulado (µg)	Proteína EPO humana secretada (ng/mL)	Aumento del hematocrito (%)
C12-200	30	18,306	15.0
HGT4003	150	164	0.0
HIELO	100	56.2	0.0
DODAP	200	4.1	0.0

30 Además, la proteína resultante se analizó para determinar si estaba activa y funcionaba correctamente. En el caso de la terapia de reemplazo de ARNm (MRT) que emplea ARNm de hEPO, se controlaron los cambios en el hematocrito durante un período de diez días para cinco formulaciones diferentes de nanopartículas lipídicas (Fig. 8, Tabla 1) para evaluar la actividad de la proteína. Durante este período de tiempo, dos de las cinco formulaciones demostraron un aumento en el hematocrito ( $\geq 15\%$ ), lo que indica que dichos sistemas producen proteína hEPO activa.

35 En otro experimento, se controlaron los cambios en el hematocrito durante un período de 15 días (Fig. 9, Tabla 2). La formulación de nanopartículas lipídicas (Formulación 1) se administró como una dosis única de 30 µg o como tres dosis más pequeñas de 10 µg inyectadas el día 1, el día 3 y el día 5. De manera similar, la Formulación 2 se administró en 3 dosis de 50 µg el día 1, el día 3 y el día 5. C12-200 produjo un aumento significativo en el hematocrito. En general, se observó un aumento de hasta ~25 % de cambio, lo que es indicativo de la producción de proteína EPO humana activa a partir de tales sistemas.

40 Tabla 2. Niveles de hematocrito de cada grupo durante un período de observación de 15 días (FIG. 9). A los ratones se les administró una dosis única o tres inyecciones, cada dos días. N = 4 ratones por grupo.

Artículo de prueba	Dosis (µg/animal)	Media de los niveles de Hct (%) $\pm$ SEM			
		Día -4	Día 7	Día 10	Día 15 <sup>a</sup>
C12-200	30 (dosis única)	50.8 $\pm$ 1.8	58.3 $\pm$ 3.3	62.8 $\pm$ 1.3	59.9 $\pm$ 3.3
C12-200	30 (más de 3 dosis)	52.2 $\pm$ 0.5	55.3 $\pm$ 2.3	63.3 $\pm$ 1.6	62.3 $\pm$ 1.9
DODAP	150 (más de 3 dosis)	54.8 $\pm$ 1.7	53.5 $\pm$ 1.6	54.2 $\pm$ 3.3	54.0 $\pm$ 0.3

Artículo de prueba	Dosis (µg/animal)	Media de los niveles de Hct ( %) ± SEM			
		Día -4	Día 7	Día 10	Día 15 <sup>a</sup>
Hct = hematocrito; SEM = error estándar de la media.					
<sup>a</sup> Las muestras de sangre se recogieron en tubos de hematocrito no heparinizados.					

1B. Resultados de la producción de proteína GLA humana *in vivo*

Se exploró un segundo sistema de proteínas de base exógena para demostrar el "efecto de depósito" al emplear nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm. A los animales se les inyectó por vía intravenosa una dosis única de 30 microgramos de ARNm de alfa-galactosidasa humana (hGLA) encapsulada utilizando un sistema de nanopartículas lipídicas basado en C12-200 y se sacrificaron después de seis horas (Formulación 1). La cuantificación de la proteína hGLA secretada se realizó mediante ELISA. Se utilizaron como controles suero de ratón no tratado y proteína alfa-galactosidasa humana. La detección de la proteína alfa-galactosidasa humana se controló durante un período de 48 horas.

Se observaron niveles medibles de proteína hGLA a lo largo del tiempo del experimento con un nivel máximo de 2.0 µg/mL de proteína hGLA a las seis horas (Fig. 10). La Tabla 3 enumera las cantidades específicas de hGLA que se encuentran en el suero. Se ha informado que la actividad normal en varones humanos sanos es de aproximadamente 3.05 nanomol/h/mL. La actividad de alfa-galactosidasa, una proteína alfa-galactosidasa humana recombinante,  $3.56 \times 10^6$  nanomol/h/mg. El análisis de estos valores arroja una cantidad de aproximadamente 856 pg/mL de proteína hGLA en individuos masculinos sanos normales. La cantidad de proteína hGLA de 2.0 µg/mL observada después de seis horas cuando se dosifica una nanopartícula lipídica cargada con ARNm de hGLA es más de 2300 veces mayor que los niveles fisiológicos normales. Además, después de 48 horas, todavía se pueden detectar niveles apreciables de proteína hGLA (86.2 ng/mL). Este nivel es representativo de cantidades casi 100 veces mayores de proteína hGLA sobre las cantidades fisiológicas aún presentes a las 48 horas.

Tabla 3. Valores sin procesar de la proteína hGLA secretada a lo largo del tiempo medidos mediante análisis ELISA (como se muestra en la Fig. 10). Los valores se representan como nanogramos de proteína hGLA por mililitro de suero. N = 4 ratones por grupo.

Tiempo después de la administración (h)	Proteína GLA humana secretada (ng/mL)
6	2,038
12	1,815
24	414
48	86.2

Además, la vida media de la alfa-galactosidasa cuando se administra a razón de 0.2 mg/kg es de aproximadamente 108 minutos. La producción de proteína GLA a través del "efecto de depósito" cuando se administran nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de GLA muestra un aumento sustancial en el tiempo de residencia en la sangre en comparación con la inyección directa de la proteína recombinante desnuda. Como se describió anteriormente, cantidades significativas de proteína están presentes después de 48 horas.

El perfil de actividad de la proteína α-galactosidasa producida a partir de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de GLA se midió en función del metabolismo de 4-metilumbeliferil-αD-galactopiranosido (4-MU-α-gal). Como se muestra en la Fig. 11, la proteína producida a partir de estos sistemas de nanopartículas es bastante activa y refleja los niveles de proteína disponibles (Fig. 12, Tabla 3). Las comparaciones del AUC de la producción de hGLA basada en la terapia con ARNm versus la terapia de reemplazo enzimático (ERT) en ratones y humanos muestran un aumento de 182 y 30 veces, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de los valores de C<sub>máx.</sub> y AUC<sub>inf.</sub> en pacientes con Fabry después de la dosificación IV de 0.2 mg/kg de alfa-galactosidasa (dosis farmacológica) con aquellos en ratones después de la dosificación IV de alfa-galactosidasa y ARNm de GLA. <sup>a</sup> Los datos procedían de un artículo publicado (Gregory M. Pastores et al. Safety and Pharmacokinetics of hGLA in patients with Fabry disease and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* (2007) 22:1920-1925. <sup>b</sup> enfermedad renal no terminal. <sup>c</sup> Actividad de α-galactosidasa a las 6 horas después de la dosificación (el punto de tiempo más temprano probado en el estudio).

	Artículo de prueba	Descripción	Dosis (mg/kg)	C <sub>máx.</sub> (U/mL)	AUC <sub>inf.</sub> (h.U/mL)	n
Paciente con Fabry <sup>a</sup>	Proteína α-GAL	Trasplante	0.2	3478	3683	11
		Diálisis	0.2	3887	3600	6

	Artículo de prueba	Descripción	Dosis (mg/kg)	C <sub>máx.</sub> (U/mL)	AUC <sub>inf.</sub> (h.U/mL)	n
		No ESRD <sup>B</sup>	0.2	3710	4283	18
Ratón	Proteína α-GAL (MM1)	Desnudo atímico	0.04	3807	797	3
	Proteína α-GAL (MM2)	Desnudo atímico	0.04	3705	602	3
Ratón	ARNm de α-GAL	ratón	0.95	5885(C <sub>a las 6h</sub> ) <sup>C</sup>	109428	6

Se ha demostrado la capacidad de las nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm para dirigirse a órganos que pueden actuar como depósito para la producción de una proteína deseada. Los niveles de proteína secretada observados han estado varios órdenes de magnitud por encima de los niveles fisiológicos normales. Este "efecto de depósito" es repetible. La Fig. 12 muestra nuevamente que se observa una producción robusta de proteínas al administrar ratones de tipo silvestre (CD-1) con una dosis única de 30 µg de ARNm de hGLA cargado en nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 (Formulación 1). En este experimento, los niveles de hGLA se evaluaron durante un período de 72 horas. Se detecta un promedio máximo de 4.0 µg de proteína hGLA humana/mL de suero seis horas después de la administración. Con base en un valor de ~1 ng/mL de proteína hGLA para niveles fisiológicos normales, la MRT con hGLA proporciona niveles de proteína aproximadamente 4000 veces más altos. Como antes, la proteína hGLA se pudo detectar hasta 48 horas después de la administración (Fig. 12).

Un análisis de tejidos aislados de este mismo experimento proporcionó información sobre la distribución de la proteína hGLA en ratones tratados mediante MRT con hGLA (Fig. 13). Se detectaron niveles suprafisiológicos de proteína hGLA en el hígado, bazo y riñones de todos los ratones tratados con un máximo observado entre 12 y 24 horas después de la administración. Se pudieron observar niveles detectables de proteína derivada de MRT tres días después de una única inyección de nanopartículas lipídicas cargadas con hGLA.

Además, se demostró que la producción de hGLA tras la administración de nanopartículas C12-200 cargadas con ARNm de hGLA presenta una respuesta a la dosis en el suero (Fig. 14A), así como en el hígado (Fig. 14B).

Una característica inherente de la terapia de reemplazo de ARNm mediada por nanopartículas lipídicas sería el perfil farmacocinético de la proteína respectiva producida. Por ejemplo, el tratamiento basado en ERT de ratones empleando alfa-galactosidasa da como resultado una vida media en plasma de aproximadamente 100 minutos. Por el contrario, la alfa-galactosidasa derivada de MRT tiene un tiempo de residencia en sangre de aproximadamente 72 horas con un tiempo máximo de 6 horas. Esto permite una exposición mucho mayor para que los órganos participen en la posible absorción continua de la proteína deseada. Una comparación de perfiles PK se muestra en la Fig. 15 y demuestra la gran diferencia en las tasas de eliminación y, en última instancia, se puede lograr un cambio importante en el área bajo la curva (AUC) a través del tratamiento basado en MRT.

En un experimento separado, se aplicó MRT con hGLA a un modelo de enfermedad en ratones, ratones con hGLA inactivados (ratones Fabry). Una dosis de 0.33 mg/kg de nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 cargadas con ARNm de hGLA (Formulación 1) se administró a ratones hembra inactivados como una única inyección intravenosa. Se produjeron cantidades sustanciales de proteína hGLA derivada de MRT con un pico a las 6 horas (~560 ng/mL en suero) que es aproximadamente 600 veces mayor que los niveles fisiológicos normales. Además, la proteína hGLA todavía era detectable 72 horas después de la administración (Fig. 16).

La cuantificación de la proteína GLA derivada de MRT en órganos vitales demostró una acumulación sustancial como se muestra en la Fig. 17. Se representa gráficamente una comparación de la proteína hGLA derivada de MRT observada con los niveles fisiológicos normales informados que se encuentran en órganos clave (los niveles normales se representan como líneas discontinuas). Mientras que los niveles de proteína a las 24 horas son más altos que a las 72 horas después de la administración, los niveles de proteína hGLA detectados en el hígado, riñón, bazo y corazón de los ratones Fabry tratados son equivalentes a los niveles de tipo silvestre. Por ejemplo, se encontraron 3.1 ng de proteína hGLA/mg de tejido en los riñones de los ratones tratados 3 días después de un único tratamiento MRT.

En un experimento posterior, se llevó a cabo una comparación del tratamiento con alfa-galactosidasa basado en ERT frente al tratamiento basado en MRT con hGLA de ratones Fabry inactivados macho. Se administró una dosis intravenosa única de 1.0 mg/kg para cada terapia y los ratones se sacrificaron una semana después de la administración. Los niveles en suero de proteína hGLA se controlaron a las 6 h y 1 semana después de la inyección. Se analizaron hígado, riñón, bazo y corazón para determinar la acumulación de proteína hGLA una semana después de la administración. Además de los análisis de biodistribución, se determinó una medida de eficacia mediante la medición de las reducciones de globotriasilceramida (Gb3) y liso-Gb3 en el riñón y el corazón. La Fig. 18 muestra los niveles en suero de proteína hGLA después del tratamiento con alfa-galactosidasa o nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de GLA (Formulación 1) en ratones Fabry macho. Las muestras de suero se analizaron a las 6 h y 1 semana después de la administración. Se detectó una señal robusta para los ratones tratados con MRT después de 6 horas, con niveles en suero de proteína hGLA de ~4.0 µg/mL. Por el contrario, no quedaba alfa-galactosidasa detectable en el torrente sanguíneo en este momento.

