

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 135**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 11/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2018** **PCT/US2018/033011**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2018** **WO18213476**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2018** **E 18730550 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2024** **EP 3624824**

54 Título: **ARNm de codones optimizados que codifica CFTR para su uso en el tratamiento de fibrosis quística**

30 Prioridad:

16.05.2017 US 201762507061 P

13.07.2017 US 201762532301 P

02.11.2017 US 201762580782 P

29.11.2017 US 201762592238 P

17.04.2018 US 201862659053 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2024

73 Titular/es:

TRANSLATE BIO, INC. (100.00%)

200 West Street

Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

HEARTLEIN, MICHAEL;

DEROSA, FRANK;

KIMURA, ALAN;

ABYSALH, JONATHAN;

DIAS, ANUSHA;

KARVE, SHRIRANG y

PATEL, ZARNA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 993 135 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

ARNm de codones optimizados que codifica CFTR para su uso en el tratamiento de fibrosis quística

5 Antecedentes

La fibrosis quística es un trastorno hereditario autosómico provocado por mutación del gen de CFTR, que codifica un canal de iones cloruro que se cree que está implicado en la regulación de muchos otros canales de iones y sistemas de transporte en las células epiteliales. La pérdida de función de CFTR provoca enfermedad pulmonar crónica, producción aberrante de moco y esperanza de vida drásticamente reducida. Véase, en general, Rowe *et al.* New Engl. J. Med. 352, 1992-2001 (2005).

Actualmente, no hay cura para la fibrosis quística (CF). La bibliografía ha documentado numerosas dificultades encontradas en el intento por inducir la expresión de CFTR en el pulmón. Por ejemplo, los vectores víricos que comprenden ADN de CFTR desencadenaban respuestas inmunitarias y los síntomas de CF persistían después de la administración. Conese *et al.*, J. Cyst. Fibros. 10 Supl. 2, S114-28 (2011); Rosenecker *et al.*, Curr. Opin. Mol. Ther. 8, 439-45 (2006). Se ha informado de que la administración no vírica de ADN, incluyendo ADN de CFTR, desencadena respuestas inmunitarias. Alton *et al.*, Lancet 353, 947-54 (1999); Rosenecker *et al.*, J Gene Med. 5, 49-60 (2003). Además, los vectores no víricos de ADN encuentran el problema adicional de que la maquinaria del complejo de poro nuclear no importa normalmente ADN al núcleo, donde se produciría la transcripción. Pearson, Nature 460, 164-69 (2009). El documento US 2015/038556 A1 describe materiales, formulaciones, métodos de producción y métodos para la administración de ARNm de CFTR para la inducción de la expresión de CFTR, incluyendo en el pulmón de mamífero. El documento WO 2008/045548 A2 describe una secuencia sintética de ADN de hCFTR que se ha desarrollado que produce ARNm y proteína de hCFTR en pulmones murinos y células humanas en cultivo dosificados. Ruiz *et al.* (2001) describe un síndrome inflamatorio clínico atribuible a la administración aerosolizada de lípido-ADN en fibrosis quística. El documento WO 2018/089790 describe composiciones y métodos de formulación de nanopartículas que contienen ácido nucleico, que comprende no más de tres componentes lipídicos distintos.

30 Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones.

La presente invención proporciona una composición que comprende un ARNm de codones optimizados para su expresión en células humanas, que codifica una proteína de regulador de la conductancia transmembranaria en fibrosis quística (CFTR) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde el ARNm que codifica la proteína CFTR comprende una secuencia polinucleotídica al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 1, y en donde el ARNm está a una concentración de al menos 0,4 mg/ml, y en donde la composición comprende además un diluyente seleccionado del grupo que consiste en DMSO, etilenglicol, glicerol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), propilenglicol, sacarosa y trehalosa, en donde dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de fibrosis quística (CF) en un sujeto, y la etapa de administración de la composición al sujeto comprende inhalación.

En algunas realizaciones, el ARNm que codifica CFTR está a una concentración de al menos 0,5 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica CFTR está a una concentración de al menos 0,6 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica CFTR está a una concentración que varía de 0,4 mg/ml a 0,8 mg/ml. En algunas realizaciones, la dosis es de 24 mg o menos a la semana, de ARNm que codifica CFTR. En algunas realizaciones, la dosis es de 16 mg o menos a la semana, de ARNm que codifica CFTR. En algunas realizaciones, la dosis es de 8 mg o menos a la semana, de ARNm que codifica CFTR.

El ARNm que codifica la proteína CFTR comprende una secuencia polinucleotídica al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica la proteína CFTR comprende una secuencia polinucleotídica al menos un 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica la proteína CFTR comprende una secuencia polinucleotídica al menos un 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica la proteína CFTR comprende una secuencia polinucleotídica idéntica a SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la composición se almacena como una suspensión estéril congelada antes de la administración. En algunas realizaciones, la composición se almacena en un vial de un solo uso antes de la administración. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende menos de 5,0 ml de la composición. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica la proteína CFTR está a una dosificación que varía de 8 mg a 24 mg.

En algunas realizaciones, el ARNm que codifica la proteína CFTR comprende además una secuencia de región no traducida (UTR) 5' de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica la proteína CFTR comprende además una secuencia de región no traducida (UTR) 3' de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, el ARNm que codifica la proteína CFTR se encapsula dentro de una nanopartícula. En

algunas realizaciones, la nanopartícula es un liposoma. En algunas realizaciones, el liposoma comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, y uno o más lípidos modificados con PEG. En algunas realizaciones, el liposoma comprende no más de tres componentes lipídicos distintos. En algunas realizaciones, un componente lipídico distinto es un lípido catiónico a base de esterol. En algunas realizaciones, el liposoma tiene un tamaño menor de aproximadamente 100 nm. En algunas realizaciones, el liposoma tiene un tamaño que varía de 40 nm a 60 nm. En algunas realizaciones, los no más de tres componentes lipídicos distintos son un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido modificado con PEG. En algunas realizaciones, el liposoma comprende éster de imidazol colesterol (ICE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y 1,2-dimiristoil-sn-glicerol, metoxipoli-etilenglicol (DMG-PEG-2K). En algunas realizaciones, ICE y DOPE están presentes a una relación molar de >1:1. En algunas realizaciones, ICE y DMG-PEG-2K están presentes a una relación molar de >10:1. En algunas realizaciones, DOPE y DMG-PEG-2K están presentes a una relación molar de >5:1.

En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende entre 3,0 y 4,0 ml de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende entre 3,2 ml de la composición.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos son con propósitos de ilustración solamente, no para limitación.

La figura 1 representa la estructura general de la composición que comprende un ARNm que codifica una proteína CFTR y un proceso de formulación simplificado.

La figura 2 representa un gráfico ejemplar del número de copias de ARNm/g en tejido pulmonar de rata después de tratar las ratas con liposomas cargados con ARNm de hCFTR.

La figura 3 representa un gráfico ejemplar del número de copias de ARNm en tejido pulmonar de primate (NHP) después de tratar los NHP con liposomas cargados con ARNm de hCFTR.

La figura 4 representa un gráfico ejemplar que muestra la actividad aumentada del canal de cloruro demostrada después de la transfección con liposomas cargados con ARNm de hCFTR.

La figura 5 representa IHC ejemplar de la proteína hCFTR en tejido pulmonar de un primate después de una sola dosis de una composición que comprende un ARNm que codifica una proteína CFTR.

La figura 6 representa un gráfico ejemplar del aumento factorial de copias de CO-ARNm de hCFTR sobre los niveles endógenos de ARNm de CFTR en tejido pulmonar de primate después de una sola dosis de una composición que comprende un ARNm que codifica una proteína CFTR.

La figura 7 representa un gráfico ejemplar del porcentaje de CO-ARNm de hCFTR administrado a tejido pulmonar de primate en comparación con tejido de las vías respiratorias después de una sola dosis de una composición que comprende un ARNm de codifica una proteína CFTR.

La figura 8A-C representa la expresión de proteína derivada de ARNm de CFTR en células epiteliales bronquiales altas de primate colocalizada con proteína endógena de unión ocluyente de membrana, ZO1 (que está presente en la membrana celular), después de tratamiento con ARNm de CFTR nebulizado encapsulado en una nanopartícula lipídica, administrado por inhalación. La figura 8A representa imágenes microscópicas de inmunotinción de células epiteliales bronquiales altas de un primate tratado con tampón (10 % de trehalosa) como control; que muestran la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm (izquierda), tinción de proteína ZO1 endógena (centro) y combinación óptica de la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm y tinción de proteína ZO1 endógena (derecha), sin proteína CFTR derivada de ARNm visible presente en las membranas celulares de células epiteliales bronquiales altas. La figura 8B representa imágenes microscópicas de inmunotinción de células epiteliales bronquiales altas de un primate tratado con ARNm de CFTR nebulizado (500 µg/kg); que muestran tinción de proteína CFTR derivada de ARNm (izquierda), tinción de proteína ZO1 endógena (centro) y combinación óptica de la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm y tinción de proteína ZO1 endógena (derecha), con proteína CFTR derivada de ARNm presente en las membranas celulares de células epiteliales bronquiales altas. La figura 8C representa imágenes microscópicas de inmunotinción representativas de células epiteliales bronquiales altas de un primate tratado con ARNm de CFTR nebulizado (1000 µg/kg); que muestran la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm (izquierda), tinción de proteína ZO1 endógena (centro) y combinación óptica de la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm y tinción de proteína ZO1 endógena (derecha) con proteína CFTR derivada de ARNm presente en las membranas celulares de células epiteliales bronquiales altas.

La figura 9A-C representa la expresión de proteína derivada de ARNm de CFTR en células epiteliales de las vías respiratorias bajas de primate colocalizada con proteína endógena de unión ocluyente de membrana, ZO1 (que está presente en la membrana celular), después de tratamiento con ARNm de CFTR nebulizado encapsulado en una nanopartícula lipídica, administrado por inhalación. La figura 9A representa imágenes microscópicas de inmunotinción de células epiteliales de las vías respiratorias bajas de un primate tratado con tampón (10 % de

trehalosa) como control; que muestran la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm (izquierda), tinción de proteína ZO1 endógena (centro) y combinación óptica de tinción de la proteína CFTR derivada de ARNm y proteína ZO1 endógena (derecha), sin proteína CFTR derivada de ARNm visible presente en las membranas celulares de células epiteliales bronquiales bajas. La figura 9B representa imágenes microscópicas de inmunotinción de células epiteliales de las vías respiratorias bajas de un primate tratado con ARNm de CFTR nebulizado (500 µg/kg); que muestran tinción de proteína CFTR derivada de ARNm (izquierda), tinción de proteína ZO1 endógena (centro) y combinación óptica de la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm y tinción de proteína ZO1 endógena (derecha), con proteína CFTR derivada de ARNm presente en las membranas celulares de células epiteliales bronquiales bajas. La figura 9C representa imágenes microscópicas de inmunotinción representativas de células epiteliales de las vías respiratorias bajas de un primate tratado con ARNm de CFTR nebulizado (1000 µg/kg); que muestran la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm (izquierda), tinción de proteína ZO1 endógena (centro) y combinación óptica de la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm y tinción de proteína ZO1 endógena (derecha), con proteína CFTR derivada de ARNm presente en las membranas celulares de células epiteliales bronquiales bajas.

La figura 10A-C representa la expresión de proteína derivada de ARNm de CFTR en células de la región alveolar de un pulmón de primate colocada con proteína endógena de unión ocluyente de membrana, ZO1 (que está presente en la membrana celular), después de tratamiento con ARNm de CFTR nebulizado encapsulado en una nanopartícula lipídica, administrado por inhalación. La figura 10A representa imágenes microscópicas de inmunotinción de un primate tratado con tampón (10 % de trehalosa) como control; que muestran la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm (izquierda), tinción de proteína ZO1 endógena (centro) y combinación óptica de la tinción de la proteína CFTR derivada de ARNm y proteína ZO1 endógena (derecha), sin proteína CFTR derivada de ARNm presente en las membranas celulares de células alveolares. La figura 10B representa imágenes microscópicas de inmunotinción de un primate tratado con ARNm de CFTR nebulizado (500 µg/kg); que muestran la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm (izquierda), tinción de proteína ZO1 endógena (centro) y combinación óptica de tinción de la proteína CFTR derivada de ARNm y proteína ZO1 endógena (derecha), con proteína CFTR derivada de ARNm presente en las membranas celulares de células alveolares. La figura 10C muestra imágenes microscópicas de inmunotinción representativas de un primate tratado con ARNm de CFTR nebulizado (1000 µg/kg); que muestran la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm (izquierda), tinción de proteína ZO1 endógena (centro) y combinación óptica de la tinción de proteína CFTR derivada de ARNm y tinción de proteína ZO1 endógena (derecha), con proteína CFTR derivada de ARNm presente en las membranas celulares de células alveolares.

Definiciones

Para que la presente invención se entienda más fácilmente, en primer lugar, se definen a continuación determinados términos. Definiciones adicionales para los siguientes términos y otros términos se exponen por toda la memoria descriptiva.

Aproximadamente: Como se usa en este documento, el término "aproximadamente", aplicado a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. El término "aproximadamente" puede referirse a un intervalo de valores que están dentro de un 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección de (mayor de o menor de) el valor de referencia indicado a menos que se indique otra cosa o sea evidente de otra manera por el contexto (excepto cuando dicho número excedería un 100 % de un valor posible).

Administración: Como se usa en este documento, el término "administración" abarca tanto administración local como sistémica. Por ejemplo, la administración de ARNm abarca situaciones en que un ARNm se administra a un tejido diana y la proteína codificada se expresa y retiene dentro del tejido diana (también denominada "distribución local" o "administración local"), y situaciones en que un ARNm se administra a un tejido diana y la proteína codificada se expresa y secreta al sistema de circulación del paciente (por ejemplo, suero) y se distribuye sistémicamente y se capta por otros tejidos (también denominada "distribución sistémica" o "administración sistémica"). En algunas realizaciones, la administración es administración pulmonar, por ejemplo, que comprende nebulización.

Encapsulación: Como se usa en este documento, el término "encapsulación" o un equivalente gramatical, se refiere al proceso de confinar una molécula de ARNm dentro de una nanopartícula.

Expresión: Como se usa en este documento, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a la traducción de un ARNm en un polipéptido, el ensamblaje de múltiples polipéptidos (por ejemplo, cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo) en una proteína intacta (por ejemplo, anticuerpo) y/o modificación postraducciona de un polipéptido o proteína completamente ensamblada (por ejemplo, anticuerpo). En esta solicitud, los términos "expresión" y "producción" y equivalentes gramaticales, se usan indistintamente.

Funcional: Como se usa en este documento, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en que presenta una propiedad y/o actividad por la que se caracteriza.

Semivida: Como se usa en este documento, el término "semivida" es el tiempo requerido para que una cantidad, tal

como concentración o actividad de ácido nucleico o proteína caiga hasta la mitad de su valor medido al inicio de un periodo de tiempo.

Mejorar, aumentar o reducir: Como se usa en este documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición basal, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en este documento, o una medición en un sujeto de control (o múltiples sujetos de control) en ausencia del tratamiento descrito en este documento. Un "sujeto de control" es un sujeto afectado con la misma forma de enfermedad que el sujeto que se está tratando, que es aproximadamente de la misma edad que el sujeto que se está tratando.

In vitro: Como se usa en este documento, el término "*in vitro*" se refiere a acontecimientos que se producen en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular.

In vivo: Como se usa en este documento, el término "*in vivo*" se refiere a acontecimientos que se producen dentro de un organismo multicelular, tal como un ser humano y un animal no humano. En el contexto de sistemas basados en células, el término puede usarse para hacer referencia a acontecimientos que se producen dentro de una célula viva (en oposición a, por ejemplo, sistemas *in vitro*).

Aislada: Como se usa en este documento, el término "aislada" se refiere a una sustancia y/o entidad que se ha (1) separado de al menos algunos de los componentes con los que estaba asociado cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o más de aproximadamente un 99 % de los otros componentes con que estaban asociadas inicialmente. Los agentes aislados pueden ser aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o más de aproximadamente un 99 % puros. Como se usa en este documento, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Como se usa en este documento, el cálculo del porcentaje de pureza de sustancias y/o entidades aisladas no debe incluir excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.).

ARN mensajero (ARNm): Como se usa en este documento, la expresión "ARN mensajero (ARNm)" se refiere a un polinucleótido que codifica al menos un polipéptido. ARNm, como se usa en este documento, abarca ARN tanto modificado como sin modificar. El ARNm puede contener una o más regiones codificantes y no codificantes. El ARNm puede purificarse de fuentes naturales, producirse usando sistemas de expresión recombinante y opcionalmente purificarse, sintetizarse químicamente, etc. Cuando sea apropiado, por ejemplo, en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, el ARNm puede comprender análogos nucleosídicos tales como análogos que tienen bases o glúcidos modificados químicamente, modificaciones de la cadena principal, etc. Una secuencia de ARNm se presenta en dirección 5' a 3' a menos que se indique otra cosa.

Ácido nucleico: Como se usa en este documento, la expresión "ácido nucleico", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que se incorpore o pueda incorporarse en una cadena polinucleotídica. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es un compuesto y/o sustancia que se incorpora o puede incorporarse en una cadena polinucleotídica mediante un enlace fosfodiéster. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a residuos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos). En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se refiere a una cadena polinucleotídica que comprende residuos de ácido nucleico individuales. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" abarca ARN, así como ADN mono y/o bicatenario y/o ADNc. Además, las expresiones "ácido nucleico", "ADN", "ARN" y/o expresiones similares incluyen análogos de ácido nucleico, es decir, análogos que tienen cadenas principales distintas de fosfodiéster. Por ejemplo, los denominados "ácidos peptidonucleicos", que son conocidos en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal, se consideran dentro del alcance de la presente divulgación. La expresión "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y/o codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y/o ARN pueden incluir intrones. Los ácidos nucleicos pueden purificarse de fuentes naturales, producirse usando sistemas de expresión recombinante y opcionalmente purificarse, sintetizarse químicamente, etc. Cuando sea apropiado, por ejemplo, en el caso de moléculas sintetizadas químicamente, los ácidos nucleicos pueden comprender análogos nucleosídicos tales como análogos que tienen bases o glúcidos modificados químicamente, modificaciones de la cadena principal, etc. Una secuencia de ácido nucleico se presenta en dirección 5' a 3' a menos que se indique otra cosa. En algunas realizaciones, un ácido nucleico es o comprende nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanósina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina); análogos nucleosídicos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-

tiotimidina, inosina, pirrolo-pirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5 propinilcitidina, C-5 propiniluridina, 2-aminoadenosina, C5-bromouridina, C5-fluorouridina, C5-yodouridina, C5-propiniluridina, C5-propinilcitidina, C5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina); bases modificadas químicamente; bases modificadas biológicamente (por ejemplo, bases metiladas); bases intercaladas; glúcidos modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa y hexosa); y/o grupos fosfato modificados (por ejemplo, fosforotioatos y enlaces 5'-N-fosforamidita). En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere específicamente a "ácidos nucleicos no modificados", que significa ácidos nucleicos (por ejemplo, polinucleótidos y residuos, incluyendo nucleótidos y/o nucleósidos) que no se han modificado químicamente para facilitar o conseguir su administración. Los nucleótidos T y U se usan indistintamente en las descripciones de secuencia.

Paciente: Como se usa en este documento, el término "paciente" o "sujeto" se refiere a cualquier organismo al que puede administrarse una composición proporcionada, por ejemplo, con propósitos experimentales, de diagnóstico, profilácticos, cosméticos y/o terapéuticos. Pacientes típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates y/o seres humanos). En algunas realizaciones, un paciente es un ser humano.

Farmacéuticamente aceptable: La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en este documento, se refiere a sustancias que, dentro del alcance de criterio médico razonable, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación de beneficio/riesgo razonable.

Sujeto: Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a un ser humano o cualquier animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado bovino, cerdos, ovejas, caballos o primates). En muchas realizaciones, un sujeto es un ser humano. Un sujeto puede ser un paciente, que se refiere a un ser humano que se presenta a un profesional médico para diagnóstico o tratamiento de una enfermedad. El término "sujeto" se usa en este documento indistintamente con "individuo" o "paciente". Un sujeto puede estar afectado con o es susceptible a una enfermedad o trastorno, pero puede presentar o no síntomas de la enfermedad o trastorno.

Sustancialmente: Como se usa en este documento, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de presentar un alcance o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en la materia de biología entenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente, si acaso, llegan a completarse y/o prosiguen hasta completarse o consiguen o evitan un resultado absoluto. El término "sustancialmente", por lo tanto, se usa en este documento para capturar la posible ausencia de totalidad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

Tratar: Como se usa en este documento, el término "tratar", "tratamiento" o "tratando" se refiere a cualquier método usado para aliviar, mejorar, atenuar, inhibir, prevenir, retardar la aparición de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia, parcialmente o completamente, de uno o más síntomas o rasgos de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. El tratamiento puede administrarse a un sujeto no presenta signos de una enfermedad y/o presenta solamente signos iniciales de la enfermedad, con el propósito de disminuir el riesgo de desarrollar la patología asociada con la enfermedad.

Descripción detallada

La presente invención proporciona una composición que comprende un ARNm de codones optimizados para su expresión en células humanas, que codifica una proteína de regulador de la conductancia transmembranaria en fibrosis quística (CFTR) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde el ARNm que codifica la proteína CFTR comprende una secuencia polinucleotídica al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 1, y en donde el ARNm está a una concentración de al menos 0,4 mg/ml, y en donde la composición comprende además un diluyente seleccionado del grupo que consiste en DMSO, etilenglicol, glicerol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), propilenglicol, sacarosa y trehalosa, en donde dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de fibrosis quística (CF) en un sujeto, y la etapa de administración de la composición al sujeto comprende inhalación.

Diversos aspectos de la invención se describen en detalle en las siguientes secciones. No se entiende que el uso de secciones sea limitante. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto.

La fibrosis quística, también conocida como mucoviscidosis, es un trastorno genético recesivo autosómico que afecta muy crucialmente a los pulmones, y también al páncreas, el hígado y el intestino (Gibson *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med.* (2003) 168(8):918-951; Ratjen *et al.*, *Lancet Lond Engl.* (2003) 361(9358):681-689; O'Sullivan *et al.*, *Lancet Lond Engl.* (2009) 373(9678):1891-1904). La fibrosis quística está provocada por mutaciones en el gen que codifica la proteína de regulador de la conductancia transmembranaria en fibrosis quística (CFTR). Esta proteína funciona como un canal que transporta iones cloruro a través de la membrana de las células y es necesaria para regular los componentes del moco, sudor, saliva, lágrimas y enzimas digestivas. Las mutaciones que provocan enfermedad en la proteína CFTR provocan disfunción de su actividad de canal provocando transporte anómalo de iones cloruro y sodio a través del epitelio, dando lugar a las secreciones espesas, viscosas en el pulmón, el páncreas y otros órganos característicos de enfermedad CF (O'Sullivan *et al.*, *Lancet Lond Engl.* (2009) 373(9678):

1891-1904; Rowe *et al.*, *N Engl J Med.* (2005) 352(19): 1992-2001). La mayoría de pacientes con CF desarrollan enfermedad pulmonar crónica grave relacionada con obstrucción de las vías respiratorias parcialmente debida a niveles aumentados de mucinas sulfatadas, inflamación e infecciones recurrentes que finalmente son mortales; la mediana de edad de supervivencia prevista en Estados Unidos es de 40,7 años. La fibrosis quística es la enfermedad genética mortal más frecuente en la población blanca.

Los síntomas a menudo aparecen en la infancia y la niñez, con síntomas respiratorios muy frecuentemente seguidos de retraso del crecimiento, esteatorrea y íleo meconial (Gibson *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med.* (2003) 168(8): 918-951). Las complicaciones más comunes de CF están relacionadas con los pulmones e incluyen bloqueos de los pasos estrechos de los órganos afectados con secreciones espesadas. Estos bloqueos dan lugar a remodelado e infección en el pulmón, provocan daños en el páncreas debido a enzimas digestivas acumuladas, y bloqueos de los intestinos. La diabetes es la complicación no pulmonar más común y es una entidad distinta conocida como diabetes relacionada con CF.

Los pulmones de individuos con CF se colonizan e infectan por bacterias desde una edad temprana. Esto da lugar a infección e inflamación crónica de las vías respiratorias, que progresan a bronquiectasia, atrapamiento de gas, hipoxemia e hipercapnia. La insuficiencia pulmonar es responsable de un 68,1 % de muertes relacionadas con CF en Estados Unidos. En la fase inicial, bacterias comunes tales como *Staphylococcus aureus* y *Hemophilus influenzae* colonizan e infectan los pulmones. Finalmente, *Pseudomonas aeruginosa* (y, a veces, *Burkholderia cepacia*) dominan. Para los 18 años de edad, un 80 % de pacientes con CF clásica portan *P. aeruginosa*, y un 3,5 % portan *B. cepacia*.

Una vez dentro de los pulmones, estas bacterias se adaptan al entorno y desarrollan resistencia a antibióticos normalmente usados.

El defecto subyacente que provoca CF es transporte anómalo de aniones epiteliales debido a la ausencia de expresión o disfunción de la proteína CFTR. La proteína CFTR funciona principalmente como un canal de cloruro en membranas de células epiteliales; sin embargo, también está implicada en otras varias funciones de membrana celular tales como inhibición del transporte de sodio a través del canal de sodio epitelial, regulación del canal de cloruro rectificativo hacia el exterior y regulación de canales de trifosfato de adenosina (ATP) (O'Sullivan *et al.*, *Lancet Lond Engl.* (2009) 373(9678): 1891-1904). La CF está provocada por mutaciones en el gen que codifica la proteína CFTR, de las que se han identificado más de 1500 mutaciones que provocan enfermedad (O'Sullivan *et al.*, *Lancet Lond Engl.* (2009) 373(9678): 1891-1904). Las mutaciones génicas más comunes provocan la pérdida de síntesis de la proteína CFTR (clase I), procesamiento y maduración defectuosos de la proteína CFTR (clase II) o la expresión de una proteína CFTR defectuosa en la regulación, por ejemplo, unión e hidrólisis disminuidas de ATP (clase III) (Rowe *et al.*, *N Engl J Med.* (2005) 352(19):1992-2001). Una eliminación de fenilalanina en la posición 508 (F508del) es la mutación de CFTR más común en todo el mundo y es un defecto de clase II en que la proteína plegada incorrectamente se degrada rápidamente por la célula pronto tras su síntesis (Rowe *et al.*, *N Engl J Med.* (2005) 352(19): 1992-2001). La ausencia de una proteína CFTR funcional provoca obstrucción mucosa de las glándulas exocrinas en pacientes con CF, secundaria a transporte anómalo de cloruro y sodio a través del epitelio. En el pulmón, esto da lugar al desarrollo de secreciones espesas, persistentes que obstruyen las vías respiratorias y las glándulas submucosas, lo que a su vez da lugar a infección bacteriana e inflamación crónicas, como se describe anteriormente.