Los ratones Fabry en este experimento fueron sacrificados una semana después de la inyección inicial y los órganos fueron recolectados y analizados (hígado, riñón, bazo, corazón). La Fig. 19 muestra una comparación de la proteína GLA humana encontrada en cada órgano respectivo después de tratamiento MRT con hGLA o ERT con alfa-galactosidasa. Los niveles corresponden a hGLA presente una semana después de la administración. Se detectó proteína hGLA en todos los órganos analizados. Por ejemplo, los ratones tratados con MRT dieron como resultado una acumulación de proteína hGLA en el riñón de 2.42 ng de proteína hGLA/mg de proteína, mientras que los ratones tratados con alfa-galactosidasa solo tenían niveles residuales (0.37 ng/mg de proteína). Esto corresponde a un nivel ~6.5 veces mayor de proteína hGLA cuando se trata mediante MRT con hGLA. Tras el análisis del corazón, se encontraron 11.5 ng de proteína hGLA/mg de proteína para la cohorte tratada con MRT en comparación con solo 1.0 ng/mg de proteína alfa-galactosidasa. Esto corresponde a una acumulación ~11 veces mayor en el corazón para los ratones tratados con MRT con hGLA que con las terapias basadas en ERT.

Además de los análisis de biodistribución realizados, las evaluaciones de eficacia se determinaron mediante la medición de los niveles de globotriaosilceramida (Gb3) y liso-Gb3 en órganos clave. Una comparación directa de la reducción de Gb3 después de un único tratamiento intravenoso con 1.0 mg/kg de MRT con GLA en comparación con una terapia basada en ERT con alfa-galactosidasa de una dosis equivalente produjo una diferencia considerable en los niveles de Gb3 en los riñones y el corazón. Por ejemplo, los niveles de Gb3 para MRT con GLA frente a alfa-galactosidasa produjeron reducciones del 60.2 % frente al 26.8 %, respectivamente (Fig. 20). Además, los niveles de Gb3 en el corazón se redujeron en un 92.1 % frente a un 66.9 % para MRT y alfa-galactosidasa, respectivamente (Fig. 21).

Un segundo biomarcador relevante para medir la eficacia es liso-Gb3. La MRT con GLA redujo la liso-Gb3 de manera más eficiente que la alfa-galactosidasa también en los riñones y el corazón (Fig. 20 y Fig. 21, respectivamente). En particular, los ratones Fabry tratados con MRT demostraron reducciones de liso-Gb3 del 86.1 % y el 87.9 % en los riñones y el corazón en comparación con los ratones tratados con alfa-galactosidasa, lo que produjo una disminución del 47.8 % y el 61.3 %, respectivamente.

Los resultados con hGLA en nanopartículas lipídicas basadas en C12-200 se extienden a otras formulaciones de nanopartículas lipídicas. Por ejemplo, el ARNm de hGLA cargado en HGT4003 (Formulación 3) o nanopartículas lipídicas basadas en HGT5000 (Formulación 5) administradas como dosis única IV dan como resultado la producción de hGLA a las 24 horas después de la administración (Fig. 22). La producción de hGLA mostró una respuesta a la dosis. De manera similar, la producción de hGLA se observó a las 6 horas y 24 horas después de la administración de ARNm de hGLA cargado en nanopartículas lipídicas basadas en HGT5001 (Formulación 6) administradas como una dosis única IV. Se observó producción de hGLA en el suero (Fig. 23A), así como en los órganos (Fig. 23B).

En general, la terapia de reemplazo de ARNm aplicada como un depósito para la producción de proteínas produce grandes cantidades de proteína terapéutica funcionalmente activa a niveles suprafisiológicos. Se ha demostrado que este método produce una vida media en circulación sostenida de la proteína deseada y esta proteína derivada de MRT es altamente eficaz para la terapia, como se demostró con la enzima alfa-galactosidasa en ratones Fabry.

#### 1C. Resultados de la producción de proteína FIX humana *in vivo*

Los estudios se realizaron administrando nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de Factor IX (FIX) en ratones de tipo silvestre (CD-1) y determinando la proteína FIX que se secreta en el torrente sanguíneo. Tras la inyección intravenosa de una dosis única de 30 µg de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de FIX basadas en C12-200 (C12-200:DOPE:Col:PEG en una proporción de 40:30:25:5) (dosis basada en el ARNm encapsulado) (Formulación 1), se observó una producción robusta de proteína (Fig. 24).

Un análisis farmacocinético durante 72 horas mostró que la proteína FIX derivada de MRT podía detectarse en todos los puntos de tiempo analizados (Fig. 24). La concentración en suero máxima se observó a las 24 h después de la inyección con un valor de ~3 µg (2995 ± 738 ng/mL) de proteína FIX/mL de suero. Esto representa otro ejemplo exitoso del efecto de depósito.

#### 1D. Resultados de la producción de proteína A1AT humana *in vivo*

Se realizaron estudios administrando nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de alfa-1-antitripsina (A1AT) en ratones de tipo silvestre (CD-1) y determinando la proteína A1AT que se secreta en el torrente sanguíneo. Tras la inyección intravenosa de una dosis única de 30 µg de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de A1AT basadas en C12-200 (dosis basada en ARNm encapsulado) (Formulación 1), se observó una producción robusta de proteína (Fig. 25).

Como se muestra en la Fig. 25, se pudieron observar niveles detectables de proteína A1AT humana derivada de MRT con A1AT durante un período de tiempo de 24 horas después de la administración. Se detectó un nivel máximo en suero de ~48 µg de proteína A1AT/mL de suero 12 horas después de la inyección.

Ejemplo 2: Depósito de la producción de proteína a través del suministro pulmonar de composiciones de polinucleótidos (este ejemplo es solo para fines de referencia)

Protocolo de inyección

5 Todos los estudios se realizaron utilizando ratones hembra CD-1 o BALB/C de aproximadamente 7-10 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Los artículos de prueba se introdujeron a través de una sola administración intratraqueal en aerosol. Los ratones fueron sacrificados y perfundidos con solución salina en los puntos de tiempo designados. Los pulmones de cada ratón se recogieron, se repartieron en dos partes y se almacenaron en formalina tamponada neutra al 10 % o se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80 °C para su análisis. El suero se aisló como se describe en el Ejemplo 1. ELISA de EPO: como se describe en el ejemplo 1.

Resultados

10 El efecto de depósito se puede lograr mediante suministro pulmonar (por ejemplo, intranasal, intratraqueal, nebulización). Se logró y cuantificó la medición de la proteína de base exógena deseada derivada del ARN mensajero suministrada a través de sistemas de nanopartículas.

15 La producción de proteína EPO humana a través de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de hEPO se probó en ratones CD-1 mediante una única administración intratraqueal (MicroSprayer®). Se probaron varias formulaciones usando varios lípidos catiónicos (Formulaciones 1, 5, 6). Todas las formulaciones dieron como resultado una alta encapsulación de ARNm de EPO humana. Tras la administración, los animales se sacrificaron seis horas después de la administración y se recogieron los pulmones y suero.

20 Se detectó proteína EPO humana en el sitio de administración (pulmones) tras el tratamiento mediante suministro en aerosol. El análisis del suero seis horas después de la administración mostró cantidades detectables de proteína hEPO en circulación. Estos datos (mostrados en la FIG. 26) demuestran la capacidad del pulmón para actuar como un "depósito" para la producción (y secreción) de la proteína hEPO.

Listado de secuencias

<110> SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, INC.

25 <120> COMPOSICIONES DE NANOPARTÍCULAS DE LÍPIDOS Y MÉTODOS PARA EL SUMINISTRO DE ARNm

<130> P063001EP

<140> PCT/US2012/041724

30 <141> 2012-06-08

<150> 61/494,881

<151> 2011-06-08

35 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

40 <211> 140

<212> ARN

<213> Citomegalovirus humano

<220>

45 <221> Característica miscelánea

<222> (1)..(3)

<223> /nota = "Esta región puede o no estar presente"

<400> 1

ggacagaucg ccugggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac 60

cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120

gacucaccgu ccuugacacg 140

50 <210> 2

<211> 100

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 911 653 T3

cggguggcau cccugugacc ccucuccagu gccucuccug gccucggaag uugccacucc 60  
 agugcccacc agccuugucc uaauaaaauu aaguugcauc 100

<210> 3  
 <211> 582  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

augggggugc acgaaugucc ugccuggcug ugguucucc ugucccugcu gucgcuccu 60  
 cugggccucc caguccuggg cgtcccacca cgccucaucu gugacagccg aguccuggag 120  
 agguaccucu uggaggccaa ggaggccgag aauaucacga cgggcugugc ugaacacugc 180  
 agcuugaaug agaauaucac ugucccagac accaaaguua auuucuauvc cuggaagagg 240  
 auggaggucg ggcagcaggc cguagaaguc uggcagggcc uggcccugcu gucggaagcu 300  
 guccugcggg gccaggcccu guuggucaac ucuucccagc cgugggagcc ccugcagcug 360  
 cauguggaua aagccgucag uggccuucgc agccucacca cucugcuucg ggcucuggga 420  
 gcccagaagg aagccaucuc ccucccagau gcggccucag cugcuccacu ccgaacaauc 480  
 acugcugaca cuuuccgcaa acucuuccga gucuacucca auuuccuccg gggaaagcug 540  
 aagcuguaca caggggaggc cugcaggaca ggggacagau ga 582

<210> 4  
 <211> 1290  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 4

ES 2 911 653 T3

augcagcuga ggaacccaga acuacaucug ggcugcgcgc uugcgcuucg cuuccuggcc 60  
 cucguuuccu gggacauccc uggggcuaga gcacuggaca auggauuggc aaggacgccu 120  
 accaugggcu ggcugcacug ggagcgcuuc augugcaacc uugacugcca ggaagagcca 180  
 gauuccugca ucagugagaa gcucuucaug gagauggcag agcucauggu cucagaaggc 240  
 uggaaggau cagguuaua guaccucugc auugaugacu guuggauggc uccccaaga 300  
 gauucagaag gcagacuua ggcagaccu cagcgcuuuc cucaugggau ucgccagcua 360  
 gcuaauuau uucacagcaa aggacugaag cuagggauuu augcagaugu uggaauaaa 420  
 accugcgcag gcuucccugg gaguuuugga uacuacgaca uugaugccca gaccuuugcu 480  
 gacuggggag uagaucugcu aaaaauugau gguuguuacu gugacaguuu ggaaaaauug 540  
 gcagaugguu auaagcacau guccuuggcc cugaauagga cuggcagaag cauuguguac 600  
 uccugugagu ggccucuua uauguggccc uuucaaaagc ccauuauac agaaauccga 660  
 caguacugca aucacuggcg aaauuuugcu gacauugaug auuccuggaa aaguauaaag 720  
 aguaucugg acuggacauc uuuuaaccag gagagaauug uugauguugc uggaccaggg 780  
 gguuggaau acccagauau guuagugauu ggcaacuug gccucagcug gaucagcaa 840  
 guaacucaga uggcccucug ggcuaucaug gcugcuccu uauucauguc uaauagaccuc 900  
 cgacacauca gcccucaagc caaagcucuc cuucaggaua aggacguaau ugccaucaau 960  
 caggaccccu ugggcaagca aggguaaccag cuuagacagg gagacaacuu ugaagugugg 1020  
 gaacgaccuc ucucaggcuu agccugggcu guagcuauga uaaaccggca ggagauuggu 1080  
 ggaccucgcu cuuauaccu cgcaguugcu ucccugggua aaggaguggc cuguauuccu 1140  
 gccugcuuca ucacacagcu ccucccugug aaaaggaagc uaggguuuca ugaauggacu 1200  
 ucaagguuaa gaagucacau aaaucccaca ggcacuguuu ugcuucagcu agaaaauaca 1260  
 augcagaugu cauuaaaaga cuuacuuuaa 1290

<210> 5  
 <211> 1257  
 <212> ARN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5



ES 2 911 653 T3

augccgucuu cugucucgug gggcauccuc cugcuggcag gccugugcug ccuggucccu 60  
 gucucccugg cugaggaucc ccaggagau gcugcccaga agacagauac aucccaccu 120  
 gaucaggaucc acccaaccuu caacaagauc accccaacc uggcugaguu cgccuucagc 180  
 cuauaccgcc agcuggcaca ccaguccaac agcaccaua ucuucuucuc ccagugagc 240  
 aucgcuacag ccuuugcaau gcucucccug gggaccaagg cugacacuca cgaugaauc 300  
 cuggagggcc ugaauucaa ccucacggag auuccggag cucagaacca ugaaggcuuc 360  
 caggaacucc uccguaccu caaccagcca gacagccagc uccagcugac caccggcaau 420  
 ggccuguucc ucagcgaggg ccugaagcua guggauaagu uuuuggagga uguuaaaaag 480  
 uuguaccacu cagaagccuu cacugucaac uucggggaca ccgaagaggc caagaaacag 540  
 aucaacgauu acguggagaa ggguacucua gggaaaauug uggauuuggu caaggagcuu 600  
 gacagagaca caguuuuugc ucugrugauu uacaucuucu uuaaaggca augggagaga 660  
 cccuuugaag ucaaggacac cgaggaagag gacuuccacg uggaccaggu gaccaccgug 720  
 aaggugccua ugaugaagcg uuuaggcaug uuaacaucc agcacuguaa gaagcugucc 780  
 agcugggugc ugcugaugaa auaccugggc aaugccaccg ccaucuucu ccugccugau 840  
 gaggggaaac uacagcaccu ggaaaaugaa cucaccacg auaucaucac caaguuccug 900  
 gaaaugaag acagaagguc ugccagcuua cauuuaccca aacuguccau uacuggaacc 960  
 uaugaucuga agagcguccu gggucaacug ggcaucacua agguucuucag caauggggcu 1020  
 gaccucuccg gggucacaga ggaggcacc cugaagcucu ccaaggccgu gcuaaaggcu 1080  
 gugcugacca ucgacgagaa agggacugaa gcugcugggg ccauguuuuu agaggccaau 1140  
 ccaugucua ucccccccga ggucaaguuc aacaaaccu uugucuucu aaugauugaa 1200  
 caaaauacca agucucccu cuucauggga aaagugguga aucccacca aaaauaa 1257

<210> 6

<211> 1386

<212> ARN

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

augcagcgcg ugaacaugau cauggcagaa ucaccaggcc ucaucaccu cugccuuuuu 60  
 ggauaucuac ucagugcuga auguacaguu uuucuugauc augaaaacgc caacaaaau 120  
 cugagcgcca gaaggaggua uaaucaggu aaauuggaag aguuuguuca agggaaccuu 180  
 gagagagaau guauggaaga aaaguguagu uuugaagaag cacgagaagu uuuugaaaac 240

ES 2 911 653 T3

acugaaagaa caacugaauu uuggaagcag uauguugaug gagaucagug ugaguccaau 300  
ccauguuuaa auggcggcag uugcaaggau gacauuaau ccuaugaaug uugguguccc 360  
uuuggauuug aaggaaagaa cugugaauua gauguaacau guaacaauaa gaauggcaga 420  
ugcgagcagu uuuguaaaaa uagugcugau aacaaggugg uuugcuccug uacugagggg 480  
uaucgacuug cagaaaacca gaaguccugu gaaccagcag ugccaauucc auguggaaga 540  
guuucuguuu cacaaacuuc uaagcucacc cgugcugagg cuguuuuucc ugauguggac 600  
uauguaauu cuacugaagc ugaaaccauu uuggauaaca ucacuaaag cacccaauca 660  
uuuaaugacu ucacucgggu uguuuggugga gaagaugcca aaccagguca auucccuugg 720  
cagguuguuu ugaauuguaa aguugaugca uucuguggag gcucuaucgu uaaugaaaa 780  
uggauuguaa cugcugccca cuguguugaa acugguguua aaauacagu ugucgcaggu 840  
gaacuaaua uugaggagac agaacauaca gagcaaaagc gaaaugugau ucgaauuuu 900  
ccucaccaca acuacaaugc agcuauuuau aaguacaacc augacauugc ccuucuggaa 960  
cuggacgaac ccuugugcu aaacagcuac guuacaccua uuugcauugc ugacaaggaa 1020  
uacacgaaca ucuuccucaa auuuggaucu ggcuanguaa guggcugggg aagagucuuc 1080  
cacaaagggg gaucagcuuu aguucucag uaccuagag uuccacuugu ugaccgagcc 1140  
acaugucuuc gaucuacaaa guucaccauc uauaacaaca uguucugugc ugguuccau 1200  
gaaggaggua gagauucaug ucaaggagau agugggggac cccauguuac ugaaguggaa 1260  
gggaccaguu ucuuaacugg aaauuuuagc uggggugaag agugugcaau gaaaggcaaa 1320  
uauggaauu auaccaaggu aucccggauu gucaacugga uuaaggaaaa aacaaagcuc 1380  
acuuaa 1386

<210> 7

<211> 90

<212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 7

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

10 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 90

<210> 8

<211> 200

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 8

# ES 2 911 653 T3

	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 60</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 120</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 180</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa 200</p>	
5	<p>&lt;210&gt; 9            &lt;211&gt; 300            &lt;212&gt; ARN            &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; fuente            &lt;223&gt; /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"</p> <p>&lt;400&gt; 9</p>	
10	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 60</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 120</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 180</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 240</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 300</p>	
15	<p>&lt;210&gt; 10            &lt;211&gt; 400            &lt;212&gt; ARN            &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; fuente            &lt;223&gt; /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"</p> <p>&lt;400&gt; 10</p>	
20	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 60</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 120</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 180</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 240</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 300</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 360</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 400</p>	
25	<p>&lt;210&gt; 11            &lt;211&gt; 500            &lt;212&gt; ARN            &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; fuente            &lt;223&gt; /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"</p> <p>&lt;400&gt; 11</p>	

# ES 2 911 653 T3

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	420
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	480
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	500

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende (a) al menos una molécula de ARNm, al menos una parte de la cual codifica un polipéptido secretado funcional, en la que el polipéptido secretado es alfa-galactosidasa (GAL); y (b) un vehículo de transferencia liposomal que comprende una nanopartícula lipídica que comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos y uno o más lípidos modificados con PEG para usar en un método para tratar a un sujeto que tiene un defecto o deficiencia en dicho polipéptido secretado, en el que la nanopartícula lipídica comprende un liposoma, en el que el liposoma encapsula al menos un ARNm, y en el que la composición se administra por vía intravenosa.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la molécula de ARN comprende:
- al menos una modificación que confiere estabilidad a la molécula de ARN; una modificación de la región 5' no traducida de dicha molécula de ARN, en la que opcionalmente dicha modificación comprende la inclusión de una estructura Cap1; o una modificación de la región 3' no traducida de dicha molécula de ARN, en la que opcionalmente dicha modificación comprende la inclusión de una cola de poli A.
3. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la nanopartícula lipídica comprende:
- C12-200; DLinKC2DMA, CHOL, DOPE y DMG-PEG-2000; o C12-200, DOPE, CHOL, y DMGPEG2K.
4. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la nanopartícula lipídica comprende un lípido escindible.
5. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición está liofilizada.
6. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicha composición es una composición liofilizada reconstituida.
7. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición es para administración al sujeto dos veces por semana, una vez por semana, cada diez días, cada dos semanas, o cada tres semanas.
8. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el tamaño del vehículo de transferencia está dentro del intervalo de aproximadamente 25 a 250 nm.
9. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el tamaño del vehículo de transferencia es inferior a 250 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o 10 nm.
10. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el polipéptido se expresa al menos a un nivel terapéutico durante más de una, más de cuatro, más de seis, más de 12, más de 24, más de 48 horas, o más de 72 horas después de la administración, en la que opcionalmente el nivel de proteína secretada es detectable a los 3 días, 4 días, 5 días, o 1 semana o más después de la administración.

**Secuencia 5' del CMV:**

XCA GAUCCGCCUGGAGACGCCAUCCACGGUJUUGACCCUUAJAGAGACACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGGGGC  
CGGGAACGGUGCAUUGGACCGCGAUUCCCGUGKCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG  
(SEQ ID NO: 1)

***FIG. 1***

**Secuencia 3' de hGH:**

CGGGUGGCAUCCUUGUGACCCUCCUCCAGUGCCUCCUUGGCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCACCAGCCUUG  
UCCUAAUAAAUAAGUUGCAUC (SEQ ID NO: 2)

***FIG. 2***

ARNm de eritropoyetina (EPO) humana:

AUGGGGUGCACGAAUGUCCUGCCUGGCUUGGGCUUUCUCCUGUCCUUGCCUUGCUUGCCUUGGGCCUCCAGUCC  
UGGGGCCCCACCACGCCUCAUCUGUGACAGCCGAGUCCUGGAGAGGUACCUCUUGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAA  
UAUCACGACGGGCUUGCUGAACACUGCACUUGAUAUCACUUGCCAGACACCAAGUUAUUCUUAU  
GCCUGGAAGAGGAGGUGGUGGCGAGCAGGCCUAGAGUCCUGGCAGGGCCUGGGCCUUGUCCGGAAGCUGUCC  
UGCGGGCCAGGCCUUGUUGGUCACUCUCCAGCCUGGGAGCCUUGCAGCUCCAUUGGUAJAAAGCCUUCAG  
UGGCCUUCGCAGCCUACCCUUGCUUGGGUUGGGAGCCAGAAAGGAAGCCAUCCUCCAGUCCGAGUCCGCGCCU  
CAGCUGCUCCACUCCGAAACAUAUCACUGCUGACACUUCGCCAAACUCUCCGAGUCUACUCCAAUUCUCCCGGG  
AAAGCUGAAGCUGUACACAGGGGAGGCCUUGCAGGACAGGGGACAGAUGA (SEQ ID NO: 3)

**FIG. 3**





ARNm de alfa-1 antitripsina (A1AT) humana:

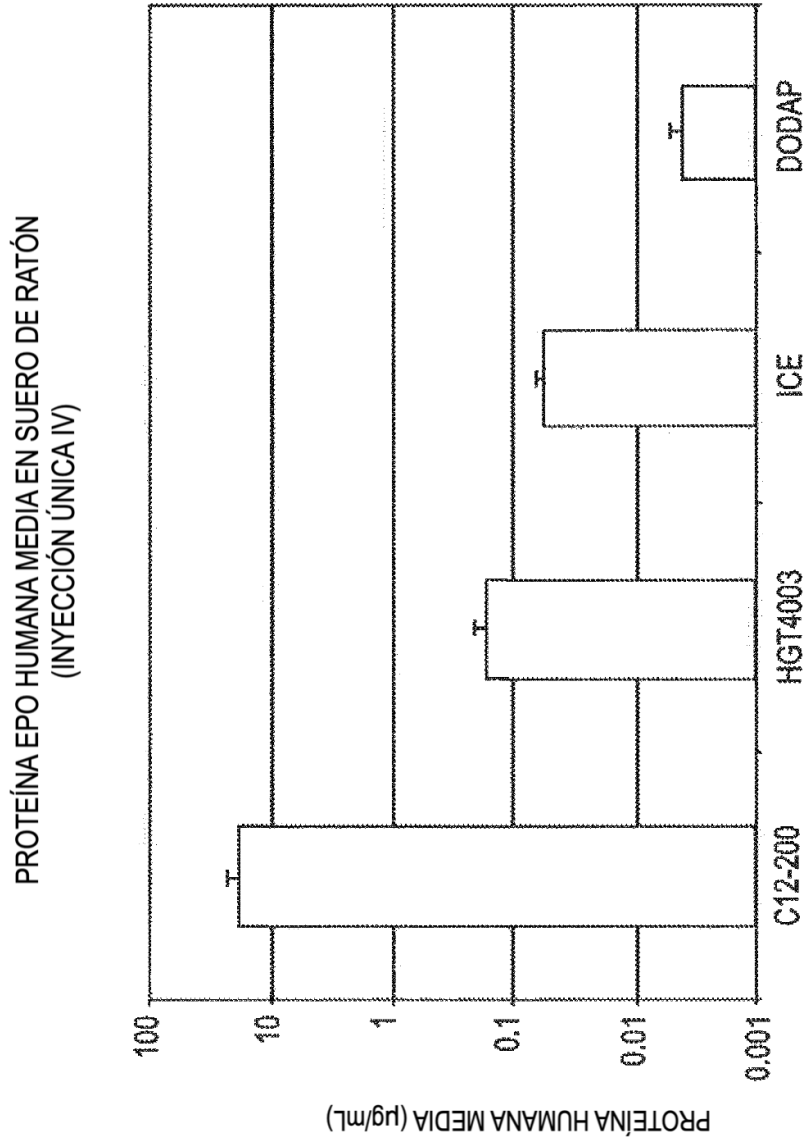
AUGCCGUCUUCUGUCUGGGGCAUCCUCCUGGCGGCGGCGUGGUCUCCUGGUCUCCUCCUGGCGGAGG  
 AUCCCCAGGGAGAUUCUGGCCAGAGACAGAUACAUCCACCAUGAUCAGGAUACCCACCUUCAACAAGAUAC  
 CCCCACCUGGCGAGUUCGCCUUCAGCCUAUACCCGAGCUGGCCACACAGUCCAACAGCACCAAUUUCUUCUUCU  
 CCCCAGUGAGCAUCGCUACAGCCUUGCAUUGCUUCCUCCUGGGGACCAAGGCUGACACUACCGAUGAAUCCUGGA  
 GGGCCUGAAUUUCAACCUJACGGAGAUJCCGGAGGUCAGAUCCAUGAAGGUUCCAGGACUCCUCCGUJACCCUC  
 AACAGCCAGACAGCCAGCUCAGCUGACCCAGGCAUUGGCCUUGUCCUACGGAGGGCCUGAAGCUJAGUGGAUA  
 AGUUUUUGGAGGAGUUUAAAAGUUUACCAUCAGAGCCUUCACUUGCAACUUCGGGACACCCGAAGAGGCCA  
 AGAAACAGAUCAACGALUACGUGGAGAAGGUJACUCAAGGGAALUUGUGAUUUGGUCAAGGAGCUUGACAGAG  
 ACAAGUUUUGUCUGGUAUUACAUCUUCUUAAAAGGCAAAUUGGAGAGACCCUUUGAAGUCAAAGGACACCG  
 AGGAGAGGACUCCACGUGGACCAAGGUGACCCAGGUGAGGUGCCUAUGAUGAAGCCUUUJAGGCAUGUUUAACA  
 UCCAGCACUGUAAGAAGCUGUCCAGCUGGUGUCUGAUGAAUACCCUGGCAUUGCCACCGCCAUUCUUCUUCU  
 GCCUGAUGAGGGGAACUACAGCACCUUGGAAAUUGAACUCACCCACCGAUUCAACCAAGUUCUCCUGGAAAUGAA  
 GACAGAAGGUCUGCCAGCUACAUAUACCCAAACUGUCCAUAUACUGGAAACCUAUGAUCUAGAGCGGUCUCCUGGUC  
 AACUGGGCAUACAUAGGUCUUCAGCAUUGGGGCUAGACCUCUCCGGGUCACAGAGGAGGCCACCCUJGAGCUCUC  
 CAAGGCCGUGCAUAGGCCUGUGCUGACCAUCGACGAGAAAGGACUJGAGCUGGGGCCAUUUUUUJAGAGGCC  
 AUACCCAUUGUCUAUCCCCCCGAGGUCAGUJUCAACAAACCCUUUGUCUUCUUAUUGAUUGAACAAAUAACCAAGU  
 CUCCCCUUCAUUGGGAAGAGUGGUAUCCCCACCCAAAUAUA (SEQ ID NO: 5)