Los síntomas respiratorios de fibrosis quística incluyen: una tos persistente que produce moco espeso (esputo), sibilancias, disnea, intolerancia al ejercicio, infecciones pulmonares repetidas y pasos nasales inflamados u obstrucción nasal. Los síntomas digestivos de fibrosis quística incluyen: olor fétido, esteatorrea, poco aumento de peso y crecimiento, bloqueo intestinal, particularmente en recién nacidos (íleo meconial) y estreñimiento grave.

Hay varios métodos diferentes para evaluar los síntomas de la fibrosis quística. En un caso, se evalúa uno o más síntomas de fibrosis quística por volumen espiratorio forzado (FEV), que mide la cantidad de aire que una persona puede espirar durante una respiración forzada. En un caso, se mide la cantidad de aire espirado en el primer segundo de la respiración forzada (FEV₁). En un caso, se mide la cantidad de aire espirado en la segunda de la respiración forzada (FEV₂). En un caso, se mide la cantidad de aire espirado en el tercer segundo de la respiración forzada (FEV₃). En un caso, se mide la capacidad vital forzada (FVC), que es la cantidad total de aire espirada durante un ensayo de FEV. En un caso, se evalúa uno o más síntomas de fibrosis quística por la puntuación del dominio respiratorio del cuestionario de fibrosis quística revisado (CFQ-R). La puntuación del dominio respiratorio del CFQ-R es una medida de los síntomas respiratorios relevante para pacientes con CF, tales como tos, producción de esputo y dificultad para respirar. En un caso, se evalúa uno o más síntomas de fibrosis quística por el riesgo relativo de exacerbación pulmonar. En un caso, se evalúa uno o más síntomas de fibrosis quística por cambio en el peso corporal. En un caso, se evalúa uno o más síntomas de fibrosis quística por cambio en el cloruro del sudor (mmol/l).

Selección de pacientes

La composición para su uso con la presente invención es adecuada para el tratamiento de pacientes con diversos defectos de CFTR incluyendo, aunque sin limitación, pacientes con diferentes síntomas, mutaciones o clases de CFTR, descritos en este documento.

En algunas realizaciones, la composición para su uso con la presente invención puede usarse para tratar a pacientes que portan una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más mutaciones de clase I (síntesis defectuosa de proteína) mostradas en la tabla 1. En algunas realizaciones, la composición para su uso con la presente invención puede usarse para tratar a pacientes que portan una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más mutaciones de clase II (procesamiento y tráfico anómalos) mostradas en la tabla 1. En algunas realizaciones, la composición para su uso con la presente invención puede usarse para tratar a pacientes que portan una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más mutaciones de clase III (regulación/activación defectuosa del canal) mostradas en la tabla 1. En algunas realizaciones, la composición para su uso con la presente invención puede usarse para tratar a pacientes que portan una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más mutaciones de clase IV (conductancia disminuida del canal) mostradas en la tabla 1. En algunas realizaciones, la composición para su uso con la presente invención puede usarse para tratar a pacientes que portan una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más mutaciones de clase V (síntesis y/o tráfico reducidos) mostradas en la tabla 1. En algunas realizaciones, la composición para su uso con la presente invención puede usarse para tratar a pacientes que portan cualquier combinación de mutaciones específicas seleccionadas de la tabla 1 (por ejemplo, una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más mutaciones de diferentes clases mostradas en la tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de mutaciones génicas de CFTR

Categoría	Mutación	Mutaciones específicas
Clase I	Síntesis defectuosa de proteína (finalizadora, desplazamiento del marco de lectura, empalme aberrante)	1078delT, 1154 insTC, 1525-2A > G, 1717-1G > A, 1898+1G > A, 2184delA, 2184 insA, 3007delG, 3120+1G > A, 3659delC, 3876delA, 3905insT, 394delTT, 4010delA, 4016insT, 4326delTC, 4374+1G > T, 441delA, 556delA, 621+1G > T, 621-1G > T, 711+1G > T, 875+1G > C, E1104X, E585X, E60X, E822X, G542X, G551D/R553X, Q493X, Q552X, Q814X, R1066C, R1162X, R553X, V520F, W1282X, Y1092X
Clase II	Procesamiento y tráfico anómalos	A559T, D979A, ΔF508, ΔI507, G480C, G85E, N1303K, S549I, S549N, S549R
Clase III	Regulación/activación defectuosa del canal	G1244E, G1349D, G551D, G551S, G85E, H199R, I1072T, I48T, L1077P, R560T, S1255P, S549N (R75Q)
Clase IV	Conductancia disminuida del canal	A800G, D1152H, D1154G, D614G, delM1140, E822K, G314E, G576A, G622D, G85E, H620Q, I1139V, I1234V, L1335P, M1137V, P67L, R117C, R117P, R117H, R334W, R347H, R347P, R347P/R347H, R792G, S1251N, V232D
Clase V	Síntesis y/o tráfico reducidos	2789+5G > A, 3120G > A, 3272-26A > G, 3849+10kbC > T, variante 5T, 621+3A > G, 711+3A > G, A445E, A455E, IVS8 poli T, P574H, 875+1G > C

En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento es un hombre o mujer de 2 años o más, o de 3 años o más, o de 6 años o más, o de 7 años o más, o de 12 años o más, o de 13 años o más, o de 18 años o más, o de 19 años o más, o de 25 años o más, o de 25 años o más, o de 30 años o más, o de 35 años o más, o de 40 años o más, o de 45 años o más, o de 50 años o más. En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento es de menos de 50 años de edad, o menos de 45 años de edad, o menos de 40 años de edad, o menos de 35 años de edad, o menos de 30 años de edad, o menos de 25 años de edad, o menos de 20 años de edad, o menos de 19 años de edad, o menos de 18 años de edad, o menos de 13 años de edad, o menos de 12 años de edad, o menos de 7 años de edad, o menos de 6 años de edad, o menos de 3 años de edad, o menos de 2 años de edad. En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento es un hombre o mujer de 2 a 18 años de edad, o de 2 a

12 años de edad, o de 2 a 6 años de edad, o de 6 a 12 años de edad, o de 6 a 18 años de edad, o de 12 a 16 años de edad, o de 2 a 50 años de edad, o de 6 a 50 años de edad, o de 12 a 50 años de edad, o de 18 a 50 años de edad. En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento es una mujer que está embarazada o que puede quedarse embarazada.

5 En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento tiene un valor de cloruro en sudor de ≥ 60 mmol/l, ≥ 65 mmol/l, ≥ 70 mmol/l, ≥ 75 mmol/l, ≥ 80 mmol/l, ≥ 85 mmol/l, ≥ 90 mmol/l, ≥ 95 mmol/l, ≥ 100 mmol/l, ≥ 110 mmol/l, ≥ 120 mmol/l, ≥ 130 mmol/l, ≥ 140 mmol/l o ≥ 150 mmol/l por iontoforesis cuantitativa de pilocarpina (documentada en el registro médico del sujeto). En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento tiene enfermedad
10 senopulmonar crónica y/o anomalías gastrointestinales/nutricionales coherentes con enfermedad CF. En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento tiene enfermedad senopulmonar crónica y/o anomalías gastrointestinales/nutricionales coherentes con enfermedad CF.

15 En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento tiene FEV₁ ≥ 50 % y ≤ 90 % (por ejemplo, ≤ 85 %, ≤ 80 %, ≤ 75 %, ≤ 70 %, ≤ 65 %, ≤ 60 % o ≤ 55 %) de los normal previsto (es decir, el FEV promedio de pacientes sin CF) en función de la edad, sexo y estatura del paciente. En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento tiene saturación de oxígeno en reposo ≥ 92 % en aire ambiente (pulsioximetría). En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento tiene un índice de masa corporal $\geq 17,5$ kg/m² y peso ≥ 40 kg.

20 En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento ha recibido o está recibiendo simultáneamente otras medicaciones para CF. Por ejemplo, un paciente que necesita tratamiento puede estar recibiendo el fármaco combinado lumacaftor/ivacaftor (ORKAMBI) o puede haber estado con este tratamiento durante al menos 28 días antes del comienzo de un tratamiento con una composición de acuerdo con la presente invención. Otras
25 medicaciones para CF pueden incluir, aunque sin limitación, tratamientos inhalados rutinarios dirigidos a la depuración de las vías respiratorias y gestión de las infecciones respiratorias, tales como broncodilatadores, rhDNasa (PULMOZYME), solución salina hipertónica, antibióticos y esteroides; y otros tratamientos rutinarios relacionados con CF tales como antibióticos sistémicos, enzimas pancreáticas, multivitaminas, y medicaciones para la diabetes y el hígado.

30 En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento ha sido no fumador durante un mínimo de 2 años. En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento no recibe tratamiento inhalado de rhDNasa (PULMOZYME) durante 24 horas antes y/o después de la administración de una composición que comprende un ARNm que codifica una proteína CFTR de acuerdo con la presente invención.

35 En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento se ha tratado o se está tratando actualmente con hormonoterapias de remplazo, hormonoterapia de remplazo tiroideo, fármacos inflamatorios no esteroideos y dronabinol con receta (MARINOL) durante el tratamiento.

40 En algunas realizaciones, un paciente que necesita tratamiento ha interrumpido el uso de uno o más tratamientos distintos para fibrosis quística descritos en este documento. En algunas realizaciones, el paciente ha interrumpido el uso de uno o más tratamientos distintos para fibrosis quística durante al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3
45 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas o al menos 8 semanas antes de la administración de una composición que comprende un ARNm de CFTR de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el paciente ha interrumpido el uso de uno o más tratamientos distintos para fibrosis quística durante menos de 12 horas, menos de 24 horas, menos de 36 horas, menos de 48 horas, menos de 72 horas, menos de 1 semana, menos de 2 semanas, menos de 3 semanas, menos de 4 semanas, menos de 5 semanas, menos de 6 semanas, menos de 7 semanas, menos de 8 semanas, menos de 9 semanas o
50 menos de 10 semanas antes de la administración de una composición que comprende un ARNm de CFTR de acuerdo con la presente invención.

Formulación y administración

55 Una secuencia de ARNm adecuada tiene los codones optimizados para expresión eficaz en células humanas. Una secuencia codificante ejemplar de ARNm de CFTR de codones optimizados y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Secuencias ejemplares de ARNm y proteína de CFTR

Secuencia codificante de ARNm de CFTR humana de codones optimizados	AUGCAACGCUCUCCUCUUGAAAAGGCCUCGGUGGUGUCCAAGCUCUU CUUCUCGUGGACUAGACCCAUCCUGAGAAAGGGGUACAGACAGCGCU UGGAGCUGUCCGAUAUCUAUCAAUCCCUUCCGUGGACUCCGCGGAC AACCUGUCCGAGAAGCUCGAGAGAGAAUGGGACAGAGAACUCGCCUC AAAGAAGAACCCGAAGCUGAUUAAUGCGCUUAGGCGGUGCUUUUUC UGGCGGUUCAUGUUCUACGGCAUCUUCUCCUACCUUGGGAGAGGUCAC CAAGGCCGUGCAGCCCCUGUUGCUGGGACGGAUUAUUGCCUCCUACG ACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGCAUCGCUAUCUACUUGGGCAUC GGUCUGUGCCUGCUUUUCAUCGUCCGGACCCUCUUGUUGCAUCCUGC UAUUUUCGGCCUGCAUCACAUUGGCAUGCAGAUGAGAAUUGCCAUG UUUUCUCCUGAUCUACAAGAAAACUCUGAAGCUCUCGAGCCGCGUGCU UGACAAGAUUUCCAUCGGCCAGCUCGUGUCCUUGCUCUCCAACAAUC UGAACAAGUUCGACGAGGGCCUCGCCUUGGCCACUUCGUGUGGAUC GCCCCUCUGCAAGUGGCGCUUCUGAUGGGCCUGAUCUGGGAGCUGCU GCAAGCCUCGGCAUUCUGUGGGCUUGGAUUCUGAUCGUGCUGGCAC UGUUCAGGCCGGACUGGGGCGGAUGAUGAUGAAGUACAGGGACCA GAGAGCCGGAAAGAUUUCGAACGGCUGGUGAUCACUUCGGAAUUG AUCGAAAACAUCCAGUCAGUGAAGGCCUACUGCUGGGAAGAGGCCAU GGAAAAGAUUGAUUGAAAACCUCCGGCAAACCGAGCUGAAGCUGACCC GCAAGGCCGCUUACGUGCGCUAUUUCAACUCGUCCGCUUUCUUCUUC UCCGGGUUCUUCGUGGUGUUUCUCUCCGUGCUCCCCUACGCCUGAU UAAGGGAAUCAUCCUCAGGAAGAUUCUACACCAUUCUUCUGUA UCGUGCUCCGCAUGGGCCGUGACCCGGCAGUUCUCCAUUGGGCCGUGCAG ACUUGGUACGACUCCUUGGGAGCCAUUAACAAGAUCCAGGACUUCU UCAAAAGCAGGAGUACAAGACCCUCGAGUACAACCUAGACUACUACCG AGGUCGUGAUGGAAAACGUCACCGCCUUUUGGGAGGAGGGGAUUUGG CGAACUGUUCGAGAAGGCCAAGCAGAACAAACAACCGCAAGACCU CGAACGGUGACGACUCCUUCUUCUUUCAAACUUCAGCCUGCUCGGG ACGCCCCGUGCUGAAGGACAUAACUUCAGAUCAAGAGAGGACAGCU CCUGGCGGUGGGCCGAUCGACCGGAGCCGGAAAGACUUCUCCUGCUGA UGGUGAUCUUGGGAGAGCUUGAACCUAGCGAGGGAAAGAUCAAGCA CUCCGGCCGCAUCAGCUUCUGUAGCCAGUUUUCUGGAUCAUGCCCG GAACCAUUAAGGAAAACAUAUCUUCGGCGUGUCCUACGAUGAAUAC CGCUACCGGUCCGUGAUCAAAGCCUGCCAGCUGGAAGAGGAUUAUUC AAAGUUCGCGGAGAAAGAUAAACUUCGUGCUGGGCGAAGGGGGUAUU ACCUUGUCGGGGGGCCAGCGGGCUAGAAUCUCGCUGGCCAGAGCCGU GUAUAAGGACGCCGACUUGUAUCUCCUGGACUCCCCCUUCGGAUACC UGGACGUCCUGACCGAAAAGGAGAUUCUUCGAAUCGUGCGUGUGCAA GCUGAUGGCUAACAAGACUCGCAUCCUUCGUGACCUCCAAAAUGGAGC ACCUGAAGAAGGCAGACAAGAUUCUGAUUCUGCAUGAGGGGUCCUCC
---	--

UACUUUUACGGCACCUUCUCGGAGUUGCAGAACUUGCAGCCCGACUU
 CUCAUCGAAGCUGAUGGGUUGCGACAGCUUCGACCAGUUCUCCGCCG
 AAAGAAGGAACUCGAUCCUGACGGAAACCUUGCACCGCUUCUCUUUG
 GAAGGCGACGCCCCUGUGUCAUGGACCGAGACUAAGAAGCAGAGCUU
 CAAGCAGACCGGGGAAUUCGGCGAAAAGAGGAAGAACAGCAUCUUG
 AACCCCAUUAACUCCAUCGCAAGUUCUCAAUUCGUGCAAAAAGACGCC
 ACUGCAGAUGAACGGCAUUGAGGAGGACUCCGACGAACCCCUUGAGA
 GGCGCCUGUCCUGGUGCCGGACAGCGAGCAGGGAGAAGCCAUCCUG
 CCUCGGAUUUCCGUGAUCUCCACUGGUCCGACGCUCCAAGCCCCGGCG
 GCGGCAGUCCGUGCUGAACCUGAUGACCCACAGCGUGAACCAGGGCC
 AAAACAUUCACCGCAAGACUACCGCAUCCACCCGGAAAGUGUCCUG
 GCACCUCAAGCGAAUCUUACCGAGCUCGACAUCUACUCCCGGAGACU
 GUCGCAGGAAACCGGGCUCGAAAUUCCGAAGAAUCAACGAGGAG
 GAUCUGAAAGAGUGCUUCUUCGACGAUAUGGAGUCGAUACCCGCCGU
 GACGACUUGGAACACUUAUCUGCGGUACAUCACUGUGCACAAGUCAU
 UGAUCUUCGUGCUGAUUUGGUGCCUGGUGAUUUUCCUGGCCGAGGU
 CGCGGCCUCACUGGUGGUGCUCUGGCUGUUGGGAAACACGCCUCUGC
 AAGACAAGGGAAACUCCACGCACUCGAGAAACAACAGCUAUGCCGUG
 AUUAUCACUCCACCUCUUAUUAACGUGUUCUACAUCUACGUCGG
 AGUGGCGGAUACCCUGCUCGCGAUGGGUUCUUCAGAGGACUGCCGC
 UGGUCCACACCUUGAUCACCGUCAGCAAGAUUCUUCACCACAAGAUG
 UUGCAUAGCGUGCUGCAGGCCCCCAUGUCCACCCUCAACACUCUGAA
 GGCCGGAGGCAUUCUGAACAGAUUCUCCAAGGACAUCGCUAUCCUGG
 ACGAUCUCCUGCCGCUUACCAUCUUGACUUAUCCAGCUGCUGCUG
 AUCGUGAUUGGAGCAAUCGCAGUGGUGGCGGUGCUGCAGCCUACA
 UUUUCGUGGCCACUGUGCCGGUCAUUGUGGCGUUAUCAUGCUGCGG
 GCCUACUCCUCCAACACAGCCAGCAGCUGAAGCAACUGGAAUCCGA
 GGGACGAUCCCCCAUCUUCACUCACCUUGUGACGUCGUUGAAGGGAC
 UGUGGACCCUCCGGGCUUUCGGACGGCAGCCCUACUUCGAAACCCUC
 UUCCACAAGGCCUGAACCUCACACCGCCAAUUGGUUCCUGUACCU
 GUCCACCCUGCGGUGGUUCCAGAUGCGCAUCGAGAUGAUUUUCGUCA
 UCUUCUUCAUUCGCGGUCACAUUAUCAGCAUCCUGACUACCGGAGAG
 GGAGAGGGACGGGUUCGGAUAAUCCUGACCCUCGCCAUGAACAUAU
 GAGCACCCUGCAGUGGGCAGUGAACAGCUCGAUCGACGUGGACAGCC
 UGAUGCGAAGCGUCAGCCGCGUGUUAAGUUAUCGACAUGCCUACU
 GAGGGAAAACCCACUAAGUCCACUAAGCCCUACAAAAAUGGCCAGCU
 GAGCAAGGUCAUGAUCAUUGAAAACUCCACGUGAAGAAGGACGAU
 AUUUGGCCUCCGGAGGUCAAUGACCGUGAAGGACCUGACCGCAA
 GUACACCGAGGGAGGAAACGCCAUUCUCGAAAACAUCAGCUUCUCCA
 UUUUGCCGGGACAGCGGGUCGGCCUUCUCGGGCGGACCGGUUCCGGG

	AAGUCAACUCUGCUGUCGGCUUCCUCCGGCUGCUGAAUACCGAGGG GGAAAUCCAAAUUGACGGCGUGUCUUGGGAUUCCAUAUCUCUGCAGC AGUGGGCGGAAGGCCUUCGGCGUGAUCCCCCAGAAGGUGUUCAUCUUC UCGGGUACCUUCCGGAAGAACCUGGAUCCUACGAGCAGUGGAGCGA CCAAGAAAUCUGGAAGGUCGCCGACGAGGUCGGCCUGCGCUCCGUGA UUGAACAAUUCUGGAAAGCUGGACUUCGUGCUCGUCGACGGGGG AUGUGUCCUGUCGCACGGACAUAAGCAGCUC AUGUGCCUCGCACGGU CCGUGCUCUCCAAGGCCAAGAUUCUGCUGCUGGACGAACCUUCGGCC CACCUGGAUCCGGUCACCUACCAGAUAUCAGGAGGACCCUGAAGCA GGCCUUGCCGAUUGCACCGUGAUUCUCUGCGAGCACCGCAUCGAGG CCAUGCUGGAGUGCCAGCAGUCCUGGUC AUUCGAGGAGAACAAAGGUC CGCCAAUACGACUCCAUAUCAAAGCUCUCCAACGAGCGGUCGUGU CAGACAAGCUAUUUCACCGUCCGAUAGAGUGAAGCUCUCCCCGCAUC GGAACAGCUCAAAAGUGCAAUUCGAAGCCGCAGAUUCGACCCUUGAAG GAAGAGACUGAGGAAGAGGUGCAGGACACCCGGCUUUA (SEQ ID NO: 1)
Secuencia proteína de CFTR humana	MQRSPLEKASVVS KLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDSADNLSEK LEREWRELASKKNPKLINALRRCFWRFMFYGIFLYLGEVTKAVQPLLL GRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVRTL LHPAIFGLHHIGMQMRIA MFSLIYKKTLLSSRVL DKISIGQLVSL SNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQ VALLMGLIWELLQAS AFCGLGFLIVLALFQAGLGRMMM KYRDQRAGKIS ERLVITSEMIENIQSVKAYCWE EAMEKMIENLRQTELKLTRKAAYVRYFN SSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKGILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQT WYDSLGAINKIQDFLQKQEYKTLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEGFGELFE KAKQNNNNRKT SNGDDSLFFSNFSL LGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTG AGKTSLLMVIMGELEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDE YRYRSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVLGE GGITLSGGQRARISLARAVYKD ADLYLLDSPFGYLDVLT EKEIFESCVC KLMANKTRILVTSKMEHLKKADKI LILHEGSSYFYGT FSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSILTETLHR FSLEGDAPVSWTETKKQSFKQTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQ MNGIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSVLNL MTHSVNQGNHRKTTASTRKVSLAPQANLT ELDIYSRRLSQETGLEISEEI NEEDLKECFDDMESIPAVTTWNTYLR YITVHKSLIFVLIWCLVIFLAEVAA SLVVLWLLGNTP LQDKGNSTHSRNN SYAVIITSTSSYYVFYIYVGVADTLL AMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKMLH SVLQAPMSTLNTLKAGGILNRFSK DAILDDLPLTIFDFIQLLLIVIGAI AVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAY FLQTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSLKGLWTLRAFG RQPYFETLFHKALN LHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIF FIAVTFISILTTGEGEGRVGIILT LA MNIMSTLQWAVNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQ LSKVMIIENSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLT AKYTEGGNAILENISFSISPGQ

	RVGLLGRTGSGKSTLLSAFLRLLNTEGEIQIDGVSWSITLQQWRKAFGVIP QKVFI FSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVADEVGLRSVIEQFPGKLDFVLVD GGCVLSHG HKQLMCLARSVLSKAKILLLDEPSAHLDPVTYQIIRRTLKQAF ADCTVILCEHRIEAMLECCQQLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQAISPS DRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEETEEEVQDTRL (SEQ ID NO: 2)
--	--

Una secuencia de ARNm de CFTR adecuada para su uso con la presente invención comparte al menos un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO: 1 y codifica una proteína CFTR que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización, una secuencia de ARNm de CFTR incluye SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, un ARNm de CFTR adecuado para la invención también contiene secuencias UTR 5' y 3'. Secuencias UTR 5' y 3' ejemplares se muestran a continuación:

Secuencia UTR 5' ejemplar

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC CCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG (SEQ ID NO: 3)

Secuencia UTR 3' ejemplar

CGGGUGGCAUCCCUUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGCC
ACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ
ID NO: 4)

o

GGGUGGCAUCCCUUGUGACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGGAAGUUGCCA
CUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ
ID NO: 5)

Por tanto, en una realización, una secuencia ejemplar de longitud completa de ARNm de CFTR de codones optimizados adecuada para la invención es:

GGACAGAU CGCCUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGACACC
GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUUC CCG
UGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACGAUGCAACGCUCUCCUCUUGAAAAGG

CCUCGGUGGUGUCCAAGCUCUUCUUCUCGUGGACUAGACCCAUCCUGAGAAAGGG
 GUACAGACAGCGCUUGGAGCUGUCCGAUAUCUAUCAAUCCCUUCCGUGGACUCC
 GCGGACAACCUGUCCGAGAAGCUCGAGAGAGAAUGGGACAGAGAACUCGCCUCAA
 AGAAGAACCCGAAGCUGAUUAAUGCGCUUAGGCGGUGCUUUUUCUGGCGGUUCA
 UGUUCUACGGCAUCUUCUUCUACCUGGGAGAGGUCACCAAGGCCGUGCAGCCCCU
 GUUGCUGGGACGGAUUAUUGCCUCCUACGACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGC
 AUCGCUAUCUACUUGGGCAUCGGUCUGUGCCUGCUUUUCAUCGUCCGGACCCUCU
 UGUUGCAUCCUGCUAUUUUCGGCCUGCAUCACAUUGGCAUGCAGAUGAGAAUUG
 CCAUGUUUUCCUGAUUCUACAAGAAAACUCUGAAGCUCUCGAGCCGCGUGCUUGA
 CAAGAUUCCAUCGGCCAGCUCGUGUCCCUGCUCUCCAACAAUCUGAACAAGUUC
 GACGAGGGCCUCGCCUUGGCCACUUCGUGUGGAUCGCCCCUCUGCAAGUGGCGC
 UUCUGAUGGGCCUGAUCUGGGAGCUGCUGCAAGCCUCGGCAUUCUGUGGGCUUG
 GAUUCUGAUCGUGCUGGCACUGUUCAGGCCGGACUGGGGCGGAUGAUGAUGA
 AGUACAGGGACCAGAGAGCCGGAAGAUUUCGAAACGGCUGGUGAUCACUUCGG
 AAAUGAUCGAAAACAUCAGUCAGUGAAGGCCUACUGCUGGGAAGAGGCCAUGG
 AAAAGAUGAUUGAAAACCUCCGGCAAACCGAGCUGAAGCUGACCCGCAAGGCCGC
 UUACGUGCGCUAUUUC AACUCGUCCGCUUUCUUCUUCUCCGGGUUCUUCGUGGUG
 UUUCUCUCCGUGCUCCCCUACGCCUGAUUAAGGGAAUCAUCCUCAGGAAGAUCU
 UCACCACCAUUUCCUUCUGUAUCGUGCUCCGCAUGGCCGUGACCCGGCAGUUCCC
 AUGGGCCGUGCAGACUUGGUACGACUCCUGGGAGCCAUUAACAAGAUCCAGGAC
 UUCUUAACAAGCAGGAGUACAAGACCCUCGAGUACAACCUGACUACUACCGAGG
 UCGUGAUGGAAAACGUCACCGCCUUUUGGGAGGAGGGAUUUGGCGAACUGUUCG
 AGAAGGCCAAGCAGAACACAACAACCGCAAGACCUCGAACGGUGACGACUCCCU
 CUUCUUUUCAAACUUCAGCCUGCUCGGGACGCCCCGUGCUGAAGGACAUUAACUUC
 AAGAUCGAAAGAGGACAGCUCCUGGCGGUGGCCGGAUCGACCGGAGCCGGAAG
 ACUUCCUGCUGAUGGUGAUC AUGGGAGAGCUUGAACCUAGCGAGGGAAAGAUC
 AAGCACUCCGGCCGCAUCAGCUUCUGUAGCCAGUUUCCUGGAUCAUGCCCGGAA
 CCAUUAAGGAAAACAUAUCUUCGGCGUGUCCUACGAUGAAUACCGCUACCGGUC
 CGUGAUCAAAGCCUGCCAGCUGGAAGAGGAUAUUUCAAGUUCGCGGAGAAAGA
 UAACAUCGUGCUGGGCGAAGGGGGUAUUACCUUGUCGGGGGGCCAGCGGGCUAG
 AAUCUCGCUGGCCAGAGCCGUGUAUAAGGACGCCGACCUGUAUCUCCUGGACUCC