**FIG. 5**

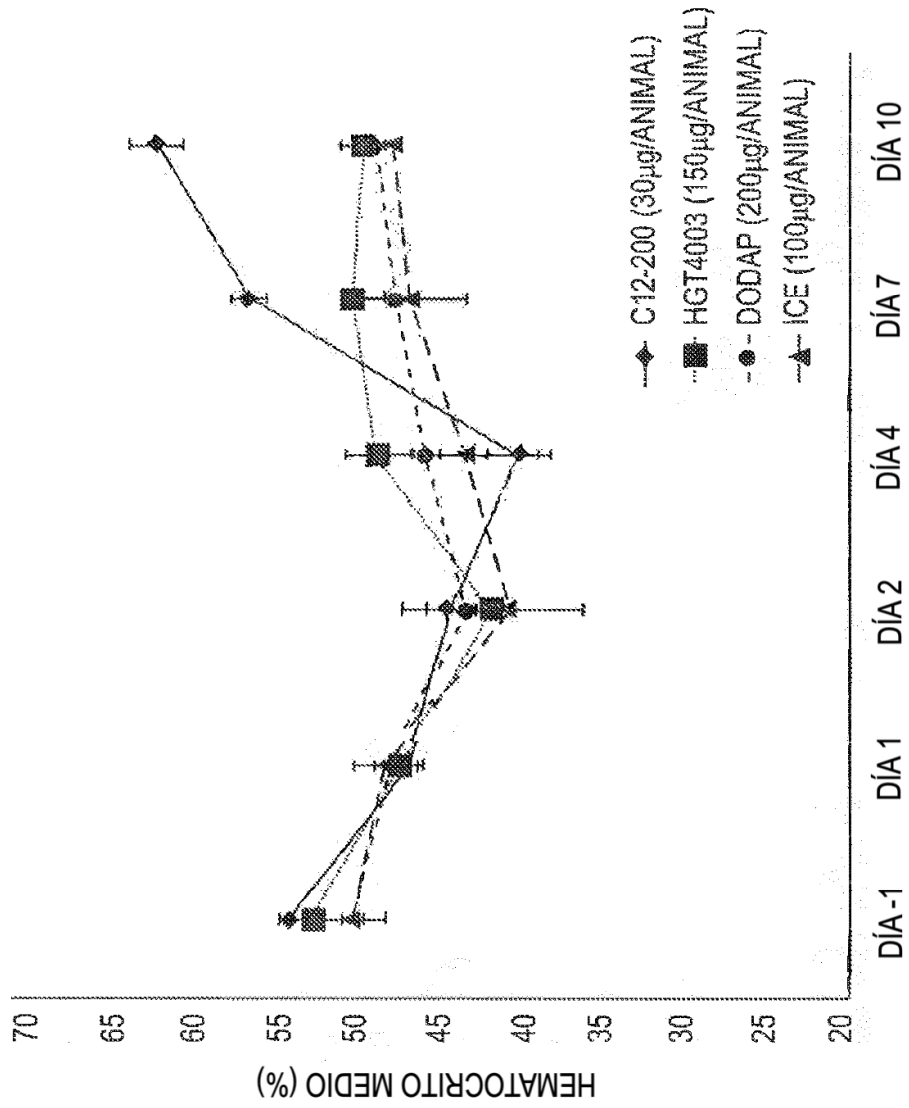
ARNm del Factor IX (FIX) humano:

AUGCAGCGCGUGAACAUAGAUCCAGGCUCAUCCAGGCUUUAAGGAUUCUACUCAGUG  
 CUGAAUGUACAGUUUUUCUUGAUCAUGAAACGCCAACAAAUCUGAGCGGAGAGGAGGUUAUAUUCAGGUA  
 AAUUGGAAGAGUUUGUUCAGGGAACCUUGAGAGAGAUUGGAAGAAAGUGUAGUUUGAAGAAGCACGAG  
 AAGUUUUGAAAACACUGAAAGAACACUGAUUUUGGAAGCAGUAUGUUGAUGGAGAUCAUGUGAGUCCAAUC  
 CAUGUUAAAUUGGCGGCAGUUGCAAGGAUGACAUAUUCUUAUGAUUGUUGGUCCUUGGGAUUUGAAGGAA  
 AGAACUGUGAAUUAGAUUGUACAUGUAACAUAAGAUGGCAGAUUGCGAGCUUUUGUAAAAUAUGUCUGAUA  
 ACAAGGUGUUUGCUCCUGUACUGAGGGAUUCGACUUGCAGAAAACCCAGAGUCCUGUGAACCCAGUGCCAUU  
 UCCAUGUGGAAGAUUCUGUUCACAAAACUUUAAGCUCACCCGUGGUGAGGCUUUUUUCCUGAUGUGGACUUAU  
 GUAAAUCUACUGAAGCUGAACCCAUUUUGGAUACAUCACUCAAAGCACCCAAUCAUUUAUUGACUUCACUCGGG  
 UUGUUGGUGGAGAGAUGCCAACCCAGGUCAUUCCCUUGGCAGGUUUUGAUGGUAAAAGUUGAUGCAUUCU  
 GUGGAGGCUCUAUCGUUAUGAAA AUGGAUUGUAACUGCUGCCCACTUGUUGAACUGGUUUA AAAUUACAG  
 UUGUCGCAAGGUAACUAUAUUGAGGAGACAGAACAUACAGAGCAAAGCGAAUUGUAUUCGAAUUAUUCUUC  
 ACCACAACUACA AUGCAGCUUAUAUAGUAACAACCAUGACA UUGCCUUCUGGAACUGGACGAAACCCU DAGUGCU  
 AAACAGCUAGUUACACCUAUUUUGCAUUGCUGACAAGGAUAACAGAACAUUCUCCUCAAUUUGGAUUCUGGCUAU  
 GUAAUGGCGGGAAGAGUCUCCACAAGGGAUUCAGCUUAAGUUCUUCAGUACCUUAGAGUUCACUUGU  
 GACCGAGCCACAUGUCUUCGAUCUACAAGUUCACCAUCUAUAACAACAUGUUCUGGCGUCCAUUGAAGGAG  
 GUAGAGAUUCAUGUCAAGGAGAUAGUGGGGACCCCAUGUUAUUAUGGAGUUGGAGGACCCAGUUUCUUAACUGGAA  
 UUAUUAGCUGGGUGAAGAGUGCAAUUGAAAGGCAAUAUGGAAUAUAUACCAAGGUAUCCCGGUAUGUCAACU  
 GGAAUAGGAAAACAAGCUCACUUA (SEQ ID NO: 6)