CCCUUCGGAUACCUGGACGUCCUGACCGAAAAGGAGAUUCUUCGAAUCGUGCGUGU
 GCAAGCUGAUGGCUAACAAGACUCGCAUCCUCGUGACCUCCAAAAUGGAGCACCU
 GAAGAAGGCAGACAAGAUUCUGAUUCUGCAUGAGGGGUCCUCCUACUUUUACGG
 CACCUUCUCGGAGUUGCAGAACUUGCAGCCCGACUUCUCAUCGAAGCUGAUGGGU
 UGCACAGCUUCGACCAGUUCUCCGCCGAAAGAAGGAACUCGAUCCUGACGGAAA
 CCUUGCACCGCUUCUCUUUGGAAGGCGACGCCCCUGUGUCAUGGACCGAGACUAA
 GAAGCAGAGCUUCAAGCAGACCGGGGAAUUCGGCGAAAAGAGGAAGAACAGCAU
 CUUGAACCCCAUUAACUCCAUCCGCAAGUUCUCAAUCGUGCAAAAAGACGCCACUG
 CAGAUGAACGGCAUUGAGGAGGACUCCGACGAACCCCUUGAGAGGCGCCUGUCCC
 UGGUGCCGGACAGCGAGCAGGGAGAAGCCAUCCUGCCUCGGAUUUCCGUGAUCUC
 CACUGGUCCGACGCUCCAAGCCCCGGCGGGCAGUCCGUGCUGAACCUGAUGACC
 CACAGCGUGAACCAGGGCCAAAACAUUCACCGCAAGACUACCGCAUCCACCCGGA
 AAGUGUCCCUUGGCACCUCAAGCGAAUCUUACCGAGCUCGACAUCUACUCCCGGAG
 ACUGUCGCAGGAAACCGGGCUCGAAAUUUCCGAAGAAUCAACGAGGAGGAUCU
 GAAAGAGUGCUUCUUCGACGAUAUGGAGUCGAUACCCGCCGUGACGACUUGGAA
 CACUUAUCUGCGGUACAUCACUGUGCACAAGUCAUUGAUCUUCGUGCUGAUUUG
 GUGCCUGGUGAUUUUCCUGGCCGAGGUCGCGGCCUCACUGGUGGUGCUCUGGCUG
 UUGGGAAACACGCCUCUGCAAGACAAGGGAAACUCCACGCACUCGAGAAACAACA
 GCUAUGCCCGUGAUUAUCACUUCACCUCUUAUUACGUGUUCUACAUCUACGU
 CGGAGUGGCGGAUACCCUGCUCGCGAUGGGUUCUUCAGAGGACUGCCGCUGGUC
 CACACCUUGAUCACCGUCAGCAAGAUUCUUCACCACAAGAUGUUGCAUAGCGUGC
 UGCAGGCCCCCAUGUCCACCCUCAACACUCUGAAGGCCGAGGCAUUCUGAACAG
 AUUCUCCAAGGACAUCGCUAUCCUGGACGAUCUCCUGCCGCUUACCAUCUUUGAC
 UUCAUCCAGCUGCUGCUGAUCGUGAUUGGAGCAAUCGCAGUGGUGGCGGUGCUG
 CAGCCUUAUUAUUUCGUGGCCACUGUGCCGGUCAUUGUGGCGUUAUCAUGCUGC
 GGGCCUACUUCUCCAAACCAGCCAGCAGCUGAAGCAACUGGAAUCCGAGGGACG
 AUCCCCAUUCUACUCACCUUGUGACGUCGUUGAAGGGACUGUGGACCCUCCGG
 GCUUUCGGACGGCAGCCCUACUUCGAAACCCUCUUCACAAAGGCCUGAACCUCC
 ACACCGCCAAUUGGUUCCUGUACCUGUCCACCCUGCGGUGGUUCCAGAUGCGCAU
 CGAGAUGAUUUUCGUCAUCUUCUUAUCGCGGUCACAUUCAUCAGCAUCCUGACU
 ACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGUCGGAAUAAUCCUGACCCUCGCCAUGAACAUU

AUGAGCACCCUGCAGUGGGCAGUGAACAGCUCGAUCGACGUGGACAGCCUGAUGC
 GAAGCGUCAGCCGCGUGUUCAAGUUCAUCGACAUGCCUACUGAGGGGAAAACCCAC
 UAAGUCCACUAAGCCCUACAAAAAUGGCCAGCUGAGCAAGGUCAUGAUCaucgaa
 AACUCCACGUGAAGAAGGACGAUAUUUGGCCUCCGGAGGUCAAUGACCGUGA
 AGGACCUGACCGCAAAGUACACCGAGGGAGGAAACGCCAUUCUCGAAAACAUCAG
 CUUCUCCAUUUCGCCGGGACAGCGGGUCGGCCUUCUCGGGCGGACCGGUUCCGGG
 AAGUCAACUCUGCUGUCGGCUUUCUCCGGCUGCUGAAUACCGAGGGGGAAAUCC
 AAAUUGACGGCGUGUCUUGGGAUUCAUUAUCUCGAGCAGUGGCGGAAGGCCU
 UCGGCGUGAUCCCCCAGAAGGUGUUCAUCUUCUCGGGUACCUUCCGGAAGAACCU
 GGAUCCUACGAGCAGUGGAGCGACCAAGAAAUCUGGAAGGUCGCCGACGAGGU
 CGGCCUGCGCUCCGUGAUUGAACAAUUUCCUGGAAAGCUGGACUUCGUGCUCGUC
 GACGGGGGAUGUGUCCUGUCGCACGGACAUAAGCAGCUCUUGUGCCUCGCACGGU
 CCGUGCUCUCCAAGGCCAAGAUUCUGCUGCUGGACGAACCUUCGGCCCACCUGGA
 UCCGGUACCUACCAGAUCAUCAGGAGGACCCUGAAGCAGGCCUUUGCCGAUUGC
 ACCGUGAUUCUCUGCGAGCACCGCAUCGAGGCCAUGCUGGAGUGCCAGCAGUUC
 UGGUCAUCGAGGAGAACAAAGGUCCGCCAAUACGACUCCAUAUCAAAGCUCCUCA
 CGAGCGGUCGCUGUUCAGACAAGCUAUUUCACCGUCCGAUAGAGUGAAGCUCUUC
 CCGCAUCGGAACAGCUCAAAGUGCAAUUCGAAGCCGCAGAUCCGAGCCUUGAAGG
 AAGAGACUGAGGAAGAGGUGCAGGACACCCGGCUUUAACGGGUGGCAUCCCUGU
 GACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCUUGGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCA
 GCCUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ ID NO: 6)

En otra realización, una secuencia ejemplar de longitud completa de ARNm de CFTR de codones optimizados es:

GGACAGAUCCGUGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCUAGAAAGACACC
 GGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGCGGAUCCCCG
 UGCCAAGAGUGACUACCGUCCUUGACACGAUGCAACGCUCUCCUCUUGAAAAGG
 CCUCGGUGGUGUCCAAGCUCUUCUUCUCUGGACUAGACCCAUCCUGAGAAAGGG
 GUACAGACAGCGCUUGGAGCUGUCCGAUAUCUAUCAAUCCCUUCCGUGGACUCC
 GCGGACAACCUGUCCGAGAAGCUCGAGAGAGAAUGGGACAGAGAACUCGCCUCA
 5 AGAAGAACCCGAAGCUGAUUAAUGCGCUUAGGCGGUGCUUUUUCUGGCGGUCA

UGUUCUACGGCAUCUUCCUCUACCUGGGAGAGGUCACCAAGGCCGUGCAGCCCCU
 GUUGCUGGGACGGAUUAUUGCCUCCUACGACCCCGACAACAAGGAAGAAAGAAGC
 AUCGCUAUCUACUUGGGCAUCGGUCUGUGCCUGCUUUUCAUCGUCCGGACCCUCU
 UGUUGCAUCCUGCUAUUUUCGGCCUGCAUCACAUUGGCAUGCAGAUGAGAAUUG
 CCAUGUUUUCCCUGAUCUACAAGAAAACUCUGAAGCUCUCGAGCCGCGUGCUUGA
 CAAGAUUUCCAUCGGCCAGCUCGUGUCCCUGCUCUCCAACAAUCUGAACAAGUUC
 GACGAGGGGCCUCGCCCCUGGCCACUUCGUGUGGAUCGCCCCUCUGCAAGUGGCGC
 UUCUGAUGGGCCUGAUCUGGGAGCUGCUGCAAGCCUCGGCAUUCUGUGGGCUUG
 GAUUECCUGAUCGUGCUGGCACUGUUECCAGGCCGGACUGGGGCGGAUGAUGAUGA
 AGUACAGGGACCAGAGAGCCGGAAAGAUUUECCGAACGGCUGGUGAUCACUUCGG
 AAAUGAUCGAAAACAUECCAGUCAGUGAAGGCCUACUGCUGGGAAGAGGCCAUGG
 AAAAGAUGAUUGAAAACCUCCGGCAAACCGAGCUGAAGCUGACCCGCAAGGCCGC
 UUACGUGCGCUAUUUCAACUCGUCCGCUUUCUUCUUCUCCGGGUUCUUCGUGGUG
 UUCUCUCCGUGCUCUUUUACGCCCUGAUUAAGGGAAUCAUCCUCAGGAAGAUCU
 UCACCACCAUUECCUUCUGUAUCGUGCUCGCAUGGCCGUGACCCGGCAGUUECC
 AUGGGCCGUGCAGACUUGGUACGACUCCCUGGGAGCCAUUAACAAGAUCCAGGAC
 UUECUUCAAAGCAGGAGUACAAGACCCUCGAGUACAACCUAGACUACUACCGAGG
 UCGUGAUGGAAAACGUCACCGCCUUUUGGGAGGAGGGAUUUGGCGAACUGUUCG
 AGAAGGCCAAGCAGAACACAACAACCGCAAGACCUCGAACGGUGACGACUCCCU
 CUUCUUUCAAACUUCAGCCUGCUCGGGACGCCCUGCUGAAGGACAUUAACUUC
 AAGAUUCGAAAGAGGACAGCUECCUGGCGGUGGCCGGAUCGACCGGAGCCGGAAG
 ACUUECCUGCUGAUGGUGAUGAUGGGAGAGCUUGAACCUAGCGAGGGGAAAGAUC
 AAGCACUECCGGCCGCAUCAGCUUCUGUAGCCAGUUUUECCUGGAUCAUGCCCGGAA
 CCAUUAAGGAAAACAUCAUCUUCGGCGUGUCCUACGAUGAAUACCGCUACCGGUC
 CGUGAUCAAAGCCUGCCAGCUGGAAGAGGAUAUUUCAAGUUCGCGGAGAAAGA
 UAACAUCGUGCUGGGCGAAGGGGGUAUUACCUUGUCGGGGGGCCAGCGGGCUAG
 AAUCUCGCUGGCCAGAGCCGUGUAUAAGGACGCCGACCUGUAUCUECCUGGACUCC
 CCCUUCGGAUACCUGGACGUCCUGACCGAAAAGGAGAUUCUUCGAAUCGUGCGUGU
 GCAAGCUGAUGGCUAACAAGACUCGCAUCCUCGUGACCUCCAAAAUGGAGCACCU
 GAAGAAGGCAGACAAGAUUCUGAUUCUGCAUGAGGGGUCCUCCUACUUUUACGG
 CACCUUCUCGGAGUUGCAGAACUUGCAGCCCGACUUCUCAUCGAAGCUGAUGGGU

UGCGACAGCUUCGACCAGUUCUCCGCCGAAAGAAGGAACUCGAUCCUGACGGAAA
CCUUGCACCGCUUCUCUUUGGAAGGCGACGCCCCUGUGUCAUGGACCGAGACUAA
GAAGCAGAGCUUCAAGCAGACCGGGGAAUUCGGCGAAAAGAGGAAGAACAGCAU
CUUGAACCCCAUUAACUCCAUCCGCAAGUUCUCAAUCGUGCAAAAGACGCCACUG
CAGAUGAACGGCAUUGAGGAGGACUCCGACGAACCCCUUGAGAGGGCGCCUGUCCC
UGGUGCCGGACAGCGAGCAGGGAGAAGCCAUCCUGCCUCGGAUUUCCGUGAUCUC
CACUGGUCCGACGCUCCAAGCCCGGCGGGCGGCAGUCCGUGCUGAACCUGAUGACC
CACAGCGUGAACCAGGGGCCAAAACAUUCACCGCAAGACUACCGCAUCCACCCGGA
AAGUGUCCCUGGCACCUC AAGCGAAUCUUACCGAGCUCGACAUCUACUCCCGGAG
ACUGUCGCAGGAAACCGGGCUCGAAAUUUCGAAGAAUCAAACGAGGAGGAUCU
GAAAGAGUGCUUCUUCGACGAUAUGGAGUCGAUACCCGCCGUGACGACUUGGAA
CACUUAUCUGCGGUACAUCACUGUGCACAAGUCAUUGAUCUUCGUGCUGAUUUG
GUGCCUGGUGAUUUUCCUGGCCGAGGUCGCGGCCUCACUGGUGGUGCUCUGGCUG
UUGGGAAACACGCCUCUGCAAGACAAGGGAAACUCCACGCACUCGAGAAACAACA
GCUAUGCCGUGAUUAUCACUUCACCUCUCUUAUUACGUGUUCUACAUCUACGU
CGGAGUGGCGGAUACCCUGCUCGCGAUGGGUUUCUUCAGAGGACUGCCGCUGGUC
CACACCUUGAUCACCGUCAGCAAGAUUCUUCACCACAAGAUGUUGCAUAGCGUGC
UGCAGGCCCCCAUGUCCACCCUCAACACUCUGAAGGCCGGAGGCAUUCUGAACAG
AUUCUCCAAGGACAUCGCUAUCCUGGACGAUCUCCUGCCGCUUACCAUCUUUGAC
UUCAUCCAGCUGCUGCUGAUCGUGAUUGGAGCAAUCGCAGUGGUGGCGGUGCUG
CAGCCUUAUAUUUCGUGGGCCACUGUGCCGGUCAUUGUGGCGUUAUCAUGCUGC
GGGCCUACUUCUCCAACAGCCAGCAGCUGAAGCAACUGGAAUCCGAGGGACG
AUCCCCCAUCUUCACUCACCUUGUGACGUCGUUGAAGGGACUGUGGACCCUCCGG
GCUUUCGGACGGCAGCCCUACUUCGAAACCCUCUCCACAAGGCCCUGAACCUCC
ACACCGCCAAUUGGUUCCUGUACCUGUCCACCCUGCGGUGGUUCCAGAUGCGCAU
CGAGAUGAUUUUCGUCAUCUUCUUCUUCGCGGUCACAUUCAUCAGCAUCCUGACU
ACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGUCGGAAUAAUCCUGACCCUCGCCAUGAACAUU
AUGAGCACCCUGCAGUGGGCAGUGAACAGCUCGAUCGACGUGGACAGCCUGAUGC
GAAGCGUCAGCCGCGUGUUAAGUUAUCGACAUGCCUACUGAGGGAAAACCCAC
UAAGUCCACUAAGCCCUACAAAAAUGGCCAGCUGAGCAAGGUCAUGAUCAUCGAA
AACUCCACGUGAAGAAGGACGAUAUUUGGCCCUCCGGAGGUCAAUGACCGUGA

ACACCGCCAAUUGGUUCCUGUACCUGUCCACCCUGCGGUGGUUCCAGAUGCGCAU
 CGAGAUGAUUUUCGUCUUCUUCUUCUACGCGGUCACAUUCAUCAGCAUCCUGACU
 ACCGGAGAGGGAGAGGGACGGGUCGGAUAAUCCUGACCCUCGCCAUGAACAUU
 AUGAGCACCCUGCAGUGGGCAGUGAACAGCUCGAUCGACGUGGACAGCCUGAUGC
 GAAGCGUCAGCCGCGUGUUAAGUUAUCGACAUGCCUACUGAGGGGAAAACCCAC
 UAAGUCCACUAAGCCCUACAAAAAUGGCCAGCUGAGCAAGGUCAUGAUCAUCGAA
 AACUCCACGUGAAGAAGGACGAUAAUUGGCCCUCCGGAGGUCAAUGACCGUGA
 AGGACCUGACCCGAAAGUACACCGAGGGAGGAAACGCCAUUCUCGAAAACAUCAG
 CUUCUCCAUUUCGCCGGGACAGCGGGUCGGCCUUCUCGGGCGGACCGGUUCCGGG
 AAGUCAACUCUGCUGUCGGCUUUCUCCGGCUGCUGAAUACCGAGGGGGAAAUCC
 AAAUUGACGGCGUGUCUUGGGAUCCAUAUCUCUGCAGCAGUGGCGGAAGGCCU
 UCGGCGUGAUCCCCCAGAAGGUGUUAUCUUCUCGGGUACCUUCCGGAAGAACCU
 GGAUCCUACGAGCAGUGGAGCGACCAAGAAAUCUGGAAGGUCGCCGACGAGGU
 CGGCCUGCGCUCCGUGAUUGAACAAUUUCCUGGAAAGCUGGACUUCGUGCUCGUC
 GACGGGGGAUGUGUCCUGUCGCACGGACAUAAGCAGCUCAUGUGCCUCGCACGGU
 CCGUGCUCUCCAAGGCCAAGAUUCUGCUGCUGGACGAACCUUCCGGCCCACCUGGA
 UCCGGUCACCUACCAGAUCAUCAGGAGGACCCUGAAGCAGGCCUUGCCGAUUGC
 ACCGUGAUUCUCUGCGAGCACCGCAUCGAGGCCAUGCUGGAGUGCCAGCAGUUC
 UGGUCAUCGAGGAGAACAAAGGUCCGCCAAUACGACUCCAUAUCAAAGCUCUCAA
 CGAGCGGUCGCUGUUCAGACAAGCUAAUUUACCGUCCGAUAGAGUGAAGCUCUUC
 CCGCAUCGGAACAGCUCAAAGUGCAAAUCGAAGCCGCAGAUCGCAGCCUUGAAGG
 AAGAGACUGAGGAAGAGGUGCAGGACACCCGGCUUUAAGGGUGGCAUCCUGUG
 ACCCCUCCCCAGUGCCUCUCCUGGCCCUUGAAGUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGC
 CUUGUCCUAAUAAAAUUAAGUUGCAUCAAGCU (SEQ ID NO: 7)

Un ARNm adecuado para la presente invención tiene una secuencia de nucleótidos al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a SEQ ID NO: 1.

5

Los ARNm en las composiciones para su uso de acuerdo con la presente invención pueden sintetizarse de acuerdo con cualquiera de una diversidad de métodos conocidos. Por ejemplo, los ARNm pueden sintetizarse mediante transcripción *in vitro* (IVT). En resumen, se realiza IVT típicamente linealmente o proporcionando resistencia a nucleasas encontradas en la mayoría de células eucariotas.

10

La presencia de una "cola" sirve para proteger el ARNm de la degradación por exonucleasas.

Por tanto, los ARNm que codifican CFTR incluyen una estructura de capuchón 5'. Un capuchón 5' se añade típicamente como sigue: en primer lugar, una ARN terminal fosfatasa elimina uno de los grupos fosfato terminales del nucleótido 5', dejando dos fosfatos terminales; entonces se añade trifosfato de guanosina (GTP) a los fosfatos terminales mediante una guanilil transferasa, produciendo un enlace 5'5' trifosfato; y el 7-nitrógeno de guanina entonces se metila por una metiltransferasa. Ejemplos de estructuras de capuchón incluyen, aunque sin limitación, m7G(5')ppp (5'(A,G(5')ppp(5')A y G(5')ppp(5')G. Estructuras adicionales de capuchón se describen en la solicitud de Estados Unidos publicada n.º US 2016/0032356 y la solicitud provisional de Estados Unidos 62/464.327, presentada el 27 de febrero de 2017.

20

Por tanto, los ARNm que codifican CFTR incluyen una estructura de cola 3'. Típicamente, una estructura de cola incluye una cola de poli(A) y/o poli(C). Una cola de poli-A o poli-C en el extremo 3' del ARNm típicamente incluye al menos 50 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 150 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 200 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 250 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 300 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 350 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 400 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 450 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 500 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 550 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 600 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 650 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 700 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 750 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 800 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 850 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 900 nucleótidos de adenosina o citosina, al menos 950 nucleótidos de adenosina o citosina, o al menos 1 kb de nucleótidos de adenosina o citosina, respectivamente. En algunas realizaciones, una cola de poli-A o poli-C puede ser de aproximadamente 10 a 800 nucleótidos de adenosina o citosina (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 200 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 10 a 300 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 10 a 400 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 10 a 500 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 10 a 550 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 10 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 50 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 100 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 150 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 200 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 250 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 300 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 350 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 400 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 450 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 500 a 600 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 10 a 150 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de adenosina o citosina, de aproximadamente 20 a 70 nucleótidos de adenosina o citosina, o de aproximadamente 20 a 60 nucleótidos de adenosina o citosina) respectivamente. En algunas realizaciones, una estructura de cola incluye una combinación de colas de poli(A) y poli(C) con diversas longitudes descritas en este documento. En algunas realizaciones, una estructura de cola incluye al menos un 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de nucleótidos de adenosina. En algunas realizaciones, una estructura de cola incluye al menos un 50 %, 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de nucleótidos de citosina.

ARNm modificado

Un ARNm de CFTR puede contener solamente nucleótidos de origen natural (o nucleótidos no modificados). En algunas realizaciones, sin embargo, un ARNm de CFTR adecuado puede contener modificaciones en la cadena principal, modificaciones en los glúcidos y/o modificaciones en las bases. Por ejemplo, los nucleótidos modificados pueden incluir, aunque sin limitación, purinas modificadas (adenina (A), guanina (G)) o pirimidinas (timina (T), citosina (C), uracilo (U)), y análogos o derivados de nucleótidos modificados de purinas y pirimidinas, tales como, por ejemplo, 1-metil-adenina, 2-metil-adenina, 2-metiltio-N-6-isopentenil-adenina, N6-metil-adenina, N6-isopentenil-adenina, 2-tio-citosina, 3-metil-citosina, 4-acetil-citosina, 5-metil-citosina, 2,6-diaminopurina, 1-metil-guanina, 2-metil-guanina, 2,2-dimetil-guanina, 7-metil-guanina, inosina, 1-metil-inosina, pseudouracilo (5-uracilo), dihidro-uracilo, 2-tio-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tio-uracilo, 5-(carboxihidroximetil)-uracilo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-carboximetilaminometil-uracilo, 5-metil-2-tio-uracilo, 5-metil-uracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, 5-metilaminometil-uracilo, 5-metoxiaminometil-2-tio-uracilo, 5'-metoxycarbonilmetil-uracilo, 5-metoxi-uracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 1-metil-seudouracilo, queosina, .beta.-D-manosil-queosina, wybutoxosina y fosforamidatos, fosforotioatos, peptidonucleótidos, metilfosfonatos, 7-desazaguanosina, 5-metilcitosina e inosina. La preparación de dichos análogos es conocida por los expertos en la materia, por ejemplo, de la patente de Estados Unidos n.º 4.373.071, patente de Estados Unidos n.º 4.401.796, patente de Estados Unidos n.º 4.415.732, patente de Estados Unidos n.º 4.458.066, patente de Estados Unidos n.º 4.500.707, patente de Estados Unidos n.º 4.668.777, patente de Estados Unidos n.º 4.973.679, patente de Estados Unidos n.º 5.047.524, patente de Estados Unidos n.º 5.132.418, patente de Estados Unidos n.º 5.153.319, patente de Estados Unidos n.º 5.262.530 y 5.700.642.

En algunas realizaciones, los ARNm que codifican CFTR pueden contener modificaciones de la cadena principal de ARN. Típicamente, una modificación de la cadena principal es una modificación en que los fosfatos de la cadena principal de los nucleótidos contenidos en el ARN están modificados químicamente. Modificaciones de la cadena principal ejemplares típicamente incluyen, aunque sin limitación, modificaciones del grupo que consiste en metilfosfonatos, metilfosforamidatos, fosforamidatos, fosforotioatos (por ejemplo, 5'-O-(1-tiofosfato) de citidina), boranofosfatos, grupos guanidinio cargados positivamente, etc., que significa reemplazar el enlace fosfodiéster por otros grupos aniónicos, catiónicos o neutros.

En algunas realizaciones, los ARNm que codifican CFTR pueden contener modificaciones en los glúcidos. Una modificación de glúcidos típica es una modificación química del glúcido de los nucleótidos que lo contienen, incluyendo, aunque sin limitación, modificaciones en los glúcidos elegidas del grupo que consiste en 2'-desoxi-2'-fluoro-oligorribonucleótido (5'-trifosfato de 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, 5'-trifosfato de 2'-fluoro-2'-desoxiuridina), 2'-desoxi-2'-desamina-oligorribonucleótido (5'-trifosfato de 2'-amino-2'-desoxicitidina, 5'-trifosfato de 2'-amino-2'-desoxiuridina), 2'-O-alkiloligorribonucleótido, 2'-desoxi-2'-C-alkiloligorribonucleótido (5'-trifosfato de 2'-O-

metilcitidina, 5'-trifosfato de 2'-metiluridina), 2'-C-alquiloligorribonucleótido, e isómeros de los mismos (5'-trifosfato de 2'-aracitidina, 5'-trifosfato de 2'-arauridina), o azidotrifosfatos (5'-trifosfato de 2'-azido-2'-desoxicitidina, 5'-trifosfato de 2'-azido-2'-desoxiuridina).