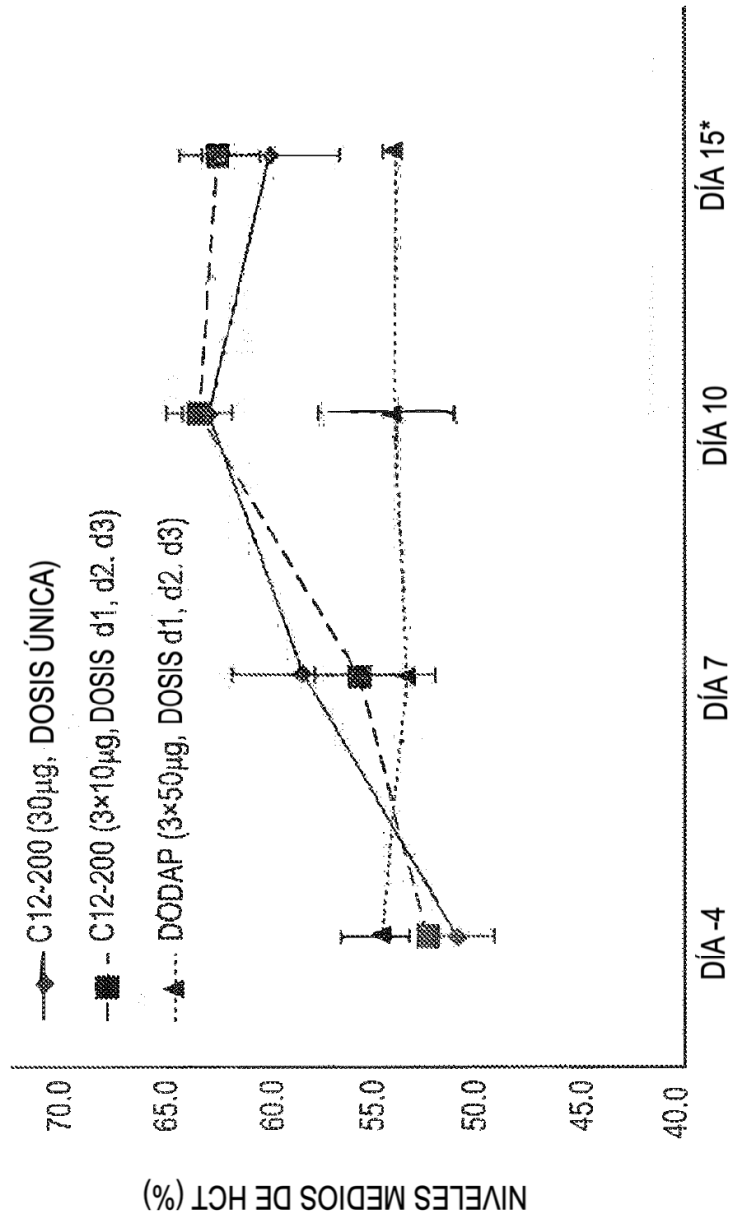
**FIG. 6**



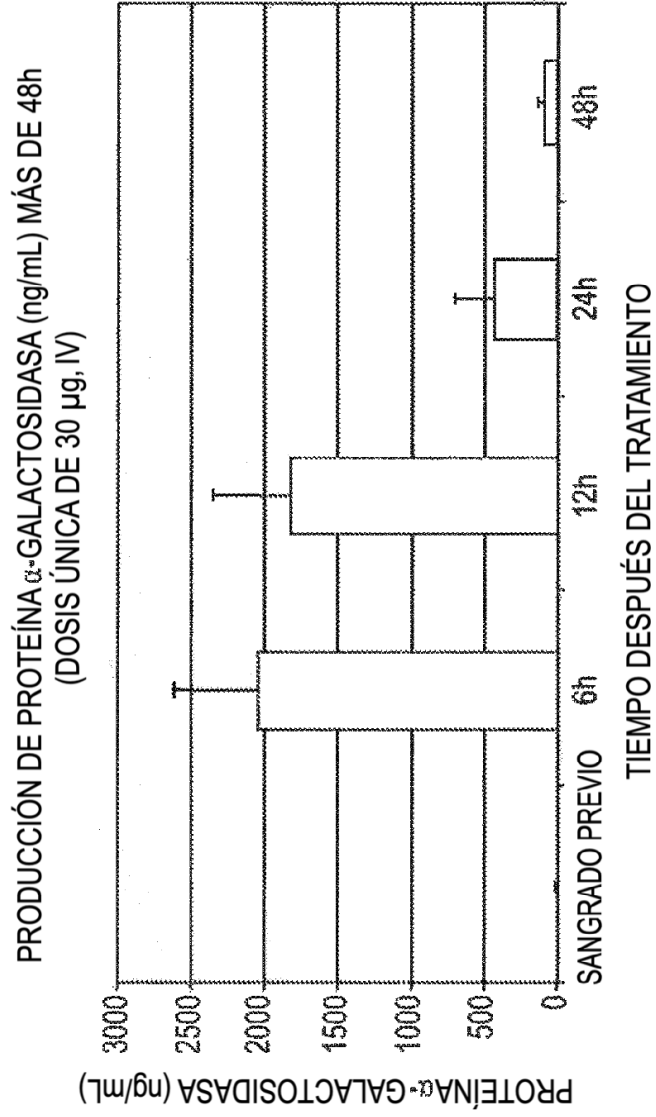
**FIG. 7**



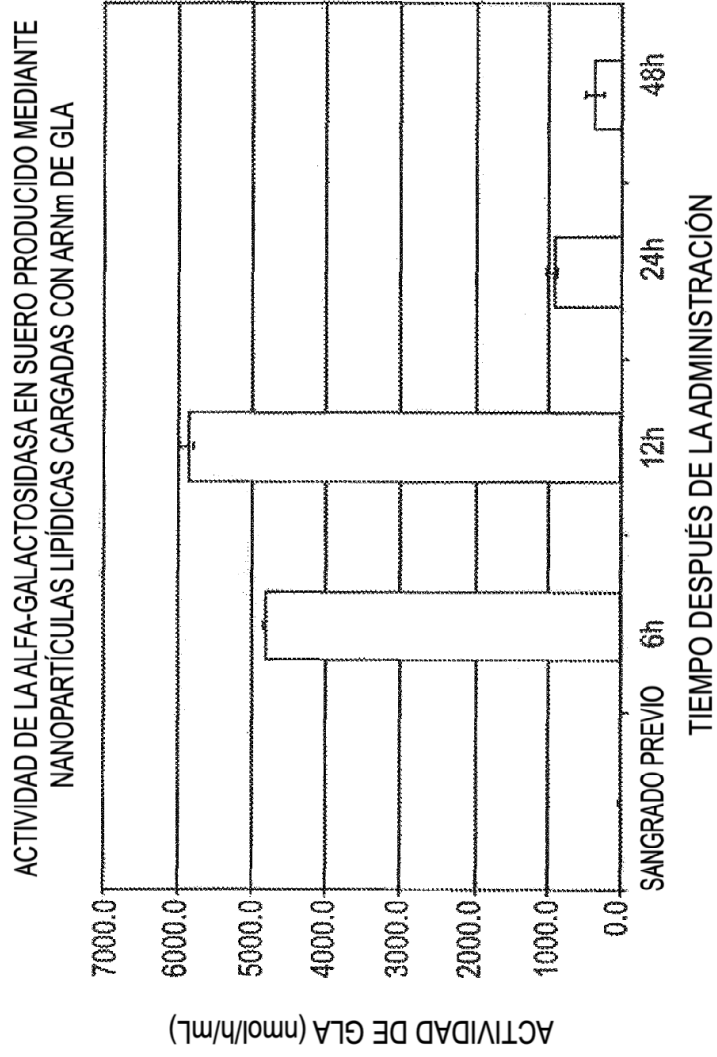
**FIG. 8**



**FIG. 9**

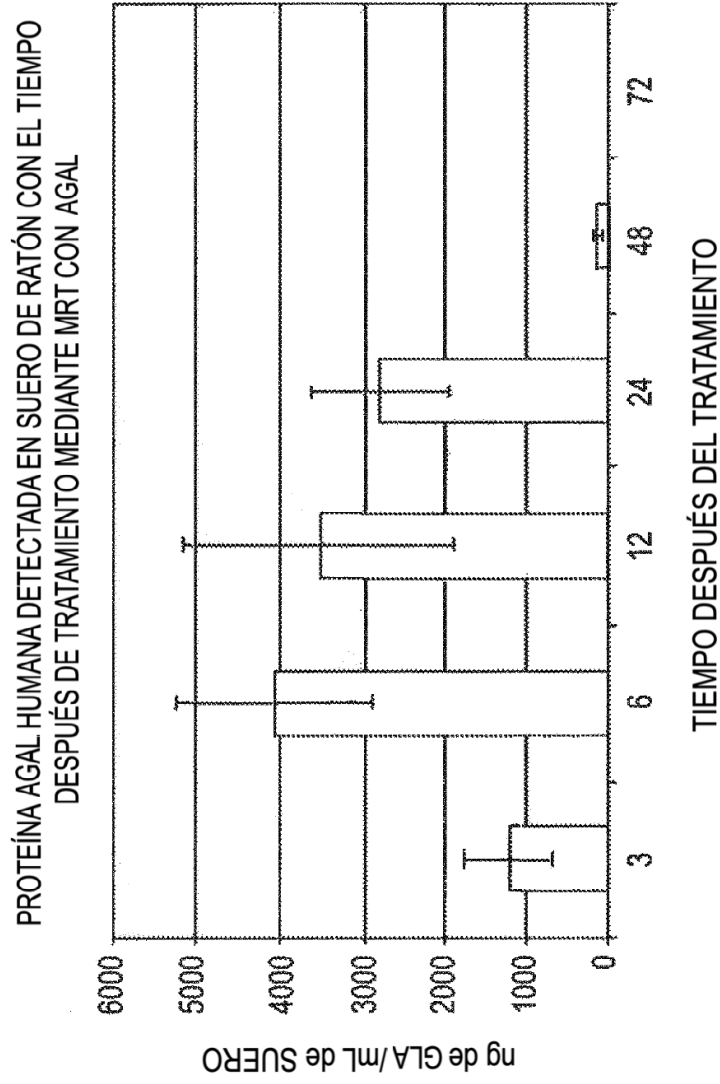


**FIG. 10**



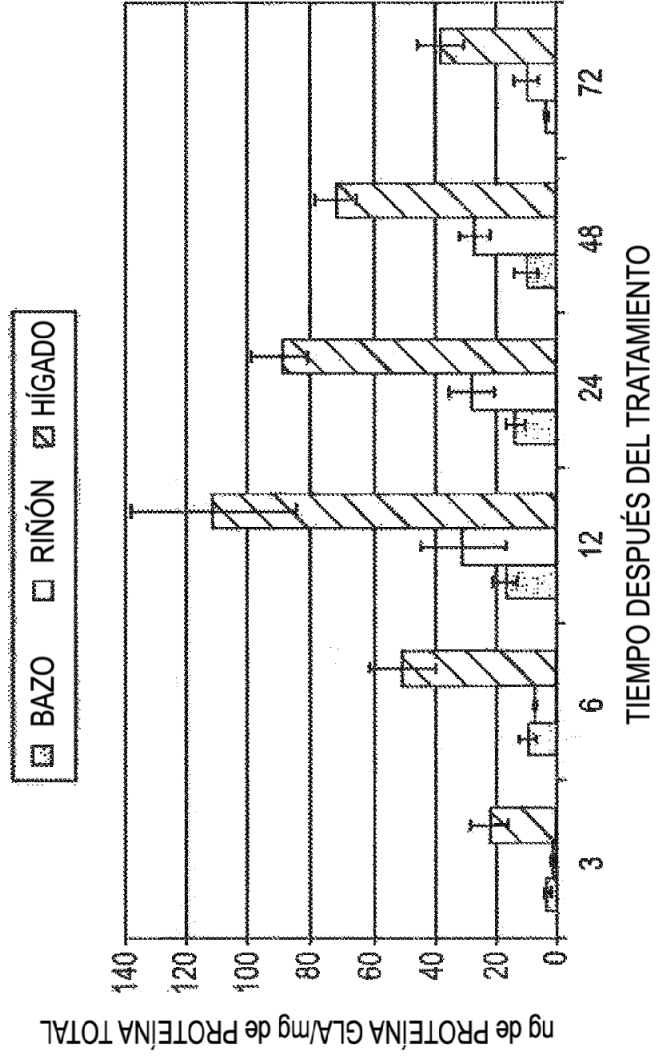
**FIG. 11**





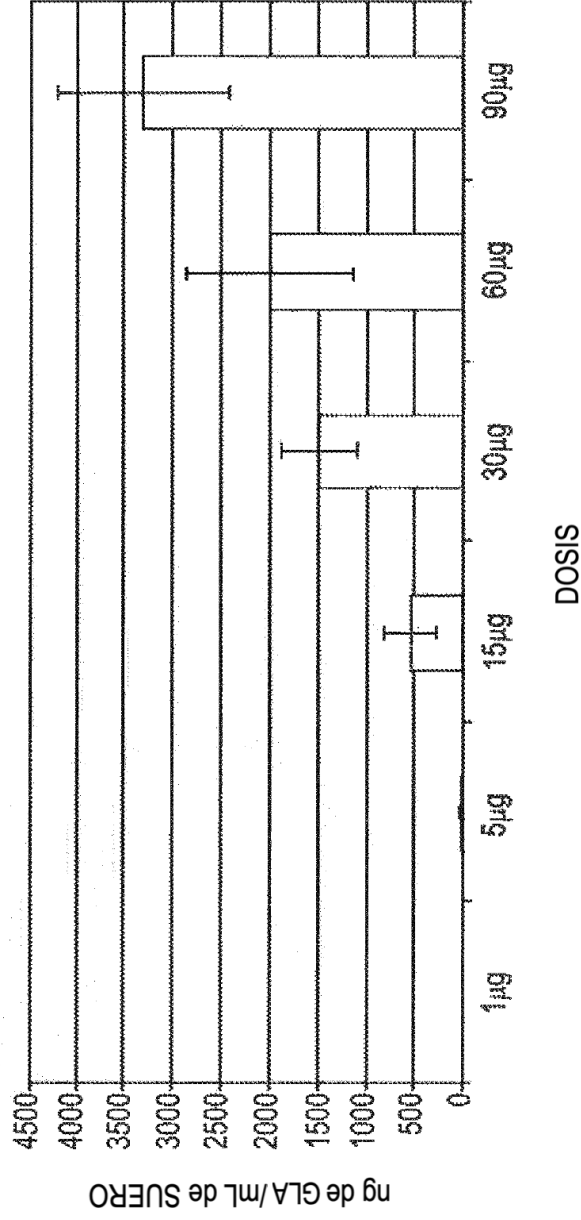
**FIG. 12**

DISTRIBUCIÓN EN EL TEJIDO DE AGAL EN RATONES DE TS CON EL TIEMPO  
DESPUÉS DE TRATAMIENTO MEDIANTE MRT CON AGAL



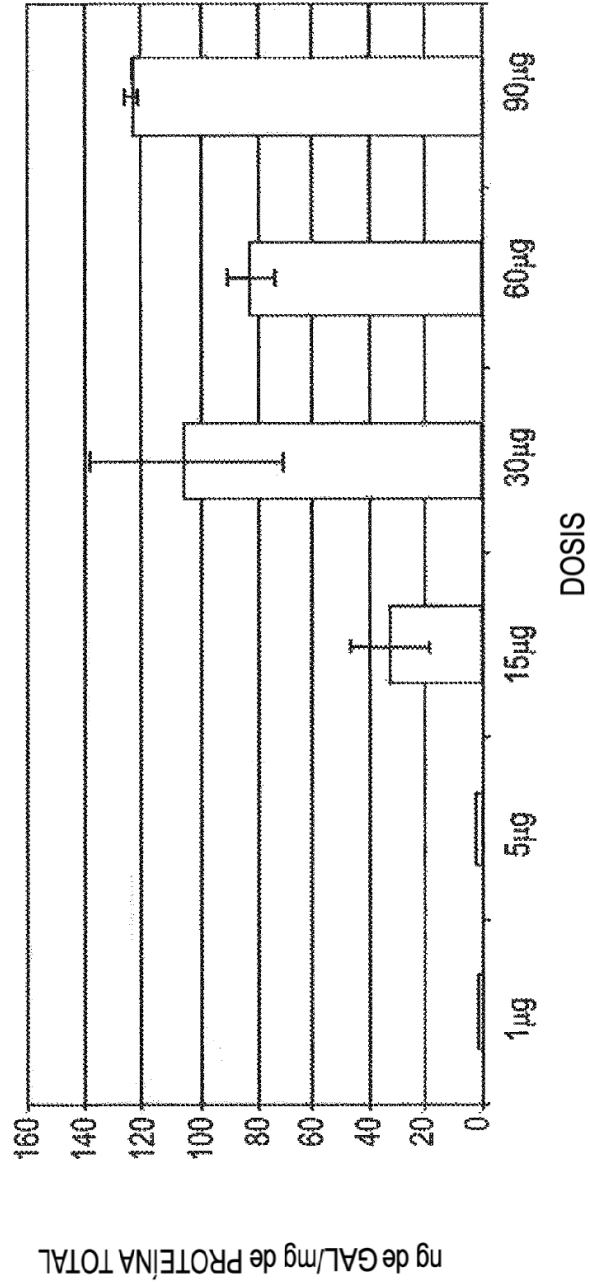
**FIG. 13**

EXPRESIÓN DE GLA 24 HORAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON C12-200 EN SUERO DE RATONES DE TS

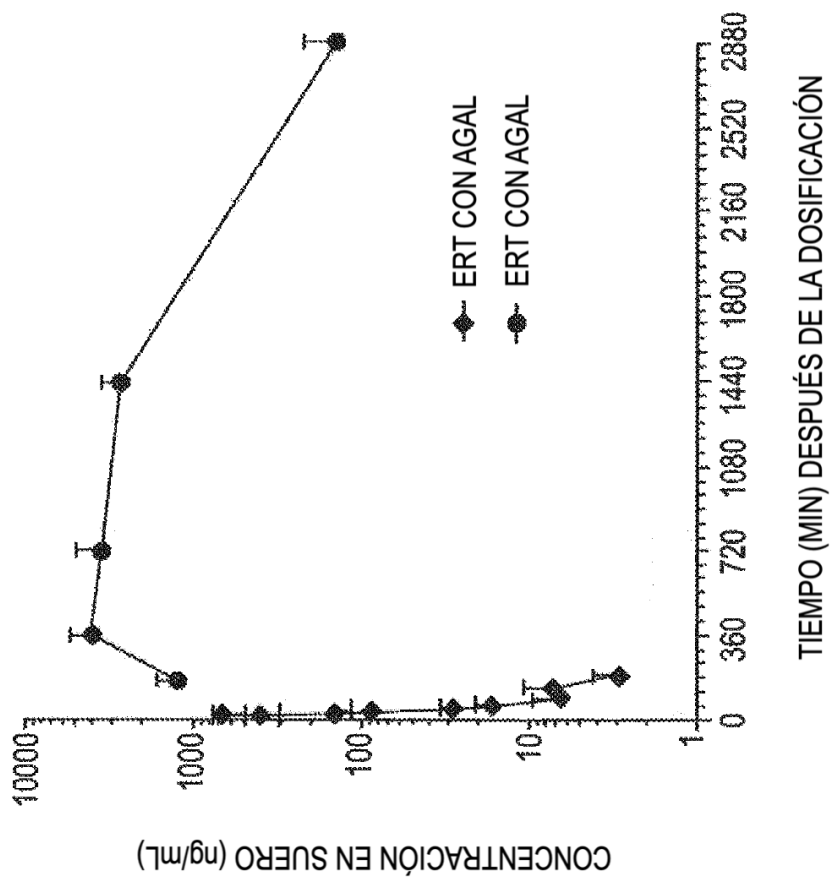


**FIG. 14A**

EXPRESIÓN DE GLA 24 h DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON C12-200 EN HÍGADO DE RATONES TS

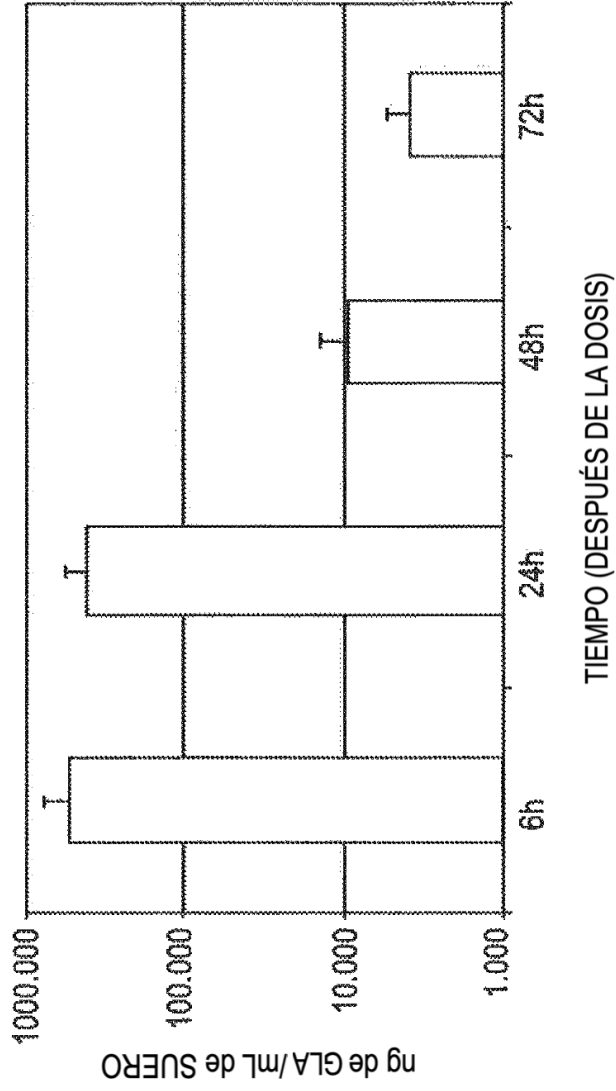


**FIG. 14B**

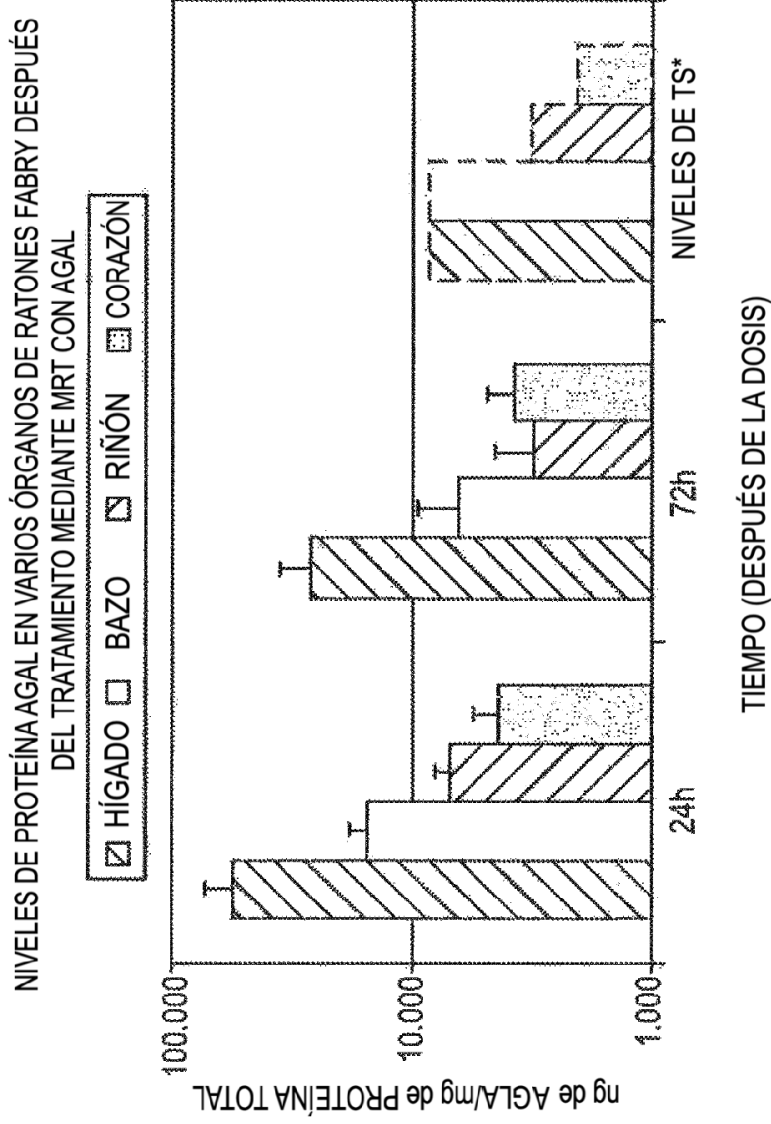


**FIG. 15**

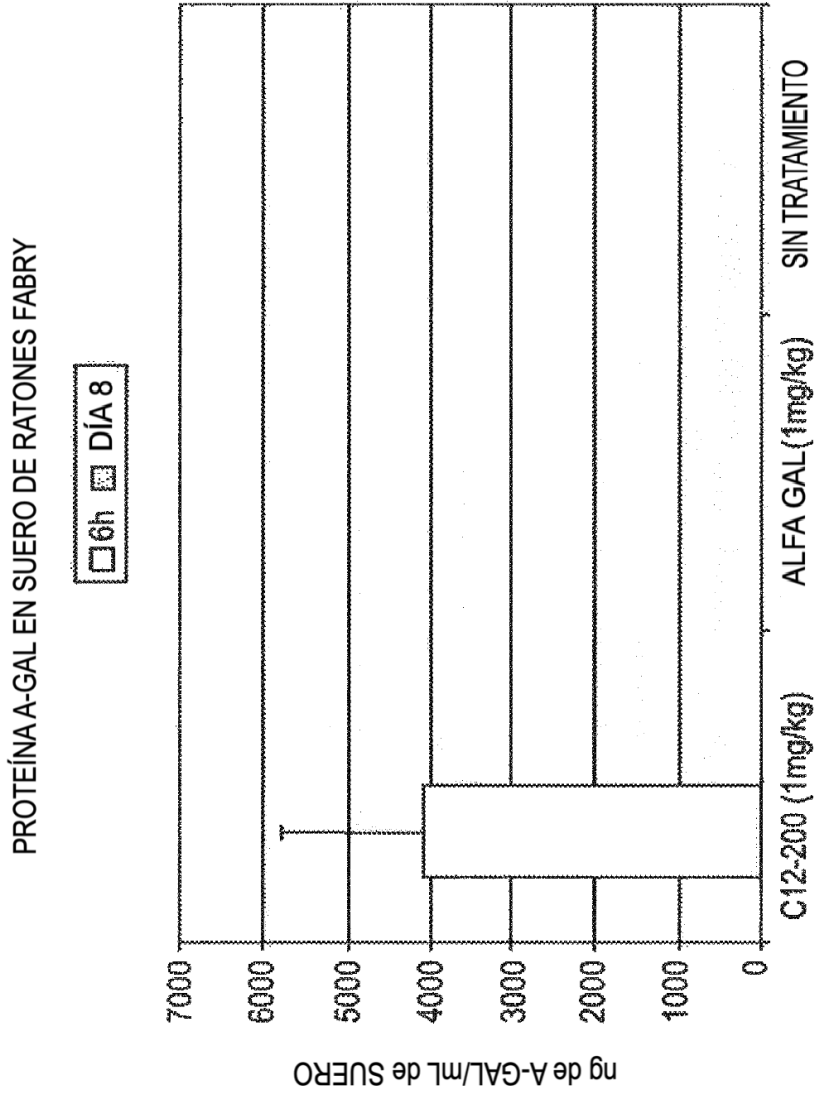
NIVELES DE PROTEÍNA AGAL EN SUERO DE RATONES FABRY DESPUÉS DE TRATAMIENTO MEDIANTE MRT CON AGAL