5 En algunas realizaciones, los ARNm que codifican CFTR están sin modificar.

Vehículos de administración

10 De acuerdo con la presente invención, el ARNm que codifica una proteína CFTR como se describe en este documento puede administrarse como ARNm desnudo (sin empaquetar) o mediante vehículos de administración. Como se usa en este documento, la expresión "vehículo de administración", "vehículo de transferencia", "nanopartícula" o equivalente gramatical, se usan indistintamente.

15 Los vehículos de administración pueden formularse en combinación con uno o más ácidos nucleicos, vehículos, ligandos de dirección o reactivos estabilizantes adicionales, o en composiciones farmacológicas donde se mezclan con excipientes adecuados. Pueden encontrarse técnicas para formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición. Un vehículo de administración particular se selecciona en función de su capacidad de facilitar la transfección de un ácido nucleico a una célula diana.

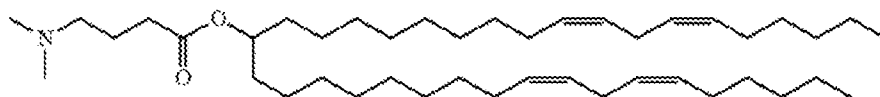
20 De acuerdo con diversas realizaciones, los vehículos de administración adecuados incluyen, aunque sin limitación, vehículos basados en polímero, tales como polietilenoimina (PEI), nanopartículas lipídicas (LNP) y liposomas, nanoliposomas, nanoliposomas que contienen ceramida, proteoliposomas, exosomas tanto naturales como derivados sintéticamente, cuerpos laminares naturales, sintéticos y semisintéticos, nanoparticulados, nanoparticulados de fosforosilicato de calcio, nanoparticulados de fosfato de calcio, nanoparticulados de dióxido de silicio, particulados nanocristalinos, nanoparticulados semiconductores, poli(D-arginina), soles-geles, nanodendrimeros, sistemas de administración basados en almidón, micelas, emulsiones, niosomas, copolímeros de bloque de multidominio (polímeros de vinilo, polímeros de ácido polipropil acrílico, policonjugados dinámicos), formulaciones en polvo seco, plásmidos, virus, nucleótidos de fosfato de calcio, aptámeros, péptidos y otras marcas vectoriales.

Vehículos de administración liposómicos

35 En algunas realizaciones, un vehículo de administración adecuado es un vehículo de administración liposómico, por ejemplo, una nanopartícula lipídica (LNP) o liposoma. En algunas realizaciones, los liposomas pueden comprender uno o más lípidos catiónicos. En algunas realizaciones, un liposoma comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, uno o más lípidos basados en colesterol y uno o más lípidos modificados con PEG. En algunas realizaciones, un liposoma comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, y uno o más lípidos modificados con PEG. En algunas realizaciones, un liposoma comprende no más de cuatro componentes lipídicos distintos. En algunas realizaciones, un liposoma comprende no más de tres componentes lipídicos distintos. En algunas realizaciones, un componente lipídico distinto es un lípido catiónico a base de esterol.

45 Como se usa en este documento, la expresión "lípidos catiónicos" se refiere a cualquiera de varias especies lipídicas y lipidoides que tienen una carga positiva neta a un pH seleccionado, tal como a pH fisiológico. Se han descrito varios lípidos catiónicos en la bibliografía, de los que muchos están disponibles en el mercado.

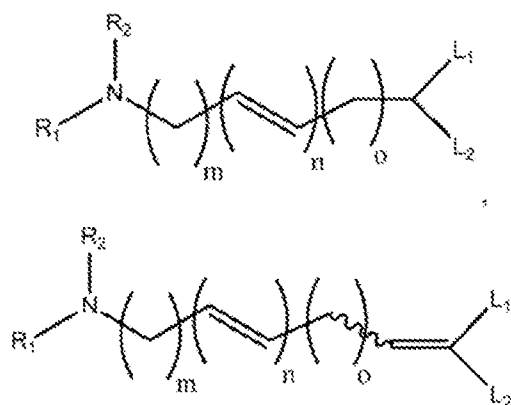
50 Los lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones descritas en este documento incluyen los lípidos catiónicos descritos en la publicación de patente internacional WO 2010/144740. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico, 4-(dimetilamino) butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo, que tiene una estructura de compuesto de:



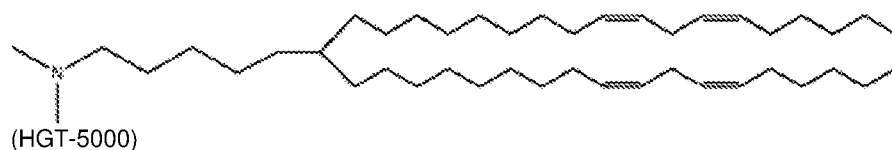
55 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen lípidos catiónicos ionizables como se describe en la publicación de patente internacional WO 2013/149140. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico de una de las siguientes fórmulas:

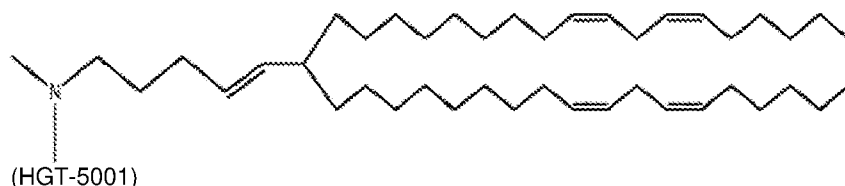
60



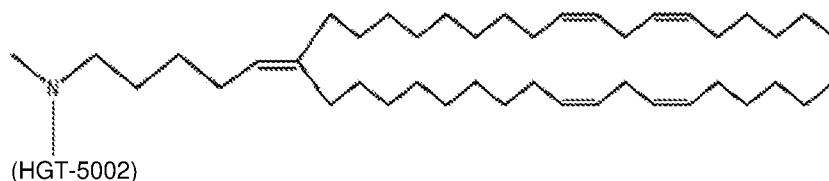
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo C_1 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado; en donde L_1 y L_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un alquilo C_1 - C_{30} opcionalmente sustituido, un alquénilo C_1 - C_{30} opcionalmente sustituido, variablemente insaturado, y un alquinilo C_1 - C_{30} opcionalmente sustituido; en donde m y o se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en cero y cualquier número entero positivo (por ejemplo, donde m es tres); y en donde n es cero o cualquier número entero positivo (por ejemplo, donde n es uno). En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen el lípido catiónico (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-15,18-dien-1-amina ("HGT5000"), que tiene una estructura de compuesto de:



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen el lípido catiónico (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)-tetracosa-4,15,18-trien-1-amina ("HGT5001"), que tiene una estructura de compuesto de:

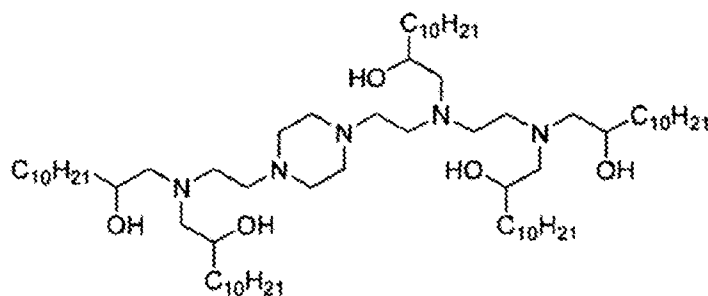


y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen el lípido catiónico (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)-tetracosa-5,15,18-trien-1-amina ("HGT5002"), que tiene una estructura de compuesto de:



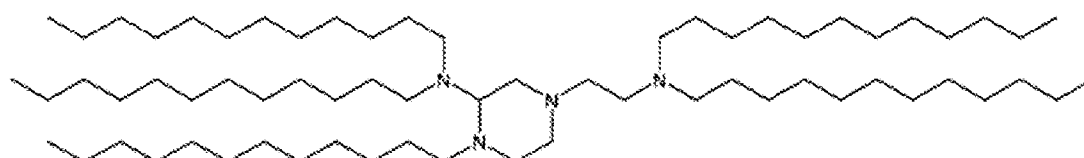
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos descritos como lipídicos de aminoalcohol en la publicación de patente internacional WO 2010/053572. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:



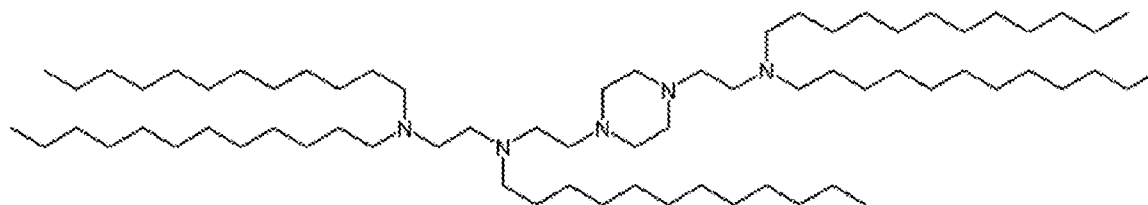
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 5 Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en la publicación de patente internacional WO 2016/118725. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:



- 10 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

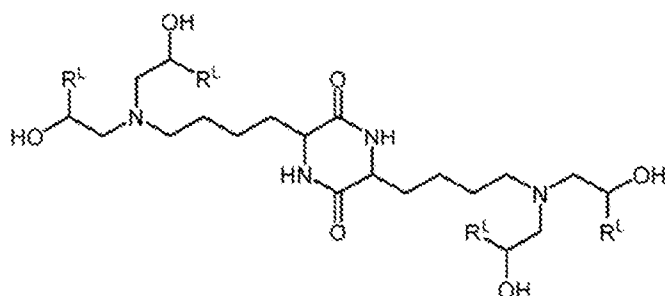
15 Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en la publicación de patente internacional WO 2016/118724. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:



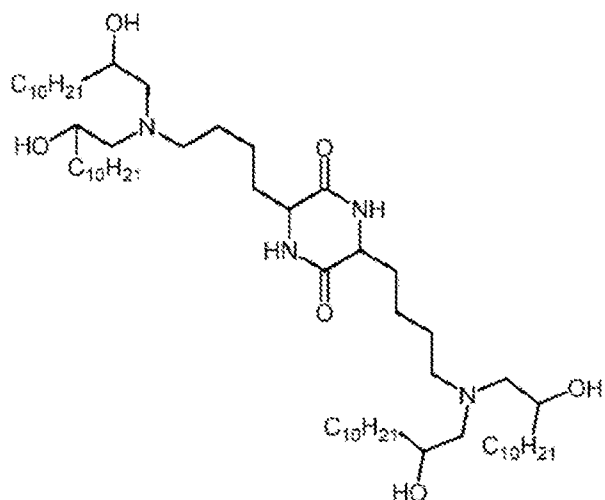
- 20 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen un lípido catiónico que tiene la fórmula de 14,25-ditridecil 15,18,21,24-tetraaza-octatriacontano, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

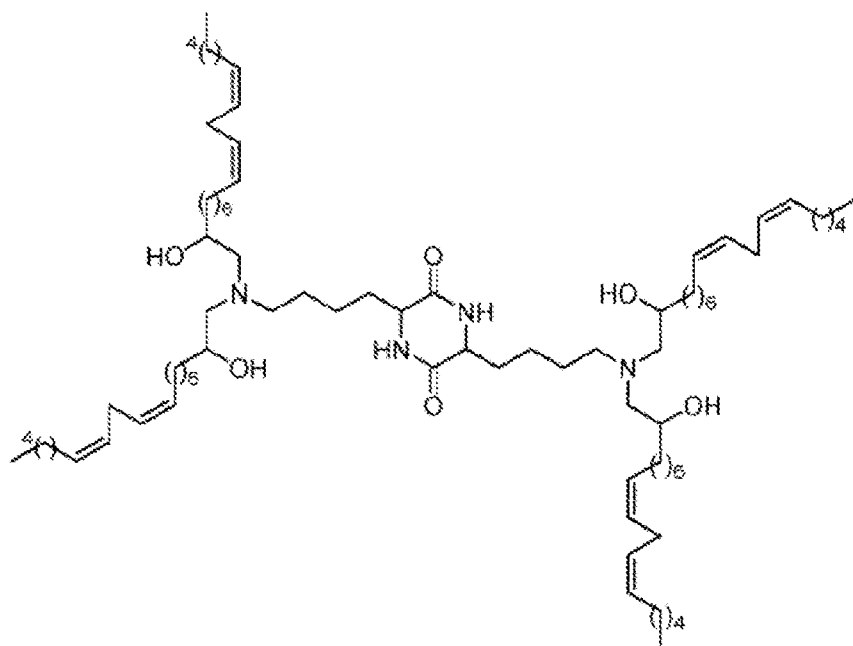
- 25 Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en las publicaciones de patente internacional WO 2013/063468 y WO 2016/205691. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico de la siguiente fórmula:



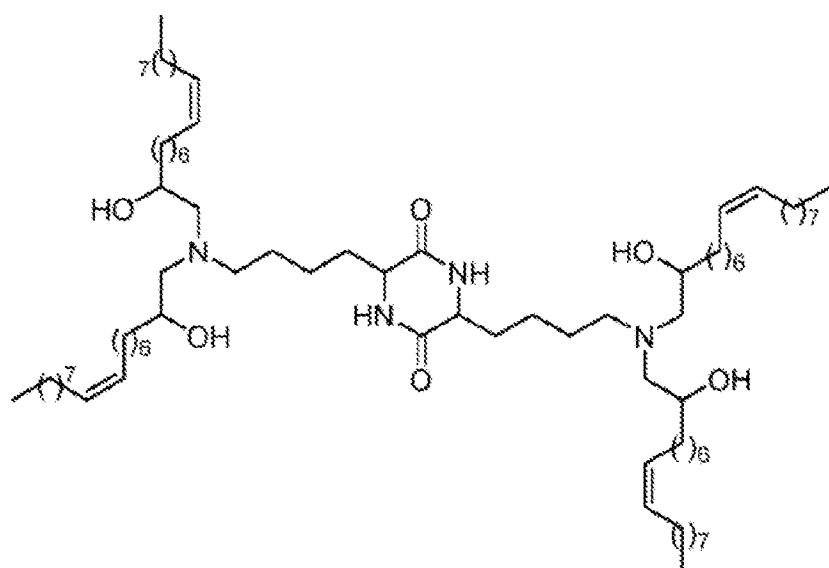
- 30 o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde cada caso de R^L es independientemente alqueno C_6 - C_{40} opcionalmente sustituido. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:



5 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:

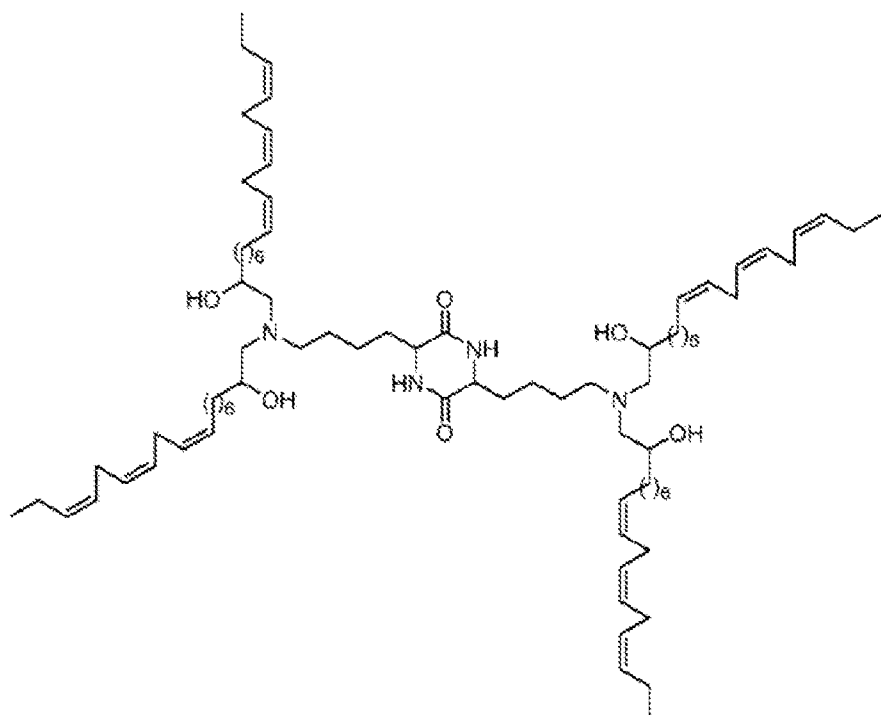


10 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:



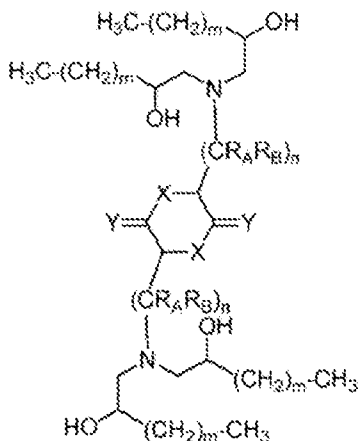
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:

5

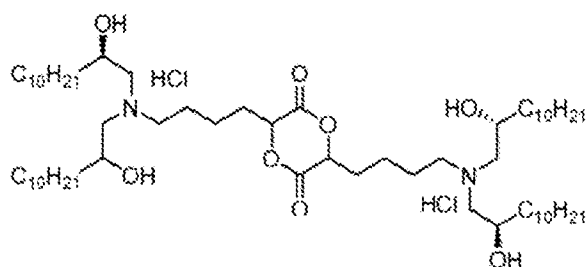


y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 10 Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en la publicación de patente internacional WO 2015/184256. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico de la siguiente fórmula:



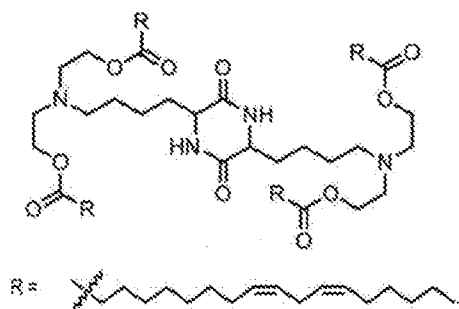
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada X es independientemente O o S; cada Y es independientemente O o S; cada m es independientemente 0 a 20; cada n es independientemente 1 a 6; cada R_A es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50 opcionalmente sustituido, alquenilo C2-50 opcionalmente sustituido, alquinilo C2-50 opcionalmente sustituido, carbocicilo C3-10 opcionalmente sustituido, heterocicilo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido, arilo C6-14 opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5-14 miembros opcionalmente sustituido o halógeno; y cada R_B es independientemente hidrógeno, alquilo C1-50 opcionalmente sustituido, alquenilo C2-50 opcionalmente sustituido, alquinilo C2-50 opcionalmente sustituido, carbocicilo C3-10 opcionalmente sustituido, heterocicilo de 3-14 miembros opcionalmente sustituido, arilo C6-14 opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5-14 miembros opcionalmente sustituido o halógeno. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico, "Target 23", que tiene una estructura de compuesto de:



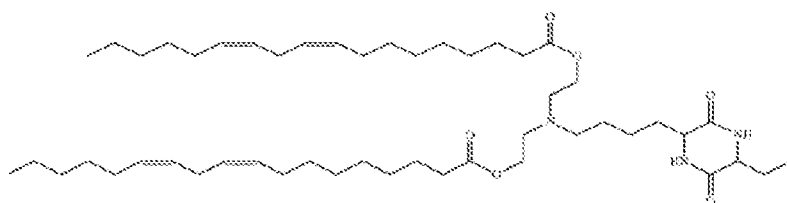
(Target 23)

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en la publicación de patente internacional WO 2016/004202. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

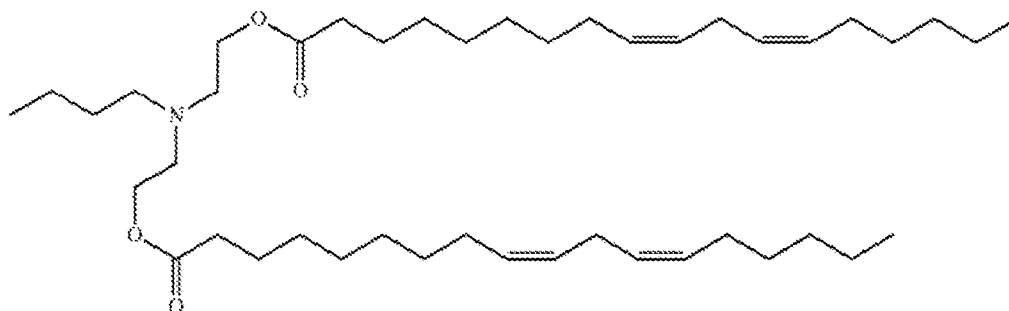


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:



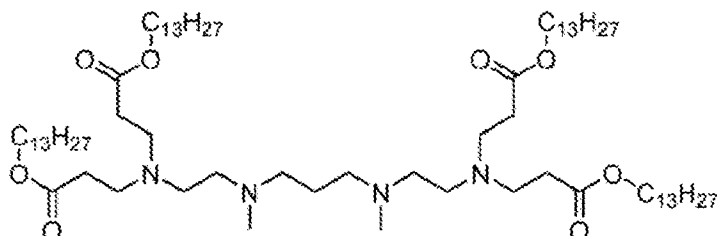
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

5



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

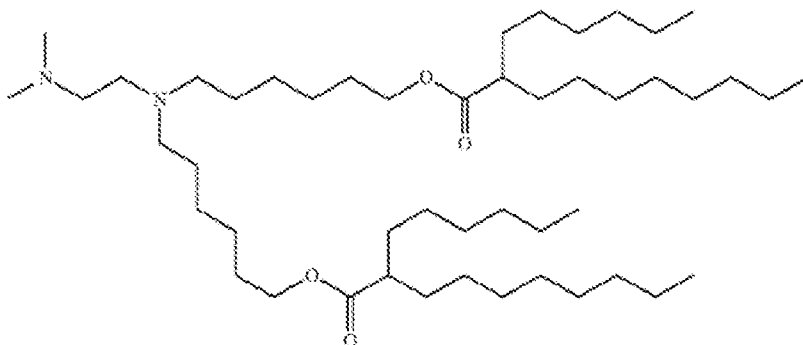
10 Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en J. McClellan, M. C. King, Cell 2010, 141, 210-217 y en Whitehead *et al.* Nature Communications (2014) 5:4277. En determinadas realizaciones, los lípidos catiónicos de las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:



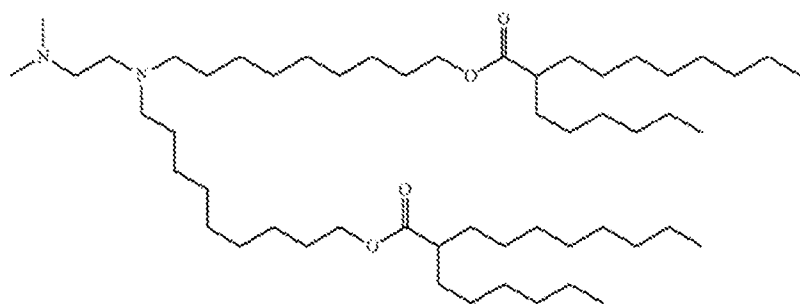
15

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

20 Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en la publicación de patente internacional WO 2015/199952. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

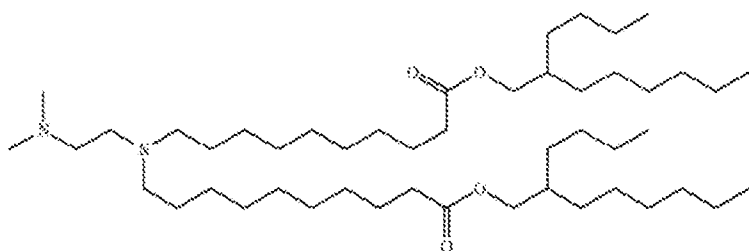


25 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:



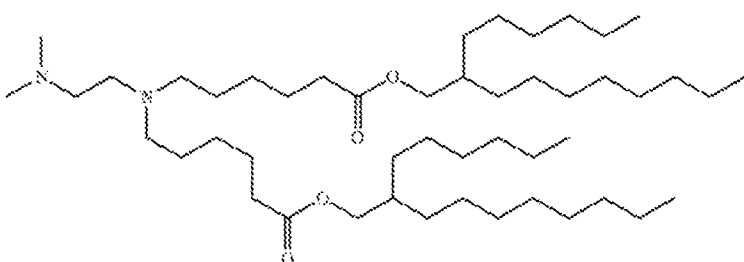
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

5



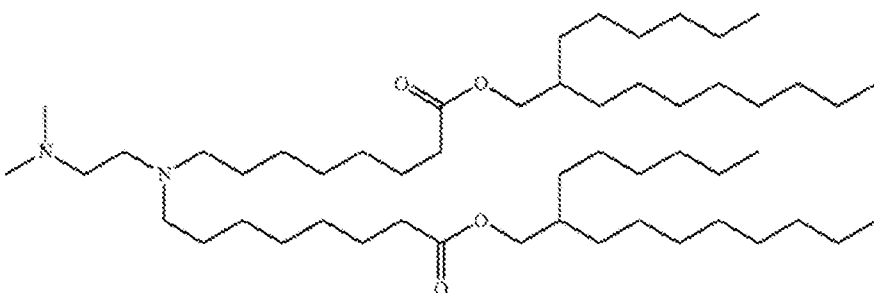
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

10



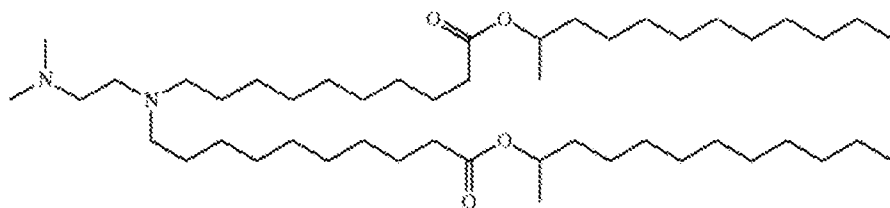
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

15



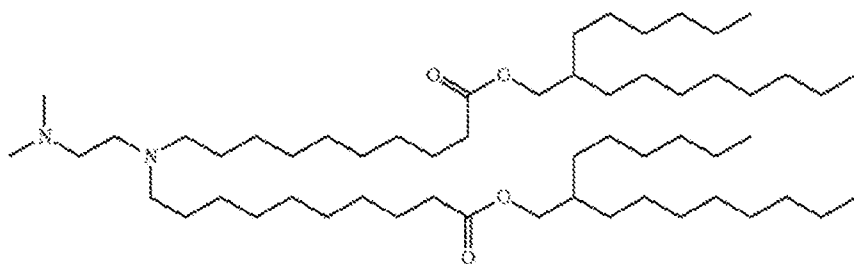
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

20



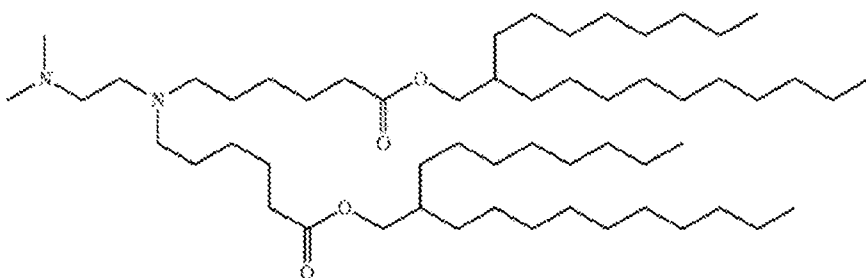
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

5



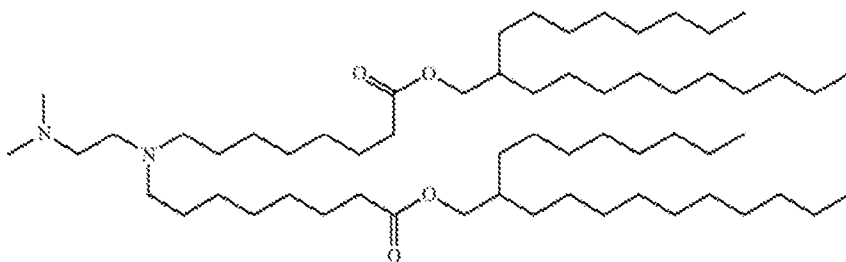
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

10



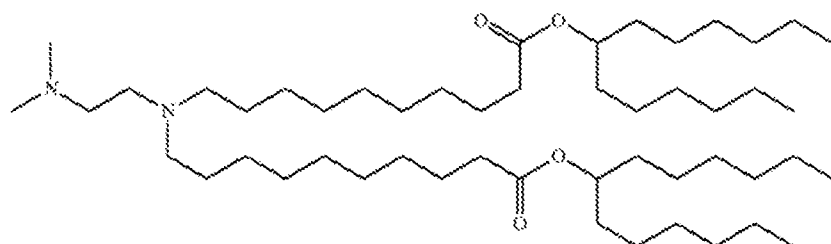
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

15

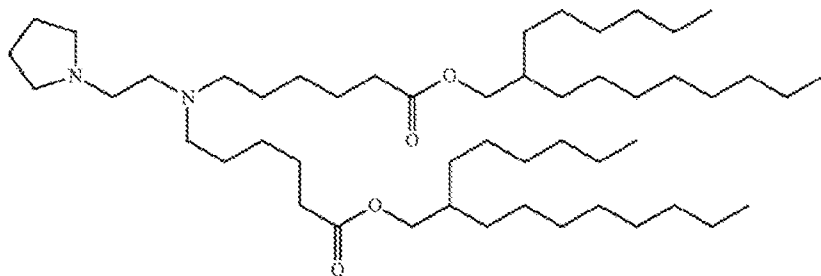


y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

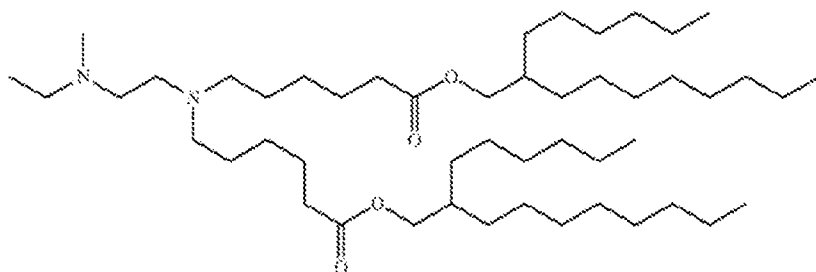
20



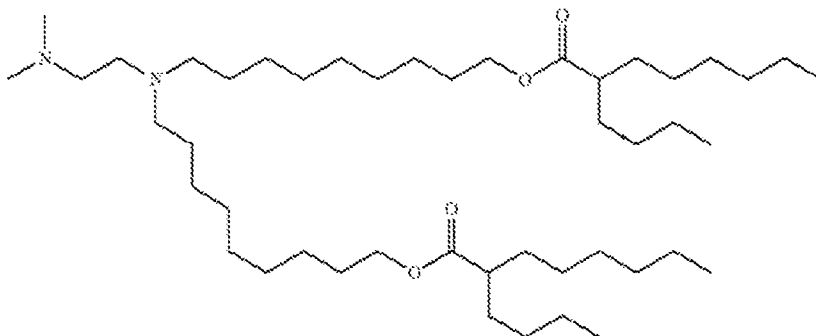
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:



5 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

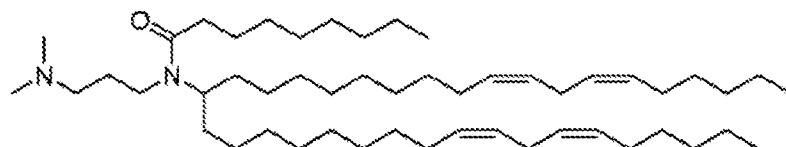


10 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

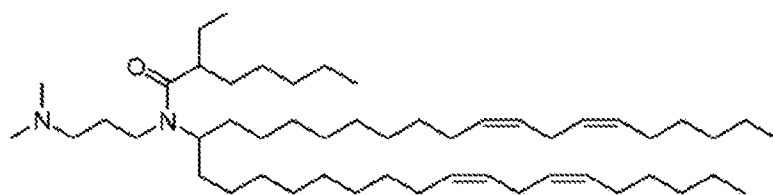


15 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en la publicación de patente internacional WO 2017/004143. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

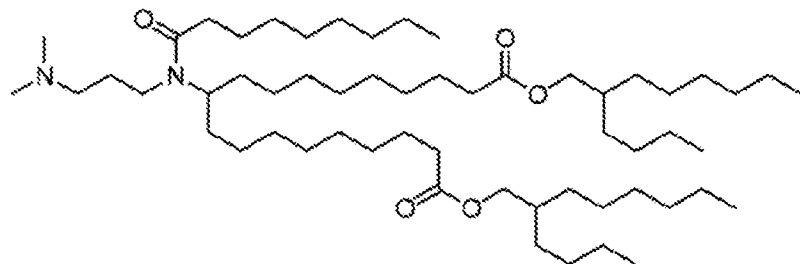


25 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:



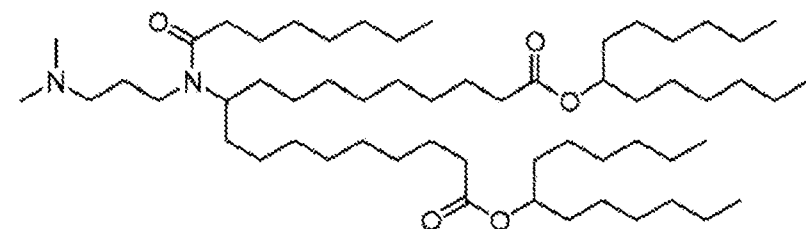
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

5



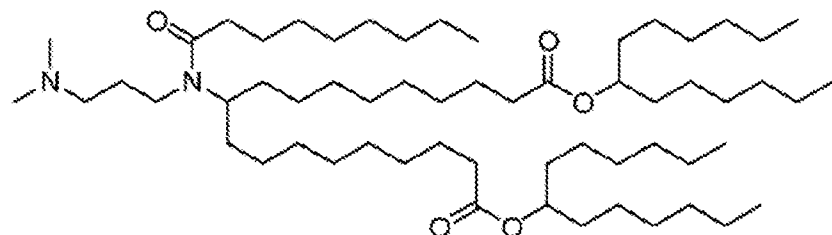
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

10



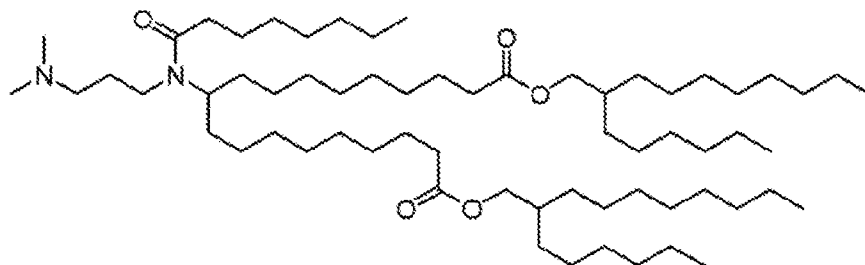
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

15



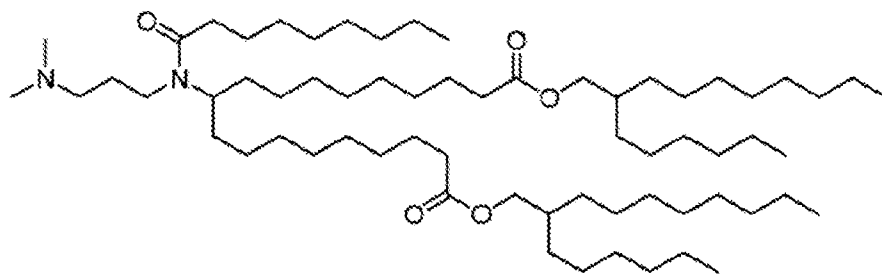
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

20



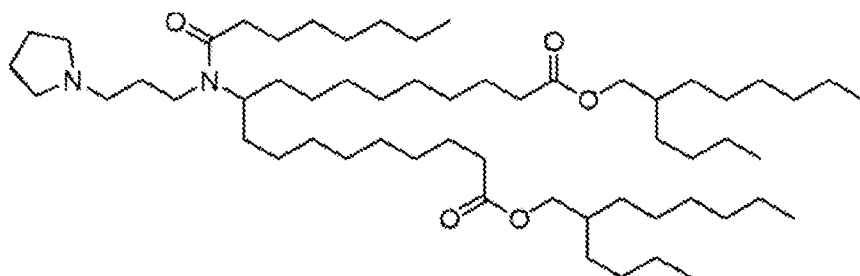
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

25



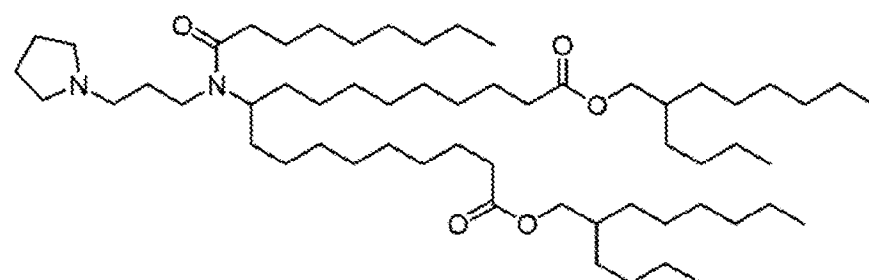
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

5



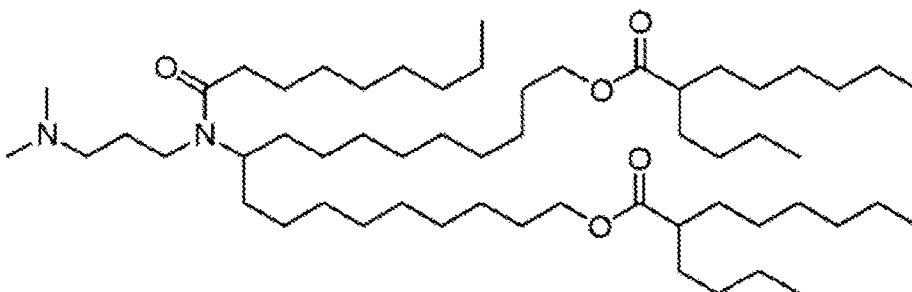
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

10



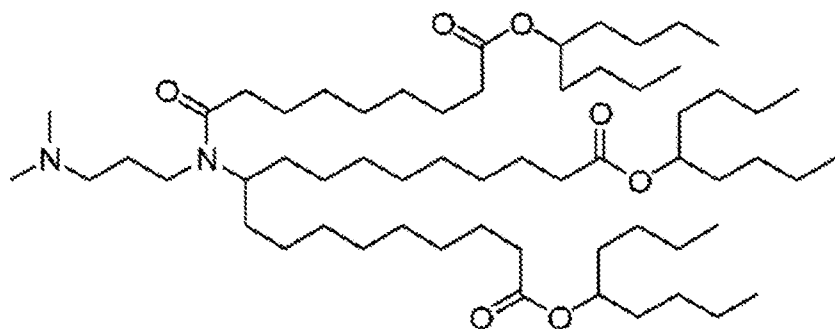
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

15



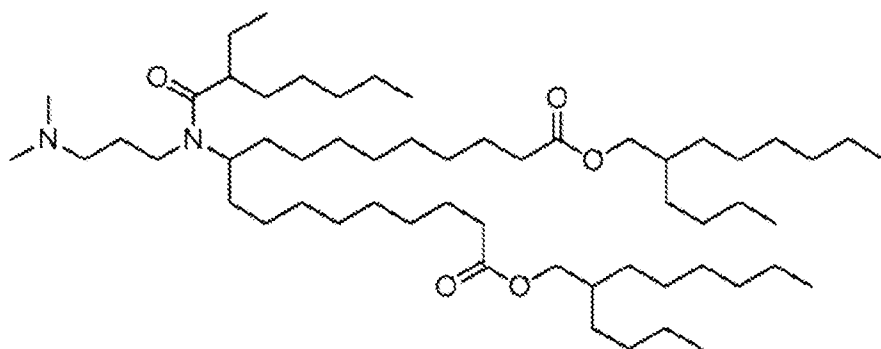
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

20



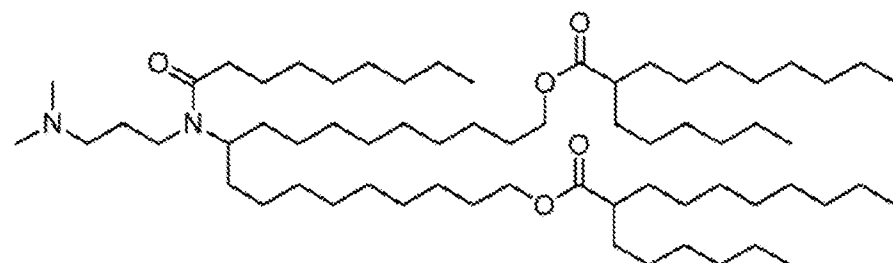
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

5



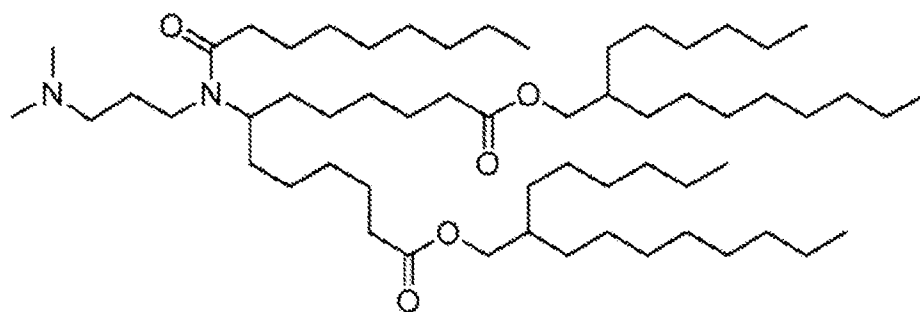
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

10



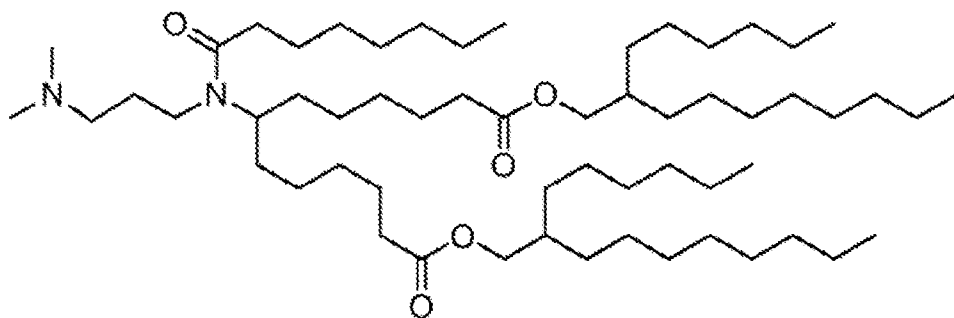
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

15



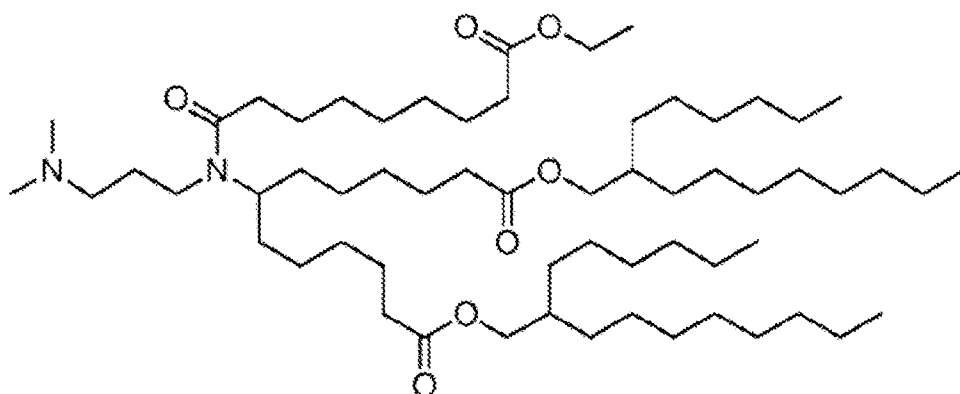
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

20



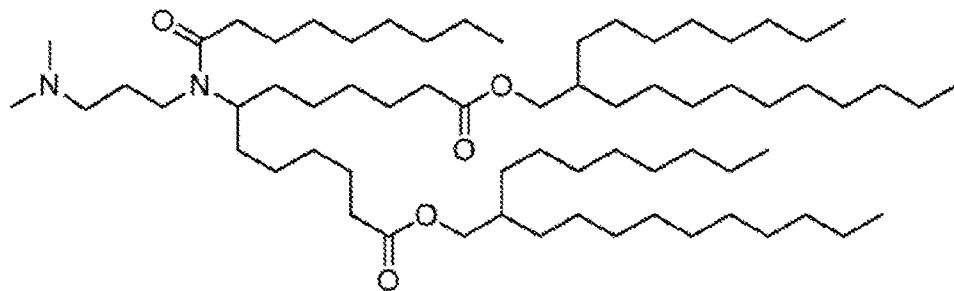
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

5



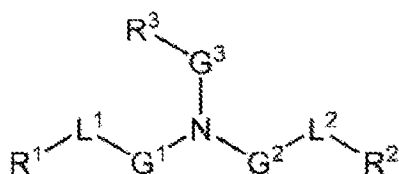
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

10



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 15 Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en la publicación de patente internacional WO 2017/075531. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico de la siguiente fórmula:

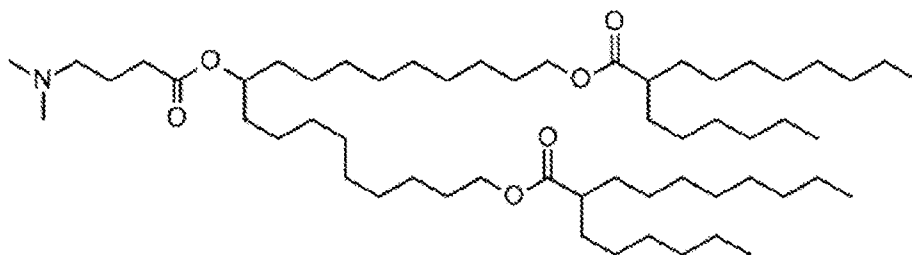


20

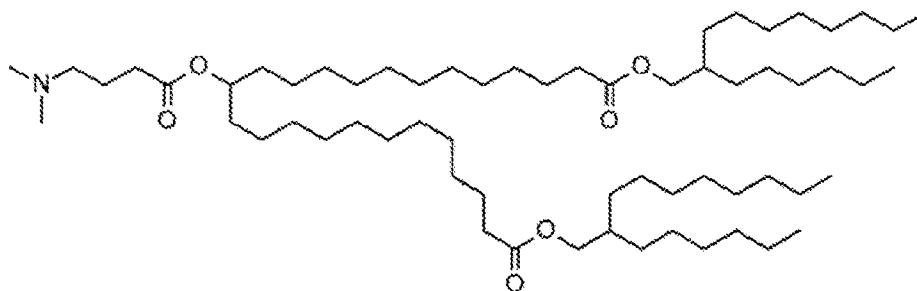
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde uno de L^1 o L^2 es $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ o $-NR^aC(=O)O-$; y el otro de L^1 o L^2 es $-O(C=O)-$, $-(C=O)O-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S(O)_x$, $-S-S-$, $-C(=O)S-$, $-SC(=O)-$, $-NR^aC(=O)-$, $-C(=O)NR^a-$, $NR^aC(=O)NR^a-$, $-OC(=O)NR^a-$ o $-NR^aC(=O)O-$ o un enlace directo; G^1 Y G^2 son cada uno independientemente

alquilenos C₁-C₁₂ o alquenilenos C₁-C₁₂ sin sustituir; G³ es alquilenos C₁-C₂₄, alquenilenos C₁-C₂₄, cicloalquilenos C₃-C₈, cicloalquenilenos C₃-C₈; R^a es H o alquilo C₁-C₁₂; R¹ y R² son cada uno independientemente alquilo C₆-C₂₄ o alquenilo C₆-C₂₄; R³ es H, OR⁵, CN, -C(=O)OR⁴, -OC(=O)R⁴ o -NR⁵C(=O)R⁴; R⁴ es alquilo C₁-C₁₂; R⁵ es H o alquilo C₁-C₆; y x es 0, 1 o 2.

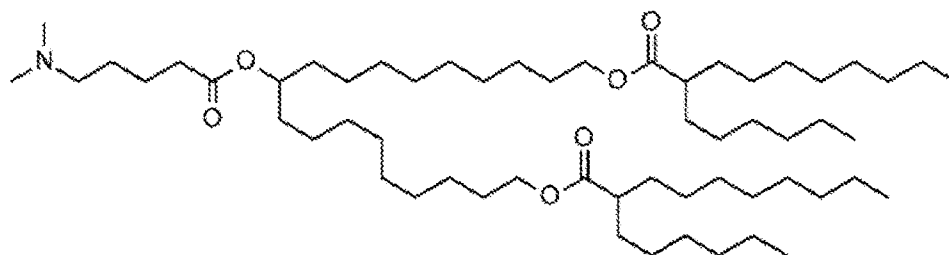
Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en la publicación de patente internacional WO 2017/117528. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

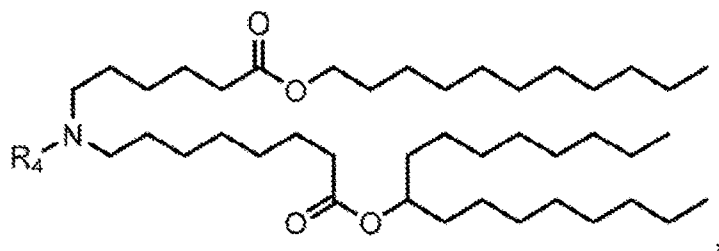
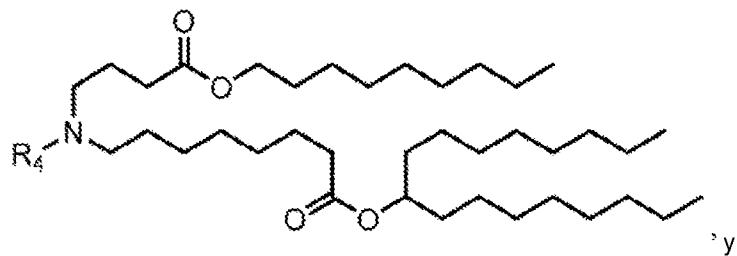
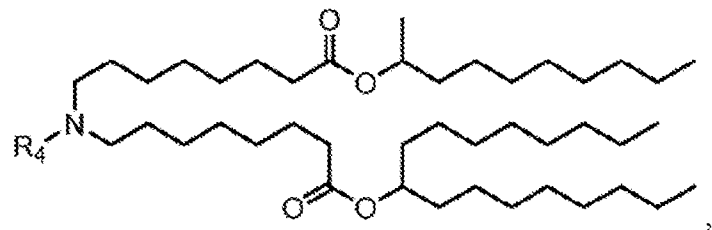
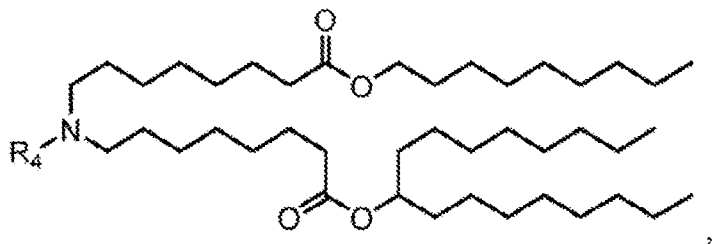


y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene la estructura de compuesto:

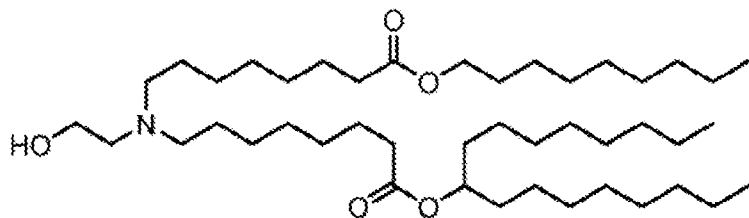


y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

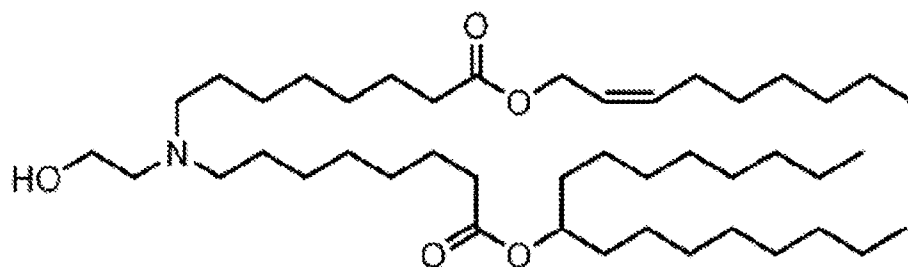
Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en la publicación de patente internacional WO 2017/049245. En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos de las composiciones de la presente invención incluyen un compuesto de una de las siguientes fórmulas:



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Para una cualquiera de estas cuatro fórmulas, R₄ se selecciona independientemente de -(CH₂)_nQ y -(CH₂)_nCHQR; Q se selecciona del grupo que consiste en -OR, -OH, -O(CH₂)_nN(R)₂, -OC(O)R, -CX₃, -CN, -N(R)C(O)R, -N(H)C(O)R, -N(R)S(O)₂R, -N(H)S(O)₂R, -N(R)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(R)₂, -N(H)C(O)N(H)(R), -N(R)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(R)₂, -N(H)C(S)N(H)(R), y un heterociclo; y n es 1, 2 o 3. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:

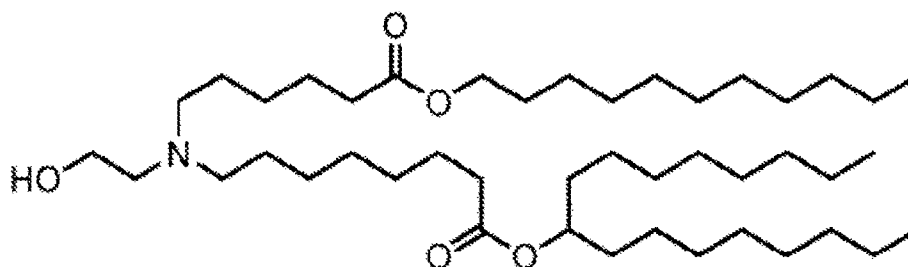


y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:



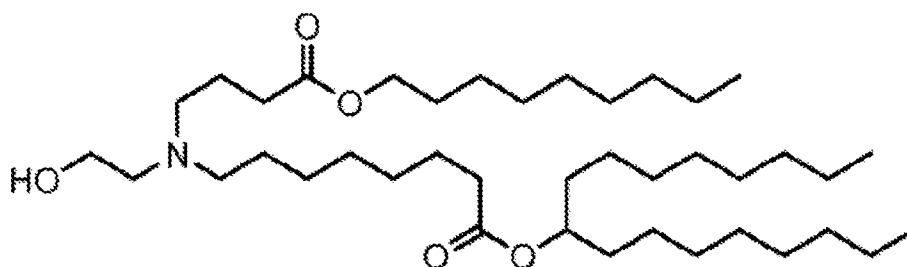
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:

5



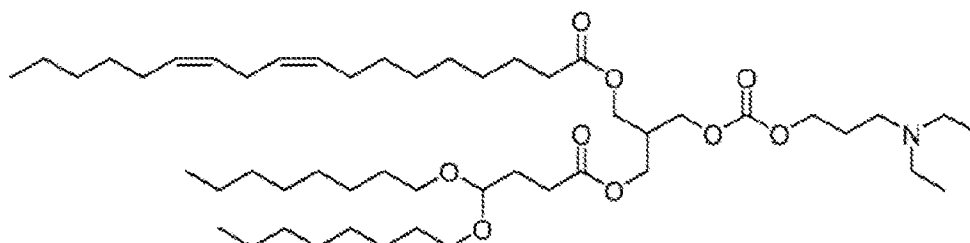
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:

10



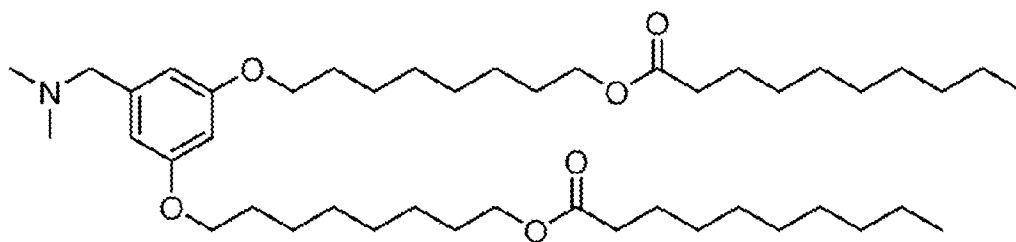
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen lípidos catiónicos como se describe en las publicaciones de patente internacional WO 2017/173054 y WO 2015/095340. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:



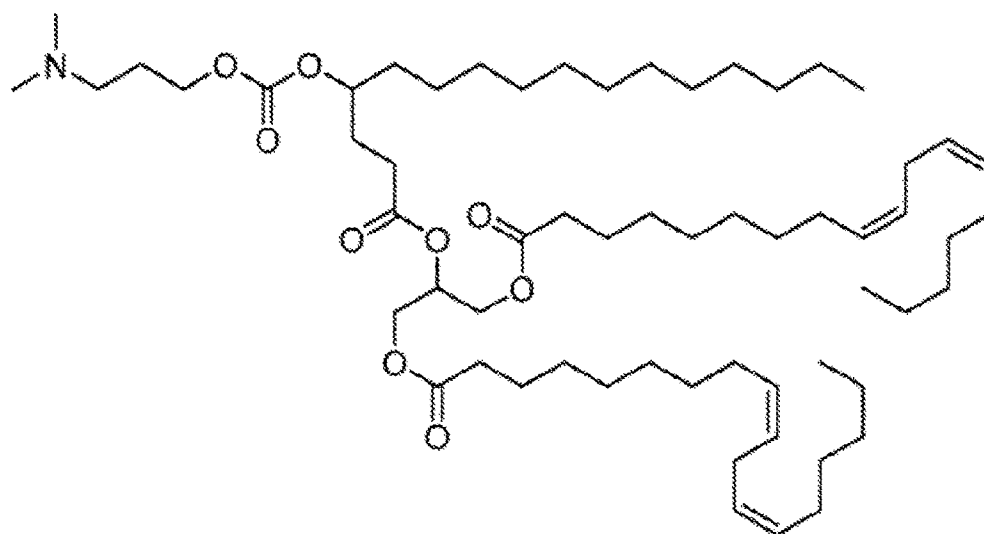
20

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:



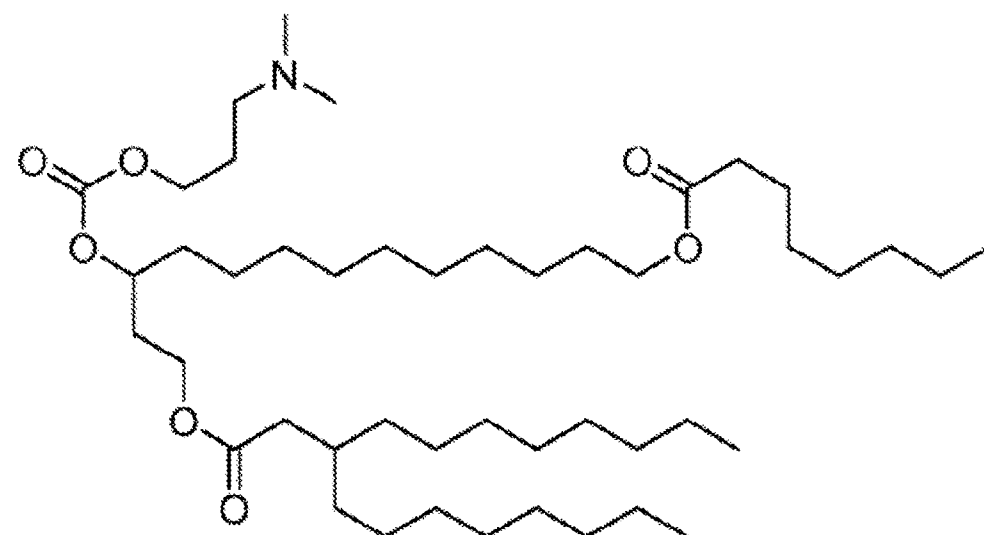
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:

5



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico que tiene una estructura de compuesto de:

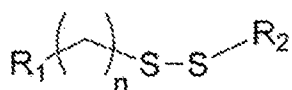
10



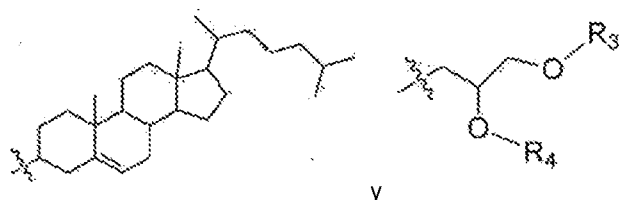
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15

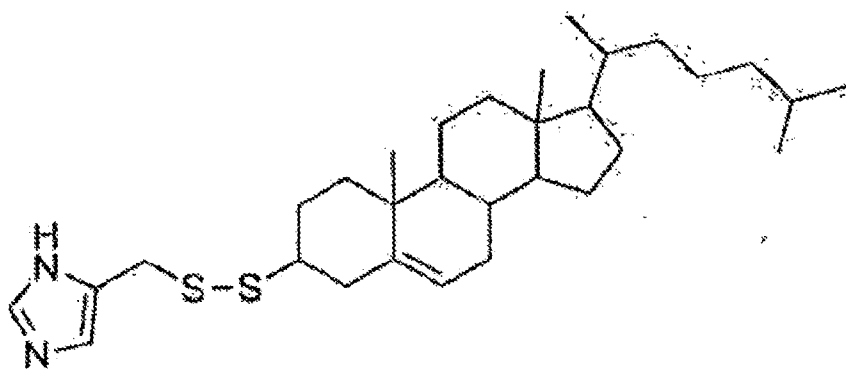
Otros lípidos catiónicos adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen lípidos catiónicos escindibles como se describe en la publicación de patente internacional WO 2012/170889. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico de la siguiente fórmula:



en donde R_1 se selecciona del grupo que consiste en imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, un alquilamino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquilamino tal como dimetilamino) y piridilo; en donde R_2 se selecciona del grupo que consiste en una de las siguientes dos fórmulas:

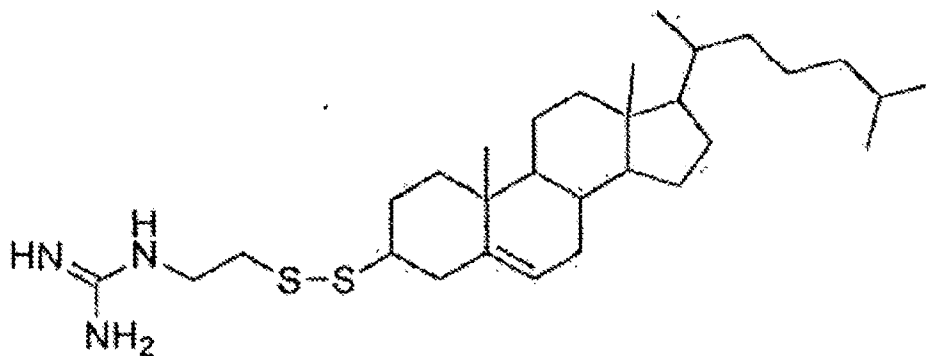


y en donde R_3 y R_4 se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en un alquilo C_6-C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6-C_{20} opcionalmente sustituido, variablemente saturado o insaturado; y en donde n es cero o cualquier número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico, "HGT4001", que tiene una estructura de compuesto de:



(HGT4001)

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico, "HGT4002", que tiene una estructura de compuesto de:



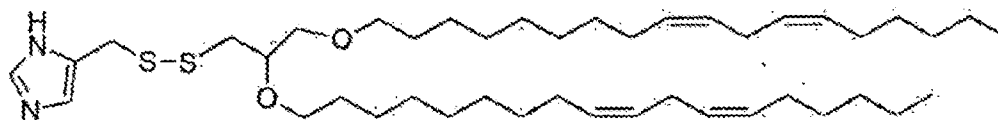
(HGT4002)

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico, "HGT4003", que tiene una estructura de compuesto de:



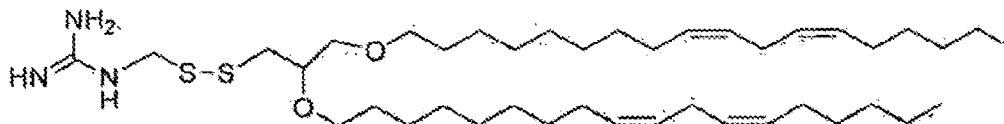
(HGT4003)

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico, "HGT4004", que tiene una estructura de compuesto de:



(HGT4004)

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En determinadas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen un lípido catiónico, "HGT4005", que tiene una estructura de compuesto de:



(HGT4005)

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen el lípido catiónico, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio ("DOTMA"). (Feigner *et al.* (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); patente de Estados Unidos n.º 4.897.355). Otros lípidos catiónicos adecuados para las composiciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, 5-carboxiespermilglicinadiotadecilamida ("DOGS"); 2,3-dioleiloxy-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio ("DOSPA") (Behr *et al.* Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989), patente de Estados Unidos n.º 5.171.678; patente de Estados Unidos n.º 5.334.761); 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano ("DODAP"); 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano ("DOTAP").

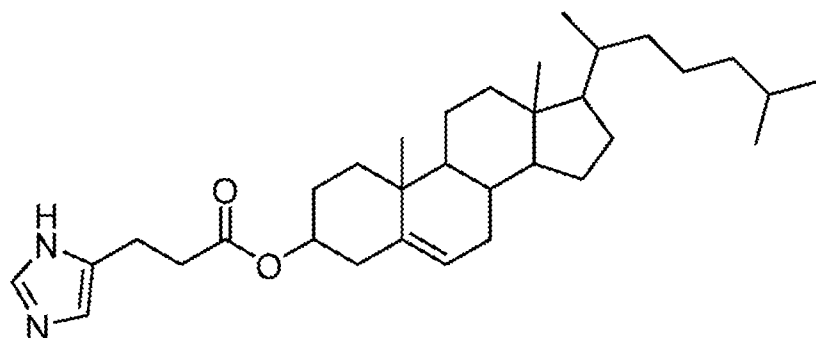
Lípidos catiónicos ejemplares adicionales adecuados para las composiciones de la presente invención también incluyen: 1,2-diesteariloxy-N,N-dimetil-3-aminopropano ("DSDMA"); 1,2-dioleiloxy-N,N-dimetil-3-aminopropano ("DODMA"); 1,2-dilinoileoxy-N,N-dimetil-3-aminopropano ("DLinDMA"); 1,2-dilinoilenioxy-N,N-dimetil-3-aminopropano ("DLinDMA"); cloruro de N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"); bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio ("DMRIE"); 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxy)propano ("CLinDMA"); 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',12'-octadecadienoxy)propano ("CpLinDMA"); N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina ("DMOBA"); 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano ("DOcarbDAP"); 2,3-dilinoileoxy-N,N-dimetilpropilamina ("DLinDAP"); 1,2-N,N'-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano ("DLincarbDAP"); 1,2-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano ("DLinCDAP"); 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano ("DLin-K-DMA"); 2-((8-[(3P)-colest-5-en-3-iloxi]octil)oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propano-1-amina ("octil-CLinDMA (2R)"); (2R)-2-((8-[(3beta)-colest-5-en-3-iloxi]octil)oxi)-N,N-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amina ("octil-CLinDMA (2R)"); (2S)-2-((8-[(3P)-colest-5-en-3-iloxi]octil)oxi)-N,fsl-dimetil-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi]propan-1-amina ("octil-CLinDMA (2S)"); 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano ("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, documento WO 2010/042877; Semple *et al.*, Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)). (Heyes, J., *et al.*, J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., *et al.*, Nat. Biotechnol. 23(8): 1003-1007 (2005); publicación de patente internacional WO 2005/121348). En algunas realizaciones, uno o más de los lípidos catiónicos comprenden al menos uno de un resto imidazol, dialquilamino o guanidinio.

En algunas realizaciones, uno o más lípidos catiónicos adecuados para las composiciones de la presente invención incluyen 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano ("XTC"); (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahydro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina ("ALNY-100") y/o 4,7,13-tris(3-oxo-3-(undecilamino)propil)-N1,N16-diundecil-4,7,10,13-tetraazahexadecano-1,16-diamida ("NC98-5").

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen uno o más lípidos catiónicos que constituyen al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o

70 %, medido en peso, del contenido total de lípidos en la composición, por ejemplo, una nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen uno o más lípidos catiónicos que constituyen al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o 70 %, medido como % molar, del contenido total de lípidos en la composición, por ejemplo, una nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen uno o más lípidos catiónicos que constituyen aproximadamente un 30-70 % (por ejemplo, aproximadamente un 30-65 %, aproximadamente un 30-60 %, aproximadamente un 30-55 %, aproximadamente un 30-50 %, aproximadamente un 30-45 %, aproximadamente un 30-40 %, aproximadamente un 35-50 %, aproximadamente un 35-45 % o aproximadamente un 35-40 %), medido en peso, del contenido total de lípidos en la composición, por ejemplo, una nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen uno o más lípidos catiónicos que constituyen aproximadamente un 30-70 % (por ejemplo, aproximadamente un 30-65 %, aproximadamente un 30-60 %, aproximadamente un 30-55 %, aproximadamente un 30-50 %, aproximadamente un 30-45 %, aproximadamente un 30-40 %, aproximadamente un 35-50 %, aproximadamente un 35-45 % o aproximadamente un 35-40 %), medido como % molar, del contenido total de lípidos en la composición, por ejemplo, una nanopartícula lipídica.

En algunas realizaciones, pueden usarse lípidos catiónicos a base de esteroles en lugar de o además de lípidos catiónicos descritos en este documento. Lípidos catiónicos a base de esteroles adecuados son lípidos catiónicos a base de esteroles que contienen dialquilamino, imidazol y guanidinio. Por ejemplo, determinadas realizaciones se refieren a una composición que comprende uno o más lípidos catiónicos a base de esteroles que comprenden un imidazol, por ejemplo, el éster de imidazol colesterol o lípido "ICE" 3-(1H-imidazol-4-il)propanoato de (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]fenantren-3-ilo, como se representa por la estructura (I) a continuación. En determinadas realizaciones, una nanopartícula lipídica para la administración de ARN (por ejemplo, ARNm) que codifica una proteína funcional puede comprender uno o más lípidos catiónicos a base de imidazol, por ejemplo, el éster de imidazol colesterol o lípido "ICE" 3-(1H-imidazol-4-il)propanoato de (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]fenantren-3-ilo, como se representa por la siguiente estructura:



(ICE)

En algunas realizaciones, el porcentaje de lípido catiónico en un liposoma puede ser mayor de un 10 %, mayor de un 20 %, mayor de un 30 %, mayor de un 40 %, mayor de un 50 %, mayor de un 60 % o mayor de un 70 %. En algunas realizaciones, el uno o más lípidos catiónicos constituyen aproximadamente un 30-50 % (por ejemplo, aproximadamente un 30-45 %, aproximadamente un 30-40 %, aproximadamente un 35-50 %, aproximadamente un 35-45 % o aproximadamente un 35-40 %) del liposoma en peso. En algunas realizaciones, el lípido catiónico (por ejemplo, lípido ICE) constituye aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 % o aproximadamente un 50 % del liposoma en relación molar.

Como se usa en este documento, la expresión "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido neutro, zwitteriónico o aniónico. Como se usa en este documento, la expresión "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de varias especies lipídicas que portan una carga negativa neta a un pH seleccionado, tal como pH fisiológico. Lípidos no catiónicos incluyen, aunque sin limitación, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), fosfatidilserina, esfingolípidos, cerebrosidos, gangliósidos, 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (SOPE), o una mezcla de los mismos.

En algunas realizaciones, dichos lípidos no catiónicos pueden usarse en solitario, pero se usan preferiblemente en combinación con otros lípidos, por ejemplo, lípidos catiónicos. En algunas realizaciones, el lípido no catiónico puede comprender una relación molar de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 90 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 70 % del lípido total presente en un liposoma. En algunas realizaciones, un lípido no

catiónico es un lípido neutro, es decir, un lípido que no porta una carga neta en las condiciones en las que se formula y/o administra la composición. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípido no catiónico en un liposoma puede ser mayor de un 5 %, mayor de un 10 %, mayor de un 20 %, mayor de un 30 % o mayor de un 40 %.

Lípidos catiónicos a base de colesterol adecuados incluyen, por ejemplo, DC-Choi (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 Estados Unidos n.º 5.744.335) o ICE. En algunas realizaciones, el lípido a base de colesterol puede comprender una relación molar de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 30 %, o de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % del lípido total presente en un liposoma. En algunas realizaciones, el porcentaje de lípido a base de colesterol en la nanopartícula lipídica puede ser mayor de un 5 %, mayor de un 10 %, mayor de un 20 %, mayor de un 30 % o mayor de un 40 %.

También se contempla por la presente invención el uso de fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG) y lípidos derivatizados tales como ceramidas derivatizadas (PEG-CER), incluyendo N-octanoil-esfingosina-1-[succinil(metoxipolietilenglicol)-2000] (C8 PEG-2000 ceramida), en solitario o preferiblemente en combinación con otras formulaciones lipídicas conjuntamente, que comprenden el vehículo de transferencia (por ejemplo, una nanopartícula lipídica). Lípidos modificados con PEG contemplados incluyen, aunque sin limitación, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud, unida covalentemente a un lípido con una o más cadenas alquilo de longitud C₆-C₂₀. La adición de dichos componentes puede evitar la agregación de complejos y también puede proporcionar un medio para aumentar el tiempo en circulación y aumentar la administración de la composición de lípido-ácido nucleico a los tejidos diana (Klibanov *et al.* (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), o pueden seleccionarse para intercambio rápidamente de la formulación *in vivo* (véase la patente de Estados Unidos n.º 5.885.613). Lípidos intercambiables particularmente útiles son PEG-ceramidas que tienen cadenas acilo más cortas (por ejemplo, C14 o C18). El fosfolípido modificado con PEG y lípidos derivatizados de la presente invención pueden comprender una relación molar de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 15 %, de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 10 % o aproximadamente un 2 % del lípido total presente en el vehículo de transferencia liposómico.

De acuerdo con diversas realizaciones, la selección de lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y/o lípidos modificados con PEG que comprenden la nanopartícula lipídica, así como la relación molar relativa de dichos lípidos entre sí, se basa en las características del lípido o lípidos seleccionados, la naturaleza de las células diana pretendidas, las características del ARNm a administrar. Consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena alquilo, así como el tamaño, carga, pH, pKa, capacidad fusogénica y toxicidad del lípido o lípidos seleccionados. Por tanto, las relaciones molares pueden ajustarse en consecuencia.

En algunas realizaciones, un vehículo de administración adecuado se formula usando un polímero como vehículo, en solitario o en combinación con otros vehículos, incluyendo diversos lípidos descritos en este documento. Por tanto, en algunas realizaciones, los vehículos de administración liposómicos, como se usan en este documento, también abarcan nanopartículas que comprenden polímeros. Polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliácridatos, polialquianoacrilatos, poliláctido, copolímeros de poliláctido-poliglicólido, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas, protamina, protamina PEGilada, PLL, PLL PEGilado y polietilenimina (PEI). Cuando está presente PEI, puede ser PEI ramificada de un peso molecular que varía de 10 a 40 kDa, por ejemplo, PEI ramificada de 25 kDa (Sigma n.º 408727).

Un liposoma adecuado para su uso con la presente invención puede incluir uno o más de cualquiera de los lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos, lípidos de colesterol, lípidos modificados con PEG y/o polímeros descritos en este documento a diversas relaciones. Como ejemplos no limitantes, una formulación liposómica adecuada puede incluir una combinación seleccionada de cKK-E12, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; ICE, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K; o ICE, DOPE y DMG-PEG2K.

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

En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos catiónicos a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos a base de colesterol a uno o más lípidos modificados con PEG puede ser entre aproximadamente 30-60:25-35:20-30:1-15, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos catiónicos a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos a base de colesterol a uno o más lípidos modificados con PEG es aproximadamente 40:30:20:10, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos catiónicos a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos a base de colesterol a uno o más lípidos

- modificados con PEG es aproximadamente 40:30:25:5, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos catiónicos a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos a base de colesterol a uno o más lípidos modificados con PEG es aproximadamente 40:32:25:3, respectivamente. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos catiónicos a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos a base de colesterol a uno o más lípidos modificados con PEG es aproximadamente 50:25:20:5. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos de esteroles a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos modificados con PEG es 50:45:5. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos de esteroles a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos modificados con PEG es 50:40:10. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos de esteroles a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos modificados con PEG es 55:40:5. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos de esteroles a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos modificados con PEG es 55:35:10. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos de esteroles a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos modificados con PEG es 60:35:5. En algunas realizaciones, la relación de uno o más lípidos de esteroles a uno o más lípidos no catiónicos a uno o más lípidos modificados con PEG es 60:30:10.
- En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para su uso con la presente invención comprende ICE y DOPE a una relación molar de ICE:DOPE de $>1:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de ICE:DOPE es $<2,5:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de ICE:DOPE es entre $1:1$ y $2,5:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de ICE:DOPE es aproximadamente $1,5:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de ICE:DOPE es aproximadamente $1,7:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de ICE:DOPE es aproximadamente $2:1$. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para su uso con la presente invención comprende ICE y DMG-PEG-2K a una relación molar de ICE:DMG-PEG-2K de $>10:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de ICE:DMG-PEG-2K es $<16:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de ICE:DMG-PEG-2K es aproximadamente $12:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de ICE:DMG-PEG-2K es aproximadamente $14:1$. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para su uso con la presente invención comprende DOPE y DMG-PEG-2K a una relación molar de DOPE:DMG-PEG-2K de $>5:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de DOPE:DMG-PEG-2K es $<11:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de DOPE:DMG-PEG-2K es aproximadamente $7:1$. En algunas realizaciones, la relación molar de DOPE:DMG-PEG-2K es aproximadamente $10:1$. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para su uso con la presente invención comprende ICE, DOPE y DMG-PEG-2K a una relación molar de ICE:DOPE:DMG-PEG-2K de $50:45:5$. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para su uso con la presente invención comprende ICE, DOPE y DMG-PEG-2K a una relación molar de ICE:DOPE:DMG-PEG-2K de $50:40:10$. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para su uso con la presente invención comprende ICE, DOPE y DMG-PEG-2K a una relación molar de ICE:DOPE:DMG-PEG-2K de $55:40:5$. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para su uso con la presente invención comprende ICE, DOPE y DMG-PEG-2K a una relación molar de ICE:DOPE:DMG-PEG-2K de $55:35:10$. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para su uso con la presente invención comprende ICE, DOPE y DMG-PEG-2K a una relación molar de ICE:DOPE:DMG-PEG-2K de $60:35:5$. En algunas realizaciones, un liposoma adecuado para su uso con la presente invención comprende ICE, DOPE y DMG-PEG-2K a una relación molar de ICE:DOPE:DMG-PEG-2K de $60:30:10$.
- Los vehículos de transferencia liposómicos para su uso en la invención pueden prepararse por diversas técnicas que son actualmente conocidas en la técnica. Se describen diversos métodos en la solicitud de Estados Unidos publicada n.º US 2011/0244026, la solicitud de Estados Unidos publicada n.º US 2016/0038432 y la solicitud de Estados Unidos provisional n.º 62/580.155, presentada el 1 de noviembre de 2017 y pueden usarse para poner en práctica la presente invención.
- En resumen, el proceso de preparación de nanopartículas lipídicas de ARNm de CFTR incluye una etapa de calentamiento de un primer conjunto de una o más soluciones con un primer conjunto de una o más soluciones (es decir, aplicar calor desde una fuente de calor a las soluciones) hasta una temperatura (o para mantener a una temperatura) mayor de la temperatura ambiente. El primer conjunto de una o más soluciones puede incluir una solución no acuosa que comprende los lípidos usados para formar la nanopartícula lipídica, y/o una solución que comprende nanopartículas lipídicas preformadas. El segundo conjunto de una o más soluciones puede incluir una solución acuosa del ARNm de CFTR y/o una solución que comprende el ARNm encapsulado en nanopartícula lipídica. En determinados casos, el proceso incluye una etapa de calentamiento hasta una temperatura (o para mantener a una temperatura) mayor de la temperatura ambiente de una primera solución que comprende nanopartículas lipídicas preformadas con una segunda solución acuosa que comprende ARNm de CFTR. En algunos casos, el proceso incluye la etapa de calentamiento de una o ambas de la solución de ARNm y la solución de nanopartícula lipídica preformada, antes de la etapa de mezcla. En algunos casos, el proceso incluye calentar una o más de la solución que comprende las nanopartículas lipídicas preformadas, la solución que comprende el ARNm y la solución que comprende el ARNm encapsulado en nanopartícula lipídica, durante la etapa de mezcla. En algunos casos, el proceso incluye la etapa de calentamiento del ARNm encapsulado en nanopartícula lipídica, después de la etapa de mezcla. En algunos casos, la temperatura a la que se calienta una o más de las soluciones (o a la que se mantiene una o más de las soluciones) es o es mayor de aproximadamente 30°C , 37°C , 40°C , 45°C , 50°C , 55°C , 60°C , 65°C o 70°C . En algunos casos, la temperatura a la que una o más de las soluciones se calienta varía de aproximadamente $25-70^{\circ}\text{C}$, aproximadamente $30-70^{\circ}\text{C}$, aproximadamente $35-70^{\circ}\text{C}$, aproximadamente $40-70^{\circ}\text{C}$, aproximadamente $45-70^{\circ}\text{C}$, aproximadamente $50-70^{\circ}\text{C}$ o aproximadamente $60-70^{\circ}\text{C}$. En algunos casos, la temperatura mayor de la temperatura ambiente a la que una o más de las soluciones se calienta es aproximadamente 65°C .