**FIG. 16**



**FIG. 17**



**FIG. 18**



PROTEÍNA-A-GAL EN TEJIDOS DE RATONES FABRY 8 DÍAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

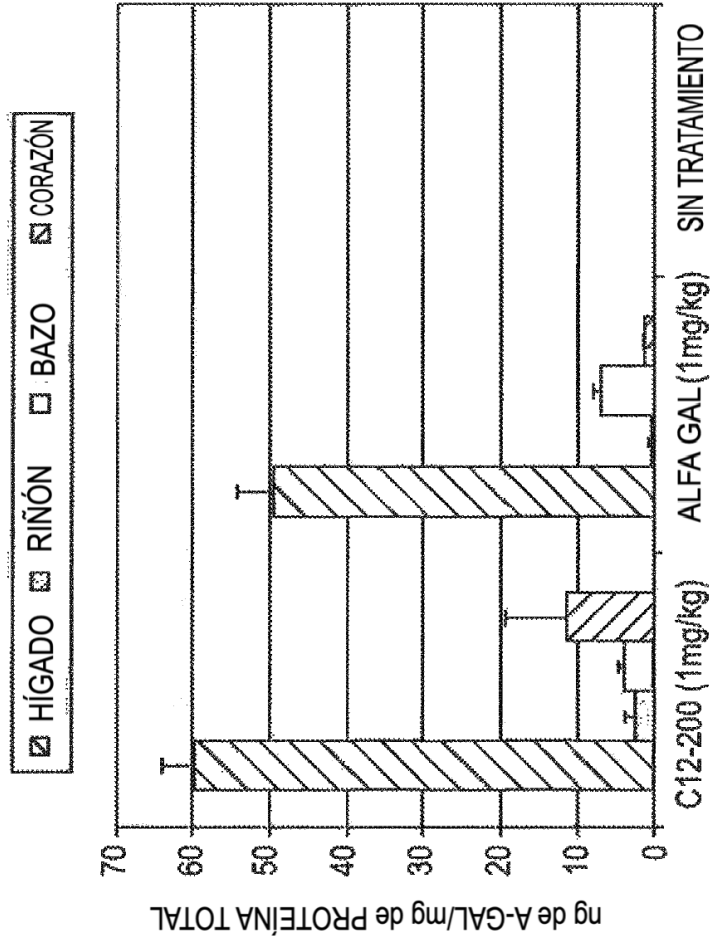
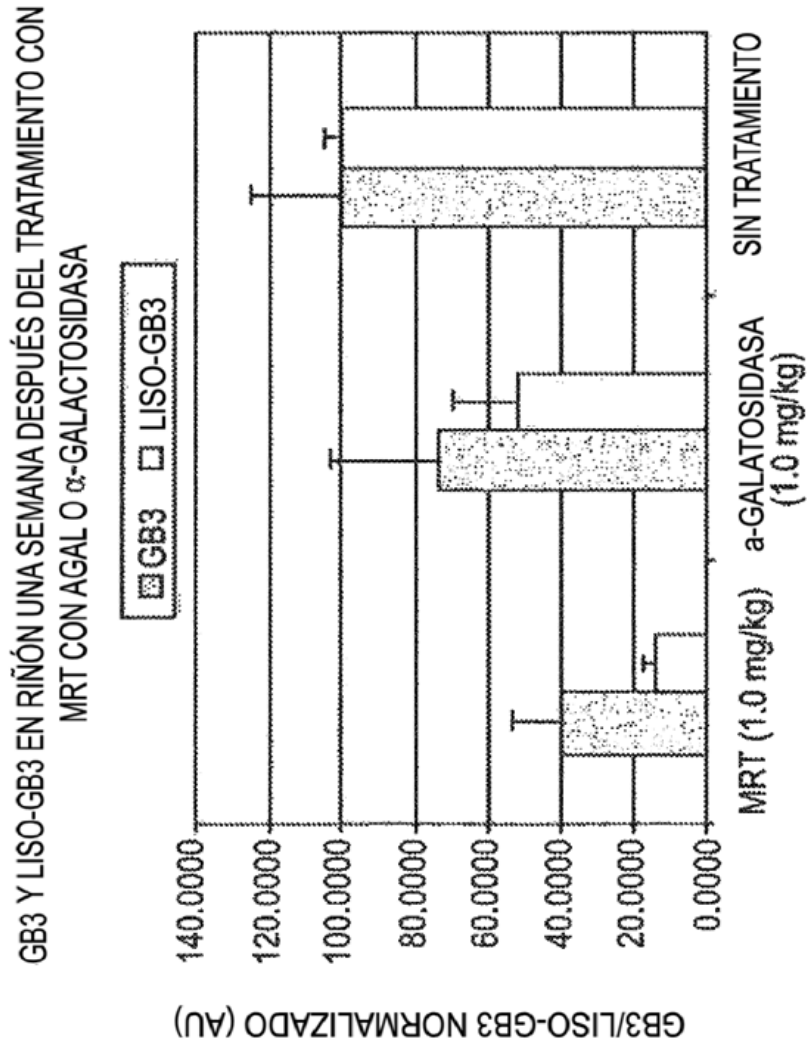
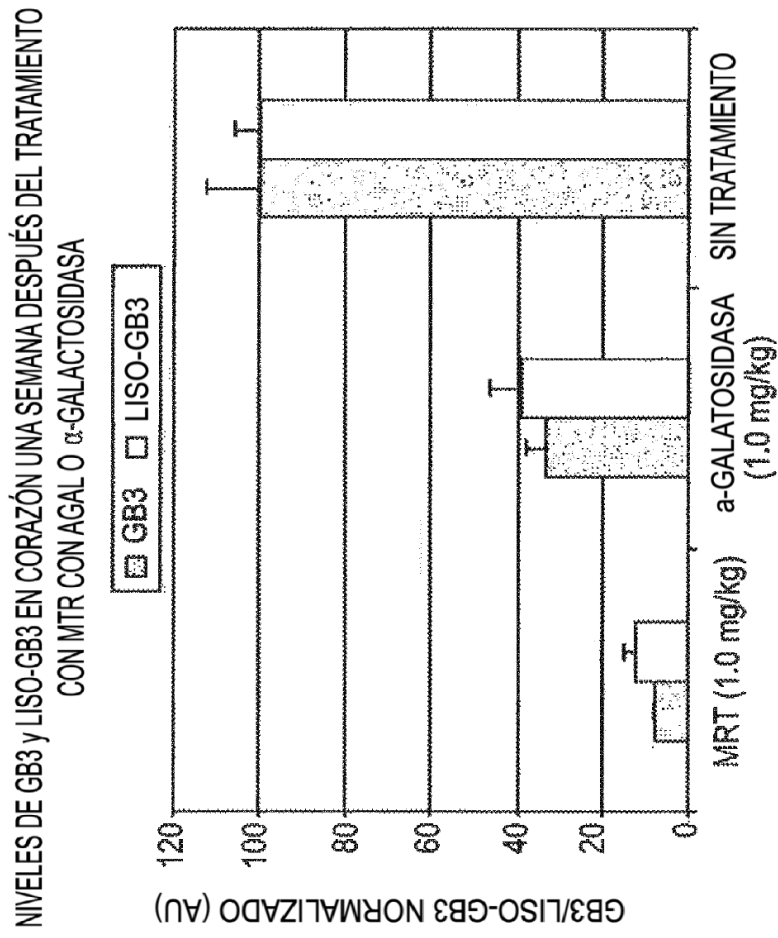


FIG. 19

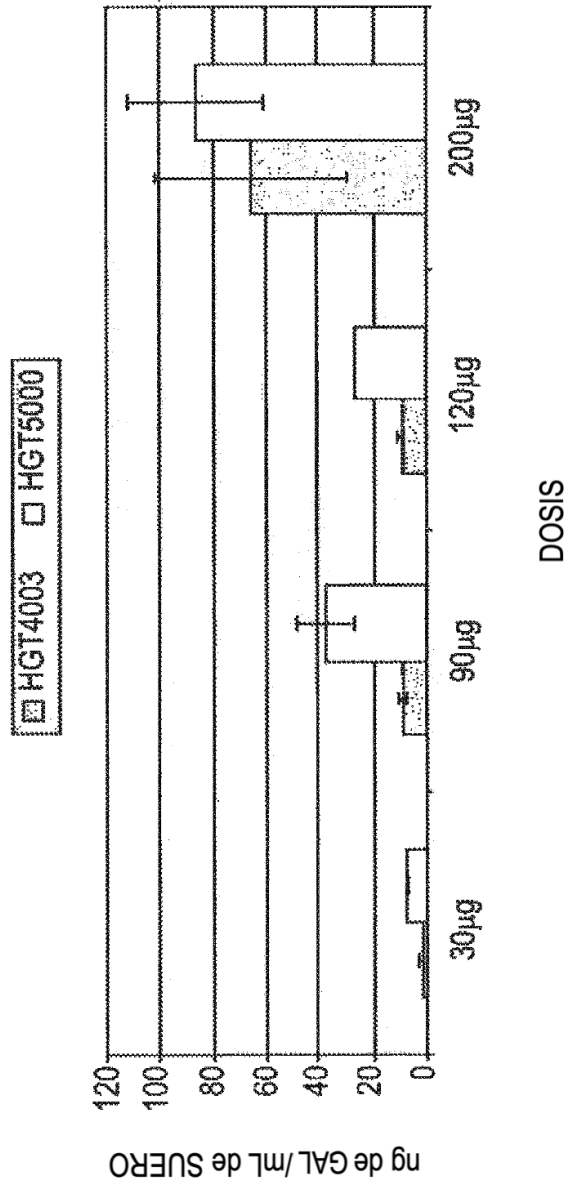


**FIG. 20**



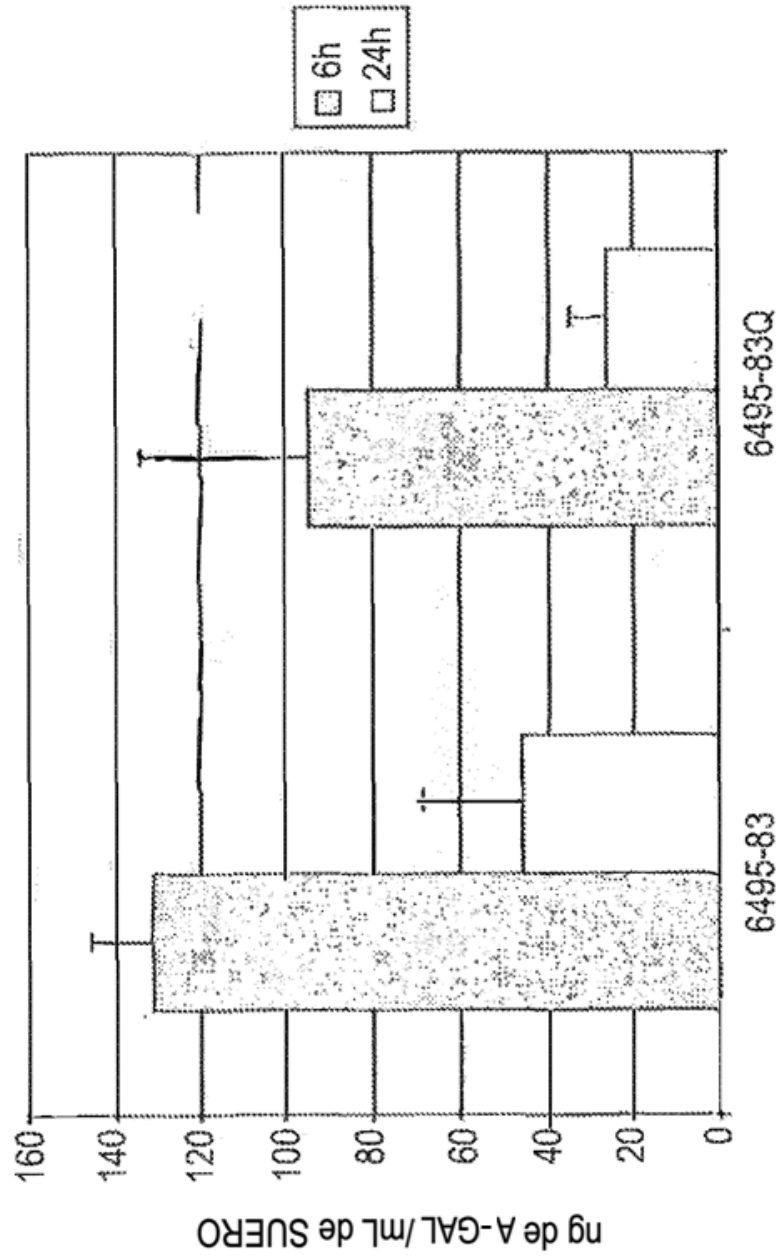
**FIG. 21**

EXPRESIÓN DE GLA 24 HORAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO EN SUERO DE RATONES DE TS



**FIG. 22**

PROTEÍNA GLA HUMANA DETECTADA EN SUERO DESPUÉS DE  
TRATAMIENTO MEDIANTE MRT CON GLA EN RATONES DE TS USANDO HGT5001



**FIG. 23A**

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA GLA HUMANA EN TEJIDO DE RATONES DE TS  
24 h DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DESPUÉS DEL TRATAMIENTO MEDIANTE  
MRT CON GLA USANDO HGT5001