Para facilitar la expresión de ARNm *in vivo*, pueden formularse vehículos de administración tales como liposomas en combinación con uno o más ácidos nucleicos, vehículos, ligandos de dirección o reactivos estabilizantes adicionales, o en composiciones farmacológicas donde se mezclan con excipientes adecuados. Pueden encontrarse técnicas para formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición.

Como se usa en este documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se determina en gran medida en función de la cantidad total del agente terapéutico contenido en composiciones farmacéuticas. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para conseguir un beneficio significativo para el sujeto (por ejemplo, tratar, modular, curar, prevenir y/o mejorar la fibrosis quística). Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una cantidad suficiente para conseguir un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado.

De acuerdo con la invención, la composición que comprende un ARNm que codifica CFTR comprende ARNm a una concentración de al menos 0,4 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 0,5 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 0,6 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 0,7 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 0,8 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 0,9 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 1,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 2,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 3,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 4,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 5,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 6,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 7,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 8,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 9,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración de al menos 10,0 mg/ml. En algunas realizaciones, el ARNm que codifica una proteína CFTR está a una concentración que varía de 0,1 mg/ml a 10,0 mg/ml.

La composición que comprende el ARNm que codifica CFTR se formula con un diluyente seleccionado del grupo que consiste en DMSO, etilenglicol, glicerol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), propilenglicol, sacarosa y trehalosa. En algunas realizaciones, la formulación comprende un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % de diluyente.

Administración pulmonar

Un ARNm de CFTR para su uso con la presente invención se formula para administración pulmonar. Como se usa en este documento, administración pulmonar se refiere a administración al pulmón mediante, por ejemplo, la cavidad nasal, la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y/u otro sistema pulmonar. En realizaciones particulares, un ARNm de CFTR se formula para nebulización. En estas realizaciones, el vehículo de administración puede estar en una composición aerosolizada que puede inhalarse.

En algunas realizaciones, se forma polvo seco de ARNm de CFTR por liofilización del complejo de ARNm-lípido (véase la patente de Estados Unidos 9.717.690). El polvo seco liofilizado es adecuado para almacenamiento a largo plazo. Puede reconstituirse con agua purificada para administración a un sujeto que lo necesita. En determinadas realizaciones, tras la reconstitución con un medio de rehidratación apropiado (por ejemplo, agua purificada, agua desionizada, dextrosa al 5 %, trehalosa al 10 % y/o solución salina normal, la composición reconstituida demuestra actividad farmacológica o biológica comparable con la observada antes de la liofilización. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la actividad farmacológica y biológica de un polinucleótido encapsulado es equivalente a la observada antes de la liofilización de la composición; o como alternativa demuestra una reducción insignificante en la actividad farmacológica y biológica (por ejemplo, menos de aproximadamente un 1 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % de reducción en la actividad biológica o farmacológica de un polinucleótido encapsulado).

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden nanopartículas liofilizadas o vehículos de administración de nanopartículas lipídicas se caracterizan como estables (por ejemplo, como estables como composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo no liofilizado equivalente). La liofilización de las nanopartículas lipídicas no cambia apreciablemente o altera el tamaño de partículas de las nanopartículas lipídicas después de la liofilización y/o reconstitución. Por ejemplo, en este documento se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración lipídicos liofilizados, en donde, tras la reconstitución (por ejemplo, con agua purificada), las nanopartículas lipídicas no floculan o se agregan, o como alternativa demuestran floculación o agregación limitada o insignificante (por ejemplo, determinada por el tamaño de partículas de las

nanopartículas lipídicas reconstituidas).

Por consiguiente, en determinadas realizaciones, tras la reconstitución de una nanopartícula lipídica liofilizada, las nanopartículas lipídicas tienen un Dv_{50} de menos de aproximadamente 500 nm (por ejemplo, menos de aproximadamente 300 nm, 200 nm, 150 nm, 125 nm, 120 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o más pequeño). Asimismo, en determinadas realizaciones, tras la reconstitución de una nanopartícula lipídica liofilizada, las nanopartículas lipídicas tienen un Dv_{90} de menos de aproximadamente 750 nm (por ejemplo, menos de aproximadamente 700 nm, 500 nm, 300 nm, 200 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o más pequeño).

En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración lipídicos liofilizados se caracterizan por tener un índice de polidispersión de menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, menos de 0,95, 0,9, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,25, 0,2, 0,1, 0,05 o menos). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración lipídicos liofilizados demuestran una tendencia reducida a flocular o agregarse de otro modo (por ejemplo, durante la liofilización o tras reconstitución). Por ejemplo, tras la reconstitución, los vehículos de administración lipídicos pueden tener un tamaño de partícula promedio (Z_{ave}) de menos de 500 nm (por ejemplo, menos de aproximadamente 400 nm, 300 nm, 200 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o más pequeño en una solución de PBS).

En algunas realizaciones, los vehículos de administración lipídicos liofilizados (por ejemplo, nanopartículas lipídicas liofilizadas) comprenden además o se preparan, como alternativa, usando uno o más lioprotectores (por ejemplo, glúcidos y/o carbohidratos). En determinadas realizaciones, la inclusión de uno o más lioprotectores en la nanopartícula lipídica puede mejorar o potenciar de otro modo la estabilidad de los vehículos de administración lipídicos liofilizados (por ejemplo, en condiciones normales de almacenamiento) y/o facilitar la reconstitución de los vehículos de administración lipídicos liofilizados usando un medio de rehidratación, preparando de ese modo una formulación acuosa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las nanopartículas lipídicas se preparan y, antes de la liofilización, el tampón presente en la formulación liposómica puede remplazarse (por ejemplo, mediante centrifugación) con un lioprotector tal como una solución o suspensión de sacarosa (por ejemplo, una solución acuosa que comprende entre aproximadamente un 1-50 % o un 10-25 % de sacarosa). En algunas realizaciones, el lioprotector es trehalosa. En algunas realizaciones, el lioprotector comprende un 10-50 %, o un 10-25 %, o un 10-20 % o un 10-15 % de trehalosa. Otros lioprotectores que pueden usarse para preparar las composiciones liofilizadas descritas en este documento incluyen, por ejemplo, dextrano (por ejemplo, 1,5 kDa, 5 kDa y/o 40 kDa) e inulina (por ejemplo, 1,8 kDa y/o 4 kDa). Los vehículos de administración lipídicos liofilizados tienen una eficacia de encapsulación de más de aproximadamente 80 %.

Una composición farmacéutica que comprende una nanopartícula lipídica liofilizada que comprende ARNm que codifica CFTR es estable a 4 °C durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses o durante al menos 1 año. En algunas realizaciones, los vehículos de administración lipídicos liofilizados pueden almacenarse en refrigeración y permanecer estables (por ejemplo, como se demuestra por pérdidas mínimas o ausentes en su actividad farmacéutica o biológica pretendida) durante periodos prolongados de tiempo (por ejemplo, estables durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36 meses o más tras almacenamiento a aproximadamente 4 °C). En otras realizaciones, los vehículos de administración lipídicos liofilizados pueden almacenarse sin refrigeración y permanecer estables durante periodos prolongados de tiempo (por ejemplo, estables durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36 meses o más tras almacenamiento a aproximadamente 25 °C).

La composición farmacéutica en forma liofilizada puede almacenarse en estado congelado durante 1, 2, 3, 4, 5 o 10 años sin pérdida de actividad farmacológica o biológica.

Por consiguiente, también se contemplan en este documento composiciones para su uso en el tratamiento de enfermedades en un sujeto, al administrar una cantidad eficaz de composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración lipídicos liofilizados de ARNm de CFTR a un sujeto (por ejemplo, tras reconstitución con un medio de rehidratación tal como agua estéril para inyección).

En algunas realizaciones, la formulación se administra mediante un inhalador de dosis medida.

En algunas realizaciones, la formulación se administrar mediante un nebulizador.

La formulación de ARNm de CFTR adecuada para nebulización puede almacenarse como un líquido congelado, o líquido estéril, o polvo liofilizado o seco y reconstituirse antes de nebulización. En algunas realizaciones, la composición se almacena en un vial de un solo uso antes de la nebulización. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 50 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 40 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 30 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 20 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 10 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 9,0 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso

comprende 8,0 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 7,0 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 6,0 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 5,0 ml o menos de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende entre 4,0 ml y 5,0 ml de la composición. En algunas realizaciones, el vial de un solo uso comprende 3,2 ml de la composición.

En esta invención, la administración pulmonar implica inhalación (por ejemplo, para administración nasal, traqueal o bronquial). En algunas realizaciones, la formulación de ARNm de CFTR se nebuliza antes de la inhalación. La nebulización puede conseguirse mediante cualquier nebulizador conocido en la técnica. Un nebulizador transforma un líquido en una bruma de modo que pueda inhalarse más fácilmente en los pulmones. Los nebulizadores son eficaces para lactantes, niños y adultos. Los nebulizadores pueden nebulizar grandes dosis de medicamentos inhalados. Un tipo de nebulizador es un nebulizador de chorro, que comprende tubos conectados a un compresor, que provoca que aire u oxígeno comprimido fluya a una alta velocidad a través de un medicamento líquido para convertirlo en un aerosol, que después se inhala por el paciente. Otro tipo de nebulizador es el nebulizador de onda ultrasónica, que comprende un oscilador electrónico que genera una onda ultrasónica de alta frecuencia, que provoca la vibración mecánica de un elemento piezoeléctrico, que está en contacto con un depósito de líquido. La vibración de alta frecuencia del líquido es suficiente para producir una bruma de vapor. Nebulizadores de onda ultrasónica ejemplares son el Omron NE-U17 y el Beurer Nebulizer IH30. Un tercer tipo de nebulizador comprende tecnología de malla vibrante (VMT). La VMT comprende malla/membrana con 1000-7000 orificios que vibra en la parte superior de un depósito de líquido y de ese modo hace salir por presión una bruma de gotas muy finas a través de los orificios en la malla/membrana. Nebulizadores VMT ejemplares incluyen Pari eFlow, Respironics i-Neb, Beurer Nebulizer IH50, Aerogen Aeroneb y Philips InnoSpire Go.

En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen que varía de 13,0 ml a 42,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 13,9 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 16,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 18,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 20,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 22,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 24,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 26,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 27,9 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 30,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 32,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 34,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 36,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 38,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 40,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen de nebulización es a un volumen menor de o igual a 41,8 ml.

En algunas realizaciones, la duración de la nebulización varía de 1 minuto a 150 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 1 minuto. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 2 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 3 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 6 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 9 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 12 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 15 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 18 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 21 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 24 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 27 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 30 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 33 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 36 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 40 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 45 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 50 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 55 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 60 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 67 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 70 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 80 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 90 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 100 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 110 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 120 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 130 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 140 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la nebulización es menor de o igual a 150 minutos.

En algunas realizaciones, el número de nebulizadores usados durante una sola sesión de nebulización varía de 2-8. En algunas realizaciones, se usa 1 nebulizadores durante una sola sesión de nebulización. En algunas

realizaciones, se usan 2 nebulizadores durante una sola sesión de nebulización. En algunas realizaciones, se usan 3 nebulizadores durante una sola sesión de nebulización. En algunas realizaciones, se usan 4 nebulizadores durante una sola sesión de nebulización. En algunas realizaciones, se usan 5 nebulizadores durante una sola sesión de nebulización. En algunas realizaciones, se usan 6 nebulizadores durante una sola sesión de nebulización. En algunas realizaciones, se usan 7 nebulizadores durante una sola sesión de nebulización. En algunas realizaciones, se usan 8 nebulizadores durante una sola sesión de nebulización.

Eficacia terapéutica

De acuerdo con la presente invención, un ARNm de CFTR se administra a un paciente con CF que necesita tratamiento a una dosis terapéuticamente eficaz y un intervalo de administración durante un periodo de tratamiento suficiente para mejorar, estabilizar o reducir uno o más síntomas de fibrosis quística con respecto a un control. Los términos "tratar" o "tratamiento", como se usan en el contexto de fibrosis quística en este documento, se refieren a mejora de uno o más síntomas asociados con fibrosis quística, prevención o retardo de la aparición de uno o más síntomas de fibrosis quística, y/o reducción de la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas de fibrosis quística.

En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz de un ARNm de CFTR es o mayor de aproximadamente 2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg, 10 mg, 12 mg, 14 mg, 16 mg, 18 mg, 20 mg, 22 mg, 24 mg, 26 mg, 28 mg, 30 mg, 32 mg, 34 mg, 36 mg, 38 mg o 40 mg por dosis o equivalente de la misma. En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz de un ARNm de CFTR es o menos de aproximadamente 50 mg, 48 mg, 46 mg, 44 mg, 42 mg, 40 mg, 38 mg, 36 mg, 34 mg, 32 mg, 30 mg, 28 mg, 26 mg, 24 mg, 22 mg, 20 mg, 18 mg, 16 mg, 14 mg, 12 mg, 10 mg, 8 mg, 6 mg o 4 mg por dosis o equivalente de la misma. En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz de un ARNm de CFTR es aproximadamente 2-50 mg, 4-45 mg, 4-40 mg, 6-40 mg, 6-38 mg, 6-36 mg, 6-34 mg, 6-32 mg, 6-30 mg, 6-28 mg, 6-26 mg, 6-24 mg, 6-22 mg, 6-20 mg, 6-18 mg, 6-16 mg, 8-50 mg, 8-45 mg, 8-40 mg, 8-38 mg, 8-36 mg, 8-34 mg, 8-32 mg, 8-30 mg, 8-28 mg, 8-26 mg, 8-24 mg, 8-22 mg o 8-20 mg por dosis o equivalente de la misma.

En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz de un ARNm de CFTR se administra diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, mensualmente, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses.

En algunas realizaciones, una dosis terapéuticamente eficaz de un ARNm de CFTR se administra durante un periodo de al menos dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, doce meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o 10 años.

En algunas realizaciones, un ARNm de CFTR se administra en combinación con uno o más potenciadores y/o correctores de CFTR. En algunas realizaciones, un ARNm de CFTR se administra en combinación con uno o más potenciadores de CFTR. En algunas realizaciones, un ARNm de CFTR se administra en combinación con uno o más correctores de CFTR. Potenciadores y/o correctores de CFTR adecuados incluyen ivacaftor (nombre comercial Kalydeco), lumacaftor (en una combinación con ivacaftor vendida con el nombre comercial Orkambi) o la combinación de ivacaftor y lumacaftor. Correctores adecuados adicionales incluyen tezacaftor, VX-659 y VX-445. En algunas realizaciones, un ARNm de CFTR se administra en combinación con uno o más tratamientos para CF diferentes, tales como hormonoterapias de remplazo, hormonoterapia de remplazo tiroideo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y dronabinol con receta (MARINOL) durante el tratamiento.

En algunas realizaciones, pueden administrarse potenciadores y/o correctores de CFTR y/u otros tratamientos para fibrosis quística antes de, simultáneamente con o posterior a la administración de un ARNm de CFTR de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, pueden administrarse potenciadores y/o correctores de CFTR y/u otros tratamientos para fibrosis quística 1 hora o más, 2 horas o más, 4 horas o más, 6 horas o más, 8 horas o más, 10 horas o más, 12 horas o más, 18 horas o más, 24 horas o más, 36 horas o más, 48 horas o más, 72 horas o más, 1 semana o más, 2 semanas o más, 3 semanas o más, o 1 mes o más antes o después de la administración de un ARNm de CFTR de acuerdo con la invención.

Ejemplos

Aunque determinados compuestos, composiciones y métodos de la presente invención se han descrito con especificidad de acuerdo con determinadas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven únicamente para ilustrar los compuestos de la invención y no pretenden limitar la misma.

Ejemplo 1. Formulación de composición de ARNm/liposoma

Se sintetizó el ARN mensajero del regulador de la conductancia transmembranaria en fibrosis quística (CFTR) humano con codones optimizados por transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN plasmídico que codifica el gen, que estuvo seguido de la adición de una estructura de capuchón 5' (Cap 1) (Fechter, P.; Brownlee, G.G.

"Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins" J. Gen. Virology 2005, 86, 1239-1249) y una cola de poli(A) 3' de aproximadamente 250 nucleótidos de longitud determinadas por electroforesis en gel. El ARNm que codifica la proteína CFTR también comprendía regiones no traducidas (UTR) 5' y 3'.

- 5 Una solución de base acuosa que comprendía el ARNm ejemplar que codifica la proteína CFTR se combinó con una solución lipídica a base de etanol, se aisló y se dializó en la formulación final apropiada para almacenamiento a -80 °C.

10 La solución lipídica contenía tres componentes lipídicos para formar nanopartículas lipídicas. Los tres componentes biodegradables contribuyeron todos a las características del producto farmacéutico final. El primer componente era el lípido ionizable, éster de imidazol colesterol (ICE). Esto produjo un entorno cargado positivamente a bajo pH que facilita la encapsulación eficaz del ARNm cargado negativamente. También puede desempeñar una función clave en la interacción de superficie celular para permitir la captación celular. El segundo componente de la LNP fue 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE). DOPE es un lípido zwitteriónico que se ha informado que tiene propiedades fusogénicas para potenciar la captación y liberación de la carga de fármaco. El componente final fue un lípido PEGilado (es decir, modificado con PEG) conocido como 1,2-dimiristoil-sn-glicerol, metoxipoliétilenglicol (DMG-PEG-2K). La adición de este lípido PEGilado proporcionó control sobre el tamaño de partícula y la estabilidad de la nanopartícula y puede proporcionar propiedades mucopenetrantes potenciadas para la captación pulmonar. La relación de carga nominal de nitrógeno/fósforo (N/P) de la LNP fue 4 y el intervalo de tamaño de partícula promedio para el ARNm encapsulado en la LNP fue 40-60 nm.

Ejemplo 2. Dosificación de composición de ARNm de CFTR/liposoma

25 Estos estudios evaluaron una composición de ARNm de CFTR/liposoma en un modelo de rata Sprague-Dawley. No se observaron efectos adversos en el sistema nervioso central (SNC), sistema cardiovascular (CV) o la respiración.

Evaluaciones del SNC

30 Se realizaron evaluaciones neuroconductuales en 6 machos/grupo antes de la dosificación y el día 1 (4 y 24 horas después de la dosificación). Se midieron la temperatura, humedad, nivel de ruido e iluminación de cada estancia y se registraron para garantizar que las variaciones en las condiciones del entorno eran mínimas durante todas las evaluaciones. No hubo efectos sobre el neurocomportamiento relacionados con el tratamiento con liposomas a base de ICE cargados con ARNm de hCFTR o control de vehículo liposómico a base de ICE a dosis inhaladas de hasta 6,70 mg/kg de liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR.

Evaluaciones cardiovasculares

40 A ratas Sprague-Dawley macho (n = 5/grupo), a las que se les había implantado previamente dispositivos de telemetría, se les dosificó mediante inhalación solamente por la nariz liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR durante hasta 6 horas a dosis diana de 0 (control de solución salina al 0,9 %) o 0,7, 3,75 o 6,4 mg/kg de liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR o control de vehículo liposómico a base de ICE (LNP que no contiene ARNm suspendida en una solución que contiene trehalosa al 10 %) (dosis conseguidas de 0, 0,86, 3,52, 6,02 o 0 mg/kg, respectivamente). Para dosis diana a 0,7 y 3,75 mg/kg, se administró aire después del final de la exposición para hacer que el tiempo retenido total fuera equivalente entre todas las dosis. Cada día de dosis estuvo seguido de un periodo mínimo de reposo farmacológico de 7 días. Todos los animales se devolvieron a la colonia tras completarse todas las evaluaciones.

50 Los parámetros de telemetría incluyeron parámetros cardiovasculares (presión sistólica, diastólica, sanguínea media, presión diferencial, ritmo cardíaco y parámetros electrocardiográficos [PR, QRS, QT, QTc]), actividad y temperatura corporal. Otros parámetros evaluados durante el estudio fueron la viabilidad, observaciones clínicas y peso corporal. Las concentraciones de aerosol medias y las dosis administradas totales estimadas de liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR y vehículo liposómico a base de ICE (lípido total) se resumen en la tabla 3.

55 Tabla 3. Concentraciones medias de liposoma cargado de ARNm de hCFTR y aerosol de liposoma y dosis administradas totales estimadas

Liposoma cargado de ARNm de hCFTR		Liposoma cargado de ARNm de hCFTR	
Concentración de aerosol (µg/l)		Dosis administrada (mg/kg)	
Tratamiento	Conseguida	Duración de la exposición (min)	Media conseguida ^a
Control	0	360	0
Vehículo	0	360	0
Bajo	30,5	40	0,86
Medio	23,7	210	3,52
Alto	23,7	360	6,02

^a Media global de cada animal individual para cada grupo de tratamiento. Esta dosis refleja la dosis administrada total de ARNm de hCFTR.

Además de este estudio en ratas, también se realizaron evaluaciones cardiovasculares similar como estudios de dosis repetida en ratas y monos. En esos estudios de dosis repetida, no se observaron efectos relacionados con el artículo de ensayo en ningún parámetro CV evaluado hasta las dosis más altas evaluadas (6,7 mg/kg en ratas y 0,691 mg/kg en monos).

Evaluaciones respiratorias

Se evaluaron los efectos respiratorios de liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR como parte de los estudios de una sola dosis y de dosis repetida en ratas y monos. Se observó un aumento en el volumen respiratorio por minuto después de la administración por inhalación de liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR a ratas Sprague-Dawley, así como la frecuencia respiratoria y el volumen corriente, en todos los grupos de dosis hasta 6,4 mg/kg de liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR, así como en controles de trehalosa al 10 %.

No se observaron efectos en los parámetros respiratorios, incluyendo la frecuencia respiratoria, el volumen corriente y el volumen respiratorio por minuto derivado después de administración por inhalación de liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR a ratas Sprague-Dawley a dosis repetidas de hasta 6,7 mg/kg o macacos cangrejeros a dosis individuales o repetidas de hasta 0,85 mg/kg o 0,691 mg/kg, respectivamente.

Hay preocupación mínima respecto a ICE, DOPE y DMG-PEG 2000 como componentes de la composición desarrollada para administración por inhalación. En una evaluación de genotoxicidad *in silico*, se prevé que ICE sea negativo para la capacidad mutagénica bacteriana. Esto es coherente con los datos negativos de capacidad mutagénica/genotoxicidad que están disponibles para imidazol y ácido propiónico, los 2 componentes del resto de ácido imidazolpropiónico de ICE, y para colesterol. DOPE es una variante del glicerofosfolípido, fosfatidiletanolamina, que es un componente del tensioactivo pulmonar. Se esperaría que la degradación de DOPE siguiera una ruta similar a la de otros glicerofosfolípidos, con la formación final de etanolamina y ácido oleico, que están ambos presentes en la circulación en lactantes y adultos. Se prevé que DMG PEG 2000 tendrá baja toxicidad en función de la información para los productos de descomposición metabólica previstos PEG 2000 y ácido mirístico. Hay preocupación mínima de toxicidad local o sistémica en función de los datos de estudios con PEG de diversos tamaños, mientras el ácido mirístico es un ácido graso que está presente en la mayoría de grasas animales y vegetales y está presente en la circulación de lactantes y adultos.