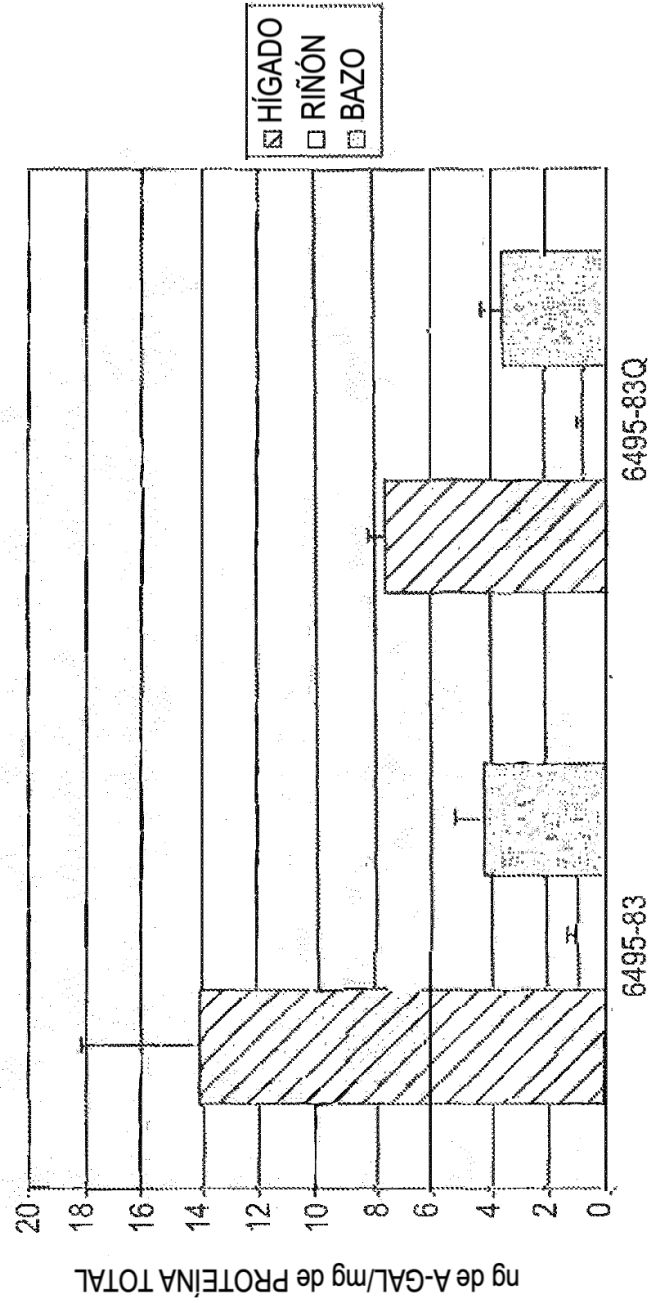
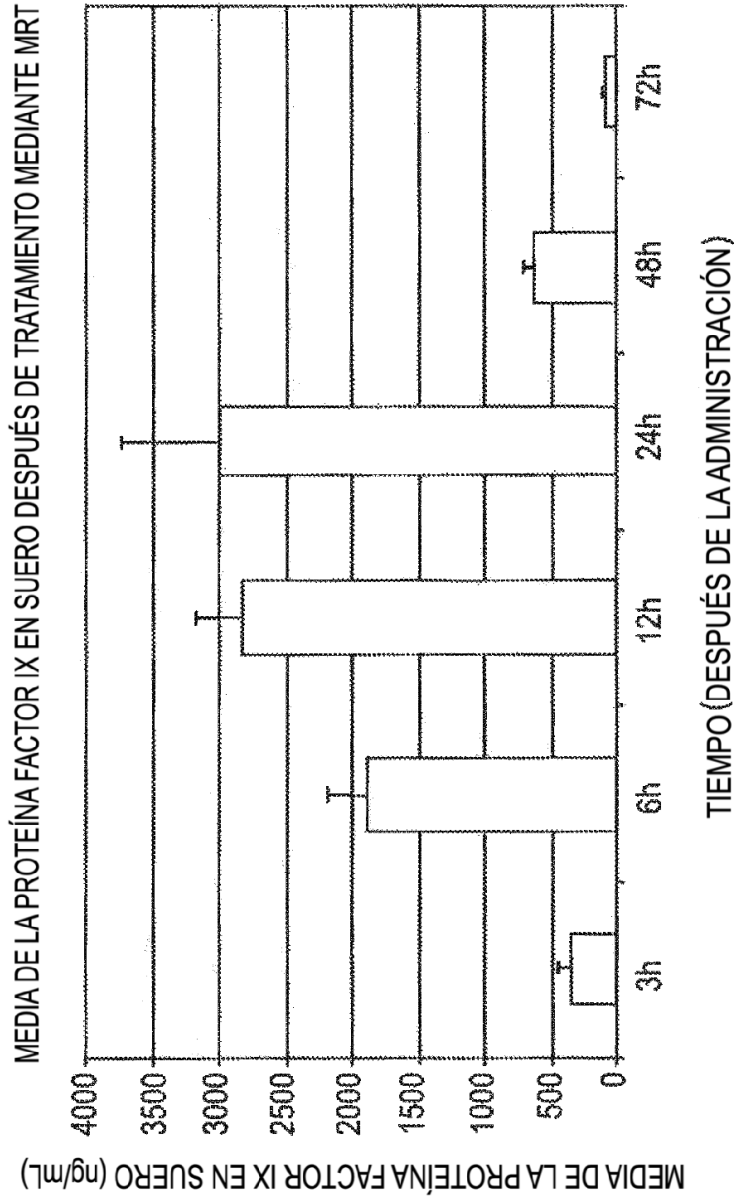
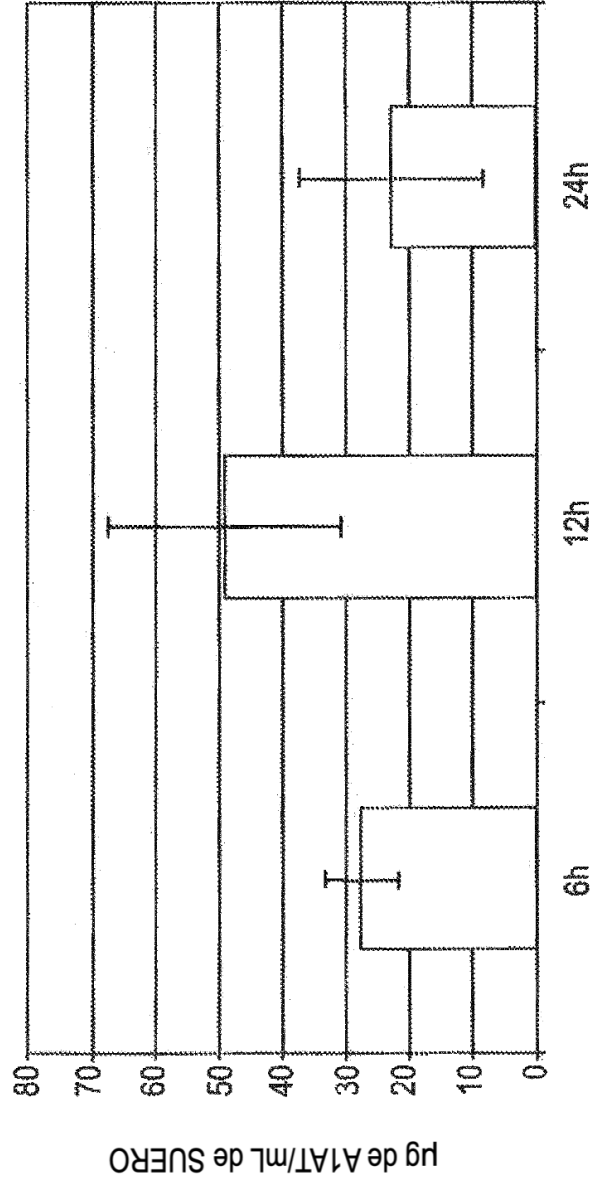


FIG. 23B



**FIG. 24**

NIVELES DE PROTEÍNA A1AT HUMANA EN SUERO DE RATONES DE TS DESPUÉS DE TRATAMIENTO MEDIANTE MRT



**FIG. 25**



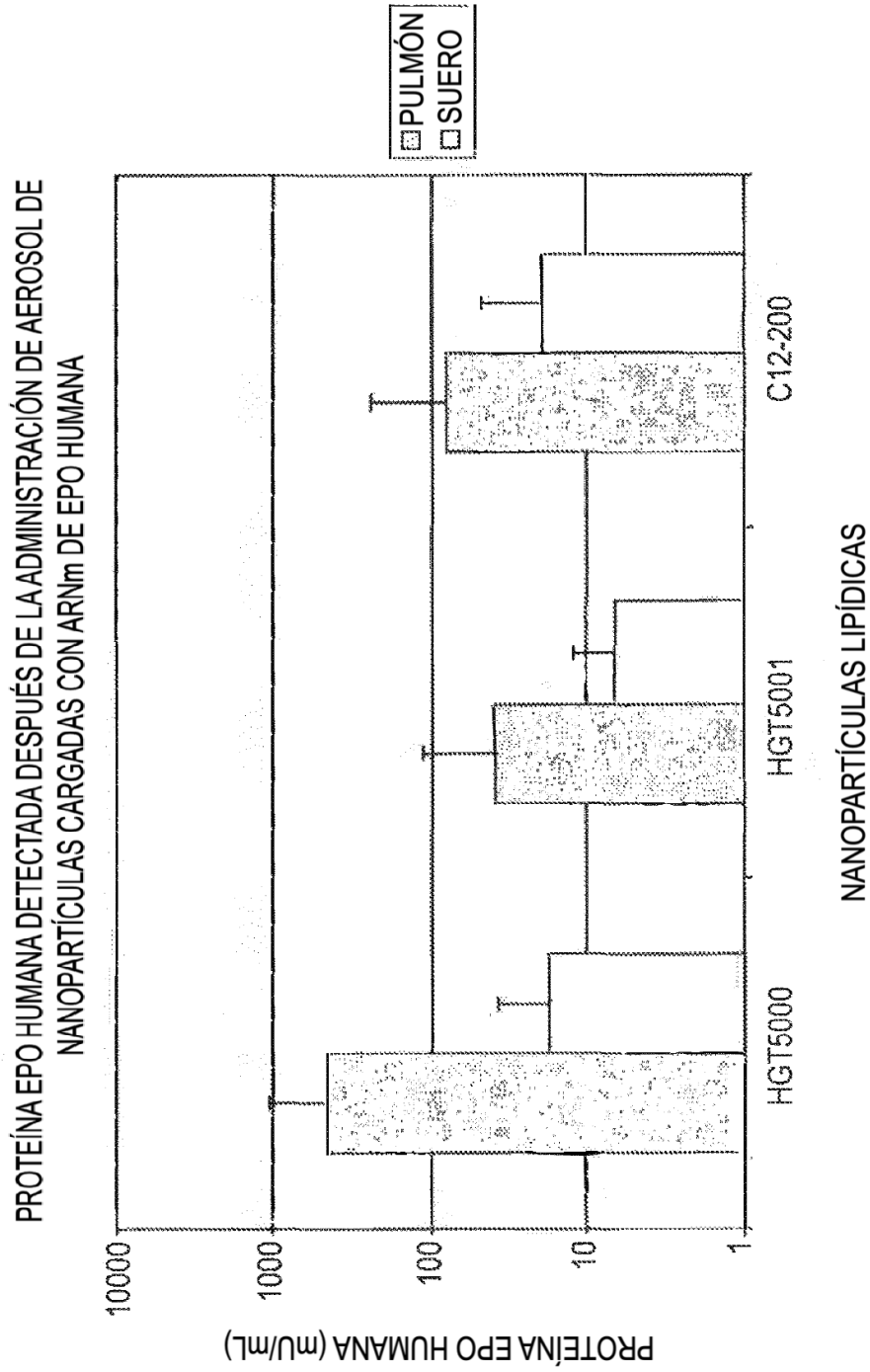


FIG. 26