Ejemplo 3. Farmacocinética

En el estudio de este ejemplo, a ratas Sprague-Dawley o monos se les dosificó durante hasta 6 horas (para ratas) o durante hasta 2 horas (para monos) mediante inhalación liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR o los liposomas a base de ICE en solitario, y después se sacrificaron 24 horas después para medir los niveles de hCFTR en diversos tejidos. Las dosis diana se muestra en las tablas 4-6. Las dosis reales medidas fueron 420, 630 y 850 µg/kg para liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR administrados a monos (correspondientes a las dosis diana en el encabezado de la tabla 4); 0,77, 4,05 y 6,70 mg/kg para los liposomas a base de ICE cargados de ARNm de hCFTR administrados a ratas (correspondientes a las dosis diana en el encabezado de la tabla 5); y 0,77, 4,05 y 6,70 mg/kg para liposomas a base de ICE administrados a ratas (correspondientes a las dosis diana en el encabezado de la tabla 6). Los resultados detallados de la distribución en tejidos se presentan a continuación en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4. Concentraciones medidas de ARNm de hCFTR en tejidos de mono y sangre 24 horas después de inhalación de liposomas cargados de ARNm de hCFTR

Tejido ^a	Vehículo	Machos			Hembras			
		Dosis inhalada diana			Vehículo	Dosis inhalada diana		
		500 µg/kg	750 µg/kg	1000 µg/kg		500 µg/kg	750 µg/kg	1000 µg/kg
Cerebro	BQL	3,91	0,0968	BQL	BQL	2,05	0,110	1,18
Corazón	BQL	BQL	0,165	BQL	BQL	BQL	BQL	0,537
Renal	BQL	BQL	BQL	0,0523	BQL	BQL	BQL	0,231
Laringe	0,166	BQL	5,54	1,87	BQL	5,15	3,37	2,59
Hígado	BQL	BQL	0,0670	1,27	BQL	0,917	0,147	8,48
Pulmón (promedio)	0,110	208	67,2	82,1	0,426	819	1390	1880
Bazo	BQL	0,420	BQL	BQL	BQL	BQL	0,307	1,85
Testículo	BQL	BQL	BQL	0,0912	-	-	-	-
Ovario	-	-	-	-	BQL	0,596	BQL	0,976
Tráquea	BQL	0,176	0,993	1,65	0,0657	1,54	14,4	4,72
LN traqueobronquial	BQL	30.9	0,284	70.3	BQL	0,147	468	5,28

Tejido ^a	Vehículo	Machos			Hembras			
		Dosis inhalada diana			Vehículo	Dosis inhalada diana		
		500 µg/kg	750 µg/kg	1000 µg/kg		500 µg/kg	750 µg/kg	1000 µg/kg
Sangre	0.0501	BQL	0.0433	0.0120	0.0188	0.00351	0.385	0.0121

BQL: Por debajo del límite de cuantificación

^a Niveles en tejido expresados como 10^6 x copias/g y niveles en sangre como 10^6 x copias/ml, para expresar los niveles en masas comparables ya que 1 ml de sangre ~ 1 g.

- 5 Tabla 5. Concentraciones medias de ARNm de hCFTR en tejidos de rata y sangre 24 horas después de dosis de liposoma cargado de ARNm de hCFTR de 0,7, 3,75 o 6,4 mg/kg

Tejido	Vehículo	Machos			Hembras			
		0,7 mg/kg	3,75 mg/kg	6,4 mg/kg	Vehículo	0,7 mg/kg	3,75 mg/kg	6,4 mg/kg
Cerebro	BLQ	BLQ	BLQ	55,4	BLQ	BLQ	BLQ	32,4
Corazón	BLQ	BLQ	BLQ	17,0	BLQ	BLQ	BLQ	41,1
Renal	BLQ	BLQ	BLQ	0,37	BLQ	BLQ	BLQ	0,95
Laringe	0,20	BLQ	BLQ	4178	BLQ	BLQ	BLQ	1410
Hígado	NC	BLQ	BLQ	2,3	BLQ	BLQ	BLQ	9,75
Pulmonar	0,061	2057	59 094	156 130	BLQ	1361	33 649	180 000
Cornete nasal	0,12	BLQ	BLQ	792	BLQ	BLQ	BLQ	1450
Bazo	BLQ	BLQ	BLQ	3,8	BLQ	BLQ	BLQ	1,09
Testículo	0,08	BLQ	BLQ	9,5	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Ovario	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	6,99
Tráquea	BLQ	BLQ	BLQ	2980	BLQ	BLQ	BLQ	787
LN traqueobronquial	BLQ	BLQ	BLQ	108	BLQ	BLQ	BLQ	1,48
Sangre	0,076	0,68	14,7	0,20	0,016	0,29	133	1,48

BLQ: por debajo del límite de cuantificación

Concentraciones en tejidos (copias x 106/g)/concentraciones en sangre (copias x 106/ml), con la suposición de que 1 ml de sangre ≈ 1 g.

- 10 Tabla 6. Concentraciones medias de ICE en tejidos de rata (µg/g) y sangre (µg/ml) 24 horas después de la dosificación por inhalación de liposomas cargados de ARNm de hCFTR (dosis de 0,7, 3,75 o 6,4 mg/kg)

Tejido	Vehículo	Machos			Hembras			
		0,7 mg/kg	3,75 mg/kg	6,4 mg/kg	Vehículo	0,7 mg/kg	3,75 mg/kg	6,4 mg/kg
Cerebro	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Corazón	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Renal	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Laringe	1,57	2,61	BLQ	1,57	BLQ	BLQ	BLQ	1,41
Hígado	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Pulmón	317	20,3	139	245	293	22,5	147	317
Cornete nasal	0,290	BLQ	BLQ	0,796	BLQ	BLQ	BLQ	0,724
Bazo	NA	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Testículo	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Ovario	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Tráquea	6,27	BLQ	BLQ	3,65	BLQ	BLQ	BLQ	2,40
LN traqueobronquial	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Sangre	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ: por debajo del límite de cuantificación

Concentraciones en tejidos (copias x 106/g)/concentraciones en sangre (copias x 106/ml), con la suposición de que 1 ml de sangre ≈ 1 g.

- 15 Estos datos muestran altos niveles de ARNm en tejido pulmonar y secreciones asociadas del sistema respiratorio tales como la laringe, la tráquea, los ganglios linfáticos traqueobronquiales y los cornetes nasales con niveles menores o de fondo en corazón, cerebro, hígado, riñón, bazo, testículo y ovario, particularmente a dosis menores de administración, mostrando la dosis más alta distribución de ARNm de hCFTR entre diversos tejidos. Los niveles pulmonares fueron altos y sensibles a la dosis tanto en ratas como en NHP, con los niveles más altos observados a 6,4 mg/kg en ratas.

- 20 La cinética de eliminación pulmonar de ARNm se midió de forma fiable en ratas, ya que pudieron usarse más momentos de sacrificio que para monos. La figura 2 indica una reducción exponencial de un solo componente con una semivida de aproximadamente 2-3 días. Estaban disponibles solo dos datos puntuales para NHP (figura 3) y estos datos parecen coherentes con los datos de rata en vista de las diferencias en la dosis.

- 25

Como se muestra en la tabla 5, los niveles de ARNm en el pulmón fueron dependientes de la dosis de una manera relativamente lineal. Las mediciones en tejido pulmonar realizadas después de un periodo de recuperación de 28 días al final del estudio de 29 días mostraron una disminución en la exposición de aproximadamente 100 veces, similar a lo observado 28 días después del estudio de una sola dosis.

También se examinaron las toxicocinéticas de los liposomas de ICE. No hubo niveles medibles de liposomas de ICE en sangre completa. Sin embargo, hubo niveles medibles y sensibles a la dosis de liposomas de ICE en el tejido pulmonar en ratas (tabla 6).

Ejemplo 4. Actividad *in vitro* de hCFTR en células epiteliales bronquiales humanas

Este ejemplo ilustra un estudio donde el ARNm de hCFTR se transfectó en células epiteliales bronquiales humanas cultivadas, tras lo que la proteína expresada a partir del ARNm de hCFTR transfectado proporcionó un aumento significativo en el transporte de cloruro a través de la membrana de las células epiteliales bronquiales en comparación con el tampón, demostrando de este modo la eficacia funcional del ARNm transfectado. Los cambios en el transporte de cloruro a través de la membrana de las células epiteliales bronquiales se midieron por la salida de corriente de cortocircuito en un aparato de pinzamiento de voltaje epitelial Ussing (es decir, una cámara Ussing). Específicamente, usando un procedimiento de cámara Ussing establecido (Charles River Laboratories), el ARNm de hCFTR encapsulado en un liposoma que comprende ICE, DOPE y un lípido modificado con PEG se incubó durante 2 o 4 horas en el lado apical (mucoso) o basolateral (seroso), o ambos lados, de células epiteliales bronquiales humanas. También se incluyó un blanco de tampón como control, por ejemplo, para evaluar el transporte de cloruro mediante CFTR endógeno en las células. Después, se midió la actividad del canal de cloruro inducida por forskolina usando el ensayo con cámara Ussing. Después de la medida del cambio de corriente como indicativo del transporte de cloruro a través de la membrana de las células epiteliales bronquiales, se añadió un inhibidor de CFTR a las muestras para mostrar que el cambio de corriente se debía a la actividad CFTR.

Como se muestra en la figura 4, en comparación con el grupo de control (A. blanco de tampón), el tratamiento de la superficie epitelial apical (mucosa) durante 2 o 4 horas (muestras B y E, respectivamente) y las superficies epiteliales apical y basolateral (serosa) durante 2 horas (muestra C) con ARNm de hCFTR proporcionó un aumento significativo en la actividad del canal de cloruro. Además, la actividad de cloruro en todos los grupos se inhibió por el inhibidor-172 de CFTR. Los resultados de este estudio muestran que el ARNm de hCFTR administrado en un liposoma a células epiteliales bronquiales humanas produjo proteína CFTR activa en esas células. También muestra que la proteína CFTR activa producida a partir del ARNm de hCFTR proporcionó transporte de cloruro aumentado significativamente, en comparación con la proteína CFTR endógena, a través de las membranas celulares de las células epiteliales bronquiales humanas transfectadas.

Ejemplo 5. Distribución de hCFTR después de una sola dosis de composición de ARNm de hCFTR/liposoma en primates

En el estudio de este ejemplo, primates no humanos (NHP) se trataron con una sola exposición de aerosol de una composición de CO-ARNm de hCFTR/liposoma. Como se muestra en la figura 5, la tinción inmunohistoquímica (IHC) de secciones transversales de pulmón demuestran un aumento dependiente de la dosis en la intensidad para la detección de proteína hCFTR positiva. Además, cuando se detectó y cuantificó ARNm de hCFTR en tejidos de los NHP, se encontró una distribución amplia por todos los pulmones de los monos, con niveles de CO-hCFTR órdenes de magnitud (>200 veces) por encima de CFTR endógeno (figure 6). Además, los pulmones de los monos, que eran los órganos diana, recibieron >90 % de la dosis de CO-CFTR que entró en las vías respiratorias, en comparación con otros tejidos del sistema respiratorio que se ensayaron (figure 7).

Ejemplo 6. Tratamiento de sujetos con fibrosis quística con composición de CO-ARNm de hCFTR/liposoma

El estudio en este ejemplo se diseña para evaluar una composición de liposoma con CO-ARNm de CFTR en paciente con fibrosis quística.

Una composición de liposoma con CO-ARNm de hCFTR (composición de CO-hCFTR) se administra por nebulización a sujetos con fibrosis quística. La composición de CO-hCFTR se dosifica en función de su contenido de CO-ARNm de hCFTR. Se usará un nebulizador para administrar la composición de CO-hCFTR por nebulización a un caudal de aproximadamente 0,3 ml/minuto. La composición de CO-hCFTR se administrará a los sujetos a los siguientes 3 niveles de dosis: 8,0, 16,0 o 24,0 mg de CO-ARNm de hCFTR (niveles de dosis nominales) una vez o una vez a la semana durante cinco semanas. A otros sujetos se les dosificará control de placebo.

Para recibir tratamiento con administración de la composición de CO-hCFTR, los pacientes tendrán un diagnóstico confirmado de CF como se definen por todos los siguientes: un valor de cloruro en sudor de ≥ 60 mmol/l por iontoforesis cuantitativa de pilocarpina (documentada en el registro médico del sujeto), una mutación confirmada de CFTR que provoca enfermedad (genotipo confirmado en la visita de selección) y enfermedad senopulmonar crónica y/o anomalías gastrointestinales/nutricionales coherentes con enfermedad CF; enfermedad CF clínicamente estable,

por ejemplo, FEV₁ ≥50 % y ≤90 % de lo normal previsto para la edad, sexo y estatura en la selección, saturación de oxígeno en reposo ≥92 % en aire ambiente (pulsioximetría) e índice de masa corporal ≥17,5 kg/m² y peso ≥40 kg. Los sujetos que están recibiendo el fármaco de combinación de lumacaftor/ivacaftor (ORKAMBI) permanecerán con el mismo mientras dure el estudio preferiblemente a una dosis estable.

Los procedimientos y ensayos que se realizarán tanto para la selección de los sujetos como durante el estudio para evaluar la actividad biológica de la composición de liposoma con CO-ARNm de CFTR incluyen: constantes vitales, pulsioximetría, exploración física, espirometría, pruebas clínicas de laboratorio (química sérica, hematología, coagulación, análisis de orina, CRP), ECG, radiografía de tórax, cuestionario revisado de fibrosis quística (CFQ-R), prueba de embarazo en suero, informe de AE y medicamentos concomitantes, medición del peso, muestras de sangre para CO-ARNm de hCFTR y ensayos de ICE y muestras de sangre para ensayos de respuesta inmunitaria. Algunos sujetos también se someterán a broncoscopia.

Las células epiteliales bronquiales obtenidas durante las broncoscopias se prepararán para la cuantificación de CO-ARNm de hCFTR exógeno y ARNm de CFTR endógeno por qPCR, y para una evaluación cualitativa de la proteína CFTR por análisis de transferencia de Western.

Además, durante la broncoscopia, se realizarán mediciones de la diferencia de potencial de las vías respiratorias bajas para evaluar la actividad del canal de cloruro CFTR en el epitelio bronquial. Las mediciones de la diferencia de potencial se harán en la salida de la llingula del pulmón izquierdo, como se describe por Dransfield *et al.* (Dransfield *et al.*, *Chest.* (2013) 144:498-506). Se registrará un potencial estable con el valor medio de un intervalo de puntuación de 10 segundos después de perfusión de cada solución. La actividad CFTR se estimará por el cambio en la diferencia de potencial después de perfusión con isoproterenol libre de cloruro.

El cuestionario revisado de fibrosis quística (CFQ-R; versión para adolescentes y adultos [pacientes de 14 años de edad y mayores]) se completará por los sujetos para conseguir tanto una puntuación basal como puntuaciones durante el estudio para comparaciones. Los resultados del dominio respiratorio del CFQ-R serán de interés principal; el cambio mínimo desde la medida inicial que represente una mejora clínicamente importante en el dominio respiratorio se determinará en ≥4 (Quittner *et al.*, *Chest.* (2009) 135:1610-8).

Ejemplo 7. Colocalización de CFTR con proteína de membrana en células bronquiales de las vías respiratorias altas

Este ejemplo demuestra la expresión de la proteína CFTR en diversos tejidos pulmonares, incluyendo el epitelio bronquial alto, el epitelio bronquial bajo y el tejido alveolar después de administración por inhalación de ARNm de CFTR formulado en una nanopartícula lipídica. Este ejemplo demuestra además, a través de colocalización con la proteína de unión ocluyente de membrana endógena, ZO-1, que se encuentra en la membrana celular, que la proteína CFTR expresada a partir del ARNm de CFTR administrado está localizada en la membrana celular de tejido pulmonar, incluyendo células epiteliales pulmonares, tales como células epiteliales bronquiales de las vías respiratorias altas y células epiteliales bronquiales de las vías respiratorias bajas, así como en las membranas celulares de células alveolares.

Protocolo de estudio de colocalización: El método de inmunohistoquímica y estudio de colocalización descrito en este párrafo es común para los ejemplos 7, 8 y 9. La administración pulmonar del ARNm de CFTR en primates estuvo seguida de inmunohistoquímica para detectar la expresión de proteína y la colocalización en membrana en las células bronquiales de las vías respiratorias altas y células epiteliales de las vías respiratorias bajas y el pulmón alveolar profundo. Los primates en este estudio se agruparon en cinco categorías y se les administró lo siguiente: (1) control, trehalosa 10 %; (2) control, vehículo de LNP; (3) CO-hCFTR dosis baja, 500 µg/kg, (4) CO-hCFTR dosis media, 750 µg/kg, (5) CO-hCFTR dosis alta, 1000 µg/kg. La formulación de ARNm-LNP o los controles (sin ARNm) se administraron diariamente. Por consiguiente, los animales se expusieron durante 60 minutos a la composición de aerosol (grupo 3, dosis baja, 500 µg/kg), 90 minutos de aerosol (grupo 4, dosis media, 750 µg/kg) o 120 minutos de aerosol (grupo 5, dosis alta) como se describe en la tabla 4. Al final del estudio, los animales se sacrificaron y se recogieron los tejidos para inmunohistoquímica para detectar la expresión y localización de la proteína CFTR humana en los pulmones. Para la detección inmunohistoquímica de la proteína CFTR humana de codones optimizados, se incubaron secciones pulmonares durante una noche a 4 °C con una dilución 1:250 de cada uno de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CFTR (MAB 25031, R & D Systems) y anticuerpo de conejo anti-ZO1 (Ab214228, Abcam); o con anti-CFTR en solitario; y anti-ZO1 en solitario. Después de incubación durante una noche, las secciones se bloquearon con primer agente de bloqueo que contiene peróxido de hidrógeno, se incubaron con el anticuerpo secundario (DyLight 594 antirratón para anticuerpo contra CFTR, y anticuerpo DyLight 488 anticonejo) y seguido de segundo bloqueo en una solución que contenía suero de caballo al 3 % y BSA al 3 % y se sometieron a microscopia confocal para la colocalización. DyLight 594 emite señal roja, y DyLight 488 emite verde, y tras la colocalización de las dos señales (y, por lo tanto, las proteínas que se unen cada una), la combinación óptica produce señal amarilla.

Como se muestra en la figura 8A, 8B y 8C, la proteína CFTR traducida a partir de ARNm de CFTR administrado se expresa en el sistema respiratorio alto en células epiteliales bronquiales. En el estudio ejemplar, la proteína derivada

de ARNm de CFTR presentó una expresión dependiente de la dosis y se colocó con la proteína de unión ocluyente de membrana endógena ZO1 en la membrana de células epiteliales bronquiales altas. La figura 8A representa imágenes de microscopio representativas de células epiteliales bronquiales de un animal de control que recibió trehalosa al 10 % en solitario, visualizadas para tinción de CFTR (izquierda), tinción de ZO1 (centro) y combinación óptica de tinción de CFTR y ZO1 (derecha). La figura 8B representa imágenes de microscopio representativas de células epiteliales bronquiales de un animal que recibió dosis baja de ARNm de CFTR (500 µg/kg), visualizadas para tinción de CFTR (izquierda), tinción de ZO1 (centro) y combinación óptica de tinción de CFTR y ZO1 (derecha). La figura 8C representa imágenes de microscopio representativas de células epiteliales bronquiales de un animal que recibió dosis alta de ARNm de CFTR (1000 µg/kg), visualizadas para tinción de CFTR (izquierda), tinción de ZO1 (centro) y combinación óptica de tinción de CFTR y ZO1 (derecha). Como se indica en la figura, la expresión de CFTR fue dependiente de la dosis, es decir, la señal de inmunotinción fue más fuerte a la dosis más alta (imagen de la izquierda de la figura 8C) que a la dosis baja (figura 8B, imagen de la izquierda). Además, como es evidente por la colocación de las señales de CFTR y ZO1, CFTR y ZO1 se expresan en la membrana celular de las células epiteliales. Las dos proteínas se colocaban produciendo una señal intensificada, que era amarilla tras observación visual (imagen de la derecha de la figura 8B y 8C). No se observó señal roja correspondiente a CFTR en la figura 8A, lo que indica la especificidad de la tinción. Además, la señal óptica combinada no estaba intensificada y era monocromática para la señal de ZO-1 en solitario.

Ejemplo 8. Colocalización de CFTR con proteína de membrana en células epiteliales de las vías respiratorias bajas

Para un efecto terapéutico satisfactorio, el ARNm de CFTR administrado tiene que suministrarse a la parte baja de los pulmones. Como se muestra en la figura 9A, 9B y 9C, la proteína CFTR traducida a partir de ARNm de CFTR administrado se expresó en células epiteliales del sistema respiratorio bajo. La proteína derivada de ARNm de CFTR presentó una expresión dependiente de la dosis y colocación con la proteína de unión ocluyente de membrana endógena ZO1 en la membrana de células epiteliales de las vías respiratorias bajas. La figura 9A muestra imágenes de microscopio representativas de una sección de tejido de la membrana de células epiteliales de las vías respiratorias bajas de un animal de control que recibió trehalosa al 10 % en solitario, visualizadas para tinción de CFTR (izquierda), tinción de ZO1 (centro) y combinación óptica de tinción de CFTR y ZO1 (derecha). La figura 9B muestra imágenes de microscopio representativas de una sección de tejido de la membrana de células epiteliales de las vías respiratorias bajas de un animal que recibió dosis baja de ARNm de CFTR (500 µg/kg), visualizadas para tinción de CFTR (izquierda), tinción de ZO1 (centro) y combinación óptica de tinción de CFTR y ZO1 (derecha). La figura 9C muestra imágenes de microscopio representativas de una sección de tejido de las vías respiratorias bajas de un animal que recibió dosis alta de ARNm de CFTR (1000 µg/kg), visualizadas para tinción de CFTR (izquierda), tinción de ZO1 (centro) y combinación óptica de tinción de CFTR y ZO1 (derecha). La intensidad de la expresión de CFTR fue mayor en la dosis alta (figura 9C, imagen de la izquierda) en comparación con la dosis baja (figura 9B, imagen de la izquierda). La imagen combinada en la figura 9C fue amarilla, lo que indica que las proteínas estaban colocadas, mientras la figura 9A no tuvo señal de CFTR (izquierda) como se esperaba del control.

Ejemplo 9. Expresión de proteína derivada de ARNm de CFTR en pulmón alveolar

El ARNm de CFTR se captó satisfactoriamente por células alveolares en el pulmón profundo. Como se muestra en la figura 10A, 10B y 10C, la proteína CFTR traducida a partir de ARNm de CFTR administrado se expresó en membranas de células alveolares y se colocó con proteína de unión ocluyente de membrana endógena ZO1 en la membrana de células alveolares. La figura 10A muestra imágenes de microscopio representativas de una sección de tejido de la membrana de células epiteliales de las vías respiratorias bajas de un animal de control que recibió trehalosa al 10 % en solitario, visualizadas para tinción de CFTR (izquierda), tinción de ZO1 (centro) y combinación óptica de tinción de CFTR y ZO1 (derecha). La figura 10B muestra imágenes de microscopio representativas de una sección de tejido de la membrana de células epiteliales de las vías respiratorias bajas de un animal que recibió dosis baja de ARNm de CFTR (500 µg/kg), visualizadas para tinción de CFTR (izquierda), tinción de ZO1 (centro) y combinación óptica de tinción de CFTR y ZO1 (derecha). La figura 10C muestra imágenes de microscopio representativas de una sección de tejido de las vías respiratorias bajas de un animal que recibió dosis alta de ARNm de CFTR (1000 µg/kg), visualizadas para tinción de CFTR (izquierda), tinción de ZO1 (centro) y combinación óptica de tinción de CFTR y ZO1 (derecha). La intensidad de la expresión de CFTR fue mayor en la dosis alta (figura 10C, imagen de la izquierda) en comparación con la dosis baja (figura 10B, imagen de la izquierda). La imagen combinada en la figura 10C fue amarilla, lo que indica que las proteínas estaban colocadas, mientras la figura 10A no tuvo señal de CFTR (izquierda) como se esperaba para el control.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un ARNm de codones optimizados para su expresión en células humanas, que codifica una proteína de regulador de la conductancia transmembranaria en fibrosis quística (CFTR) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde el ARNm que codifica la proteína CFTR comprende una secuencia polinucleotídica al menos un 90 % idéntica a SEQ ID NO: 1, y en donde el ARNm está a una concentración de al menos 0,4 mg/ml, y en donde la composición comprende además un diluyente seleccionado del grupo que consiste en DMSO, etilenglicol, glicerol, 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), propilenglicol, sacarosa y trehalosa, en donde dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de fibrosis quística (CF) en un sujeto, y la etapa de administración de la composición al sujeto comprende inhalación.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ARNm está a una concentración
 - i) de al menos 0,5 mg/ml;
 - ii) de al menos 0,6 mg/ml; o
 - iii) que varía de 0,4 mg/ml a 0,8 mg/ml.
3. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la secuencia polinucleotídica es al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1, o es idéntica a SEQ ID NO: 1.
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la secuencia polinucleotídica es un 100 % idéntica a SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición se nebuliza antes de la inhalación.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la nebulización se consigue mediante un nebulizador que comprende tecnología de malla vibrante (VMT), opcionalmente en donde la VMT comprende una malla o membrana con 1000-7000 orificios que vibra en la parte superior de un depósito de líquido y de ese modo hace salir por presión una bruma de gotas muy finas a través de los orificios en la malla o membrana.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición se
 - i) almacena como una suspensión estéril congelada antes de su administración; y/o
 - ii) almacena en un vial de un solo uso antes de su administración, opcionalmente en donde el vial de un solo uso puede comprender menos de 5,0 ml de la composición, opcionalmente en donde el vial de un solo uso comprende entre 3,0 y 4,0 ml de la composición; opcionalmente en donde el vial de un solo uso comprende 3,2 ml de la composición.
8. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde la composición farmacéutica
 - i) se almacena en forma de polvo seco liofilizado; y/o
 - ii) es estable en forma liofilizada en un estado congelado durante 1, 2, 3, 4, 5 o 10 años sin pérdida de actividad farmacológica o biológica del ARNm que codifica la proteína CFTR; y/o
 - iii) en forma liofilizada se reconstituye adicionalmente en una solución acuosa antes de su administración; opcionalmente en donde la solución acuosa es agua purificada.
9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ARNm que codifica la proteína CFTR:
 - i) está a una dosificación que varía de 8 mg a 24 mg; y/o
 - ii) comprende además una secuencia de región no traducida (UTR) 5' de SEQ ID NO: 3; y/o
 - iii) comprende además una secuencia de región no traducida (UTR) 3' de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ARNm que codifica la proteína CFTR se encapsula dentro de una nanopartícula; opcionalmente en donde la nanopartícula es un liposoma.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el liposoma comprende uno o más lípidos catiónicos, uno o más lípidos no catiónicos, y uno o más lípidos modificados con PEG.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el liposoma comprende no más de tres componentes lipídicos distintos.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde uno componente lipídico distinto es un lípido catiónico a base de esterol, o los no más de tres componentes lipídicos distintos son un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido modificado con PEG.

5 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde el liposoma comprende éster de imidazol colesterol (ICE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) y 1,2-dimiristoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (DMG-PEG-2K); opcionalmente en donde ICE y DOPE están presentes a una relación molar de >1:1; ICE y DMG-PEG-2K están presentes a una relación molar de >10:1; o DOPE y DMG-PEG-2K están presentes a una relación molar de >5:1.

15. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en donde el liposoma tiene un tamaño menor de aproximadamente 100 nm; opcionalmente en donde el liposoma tiene un tamaño que varía de 40 nm a 60 nm.

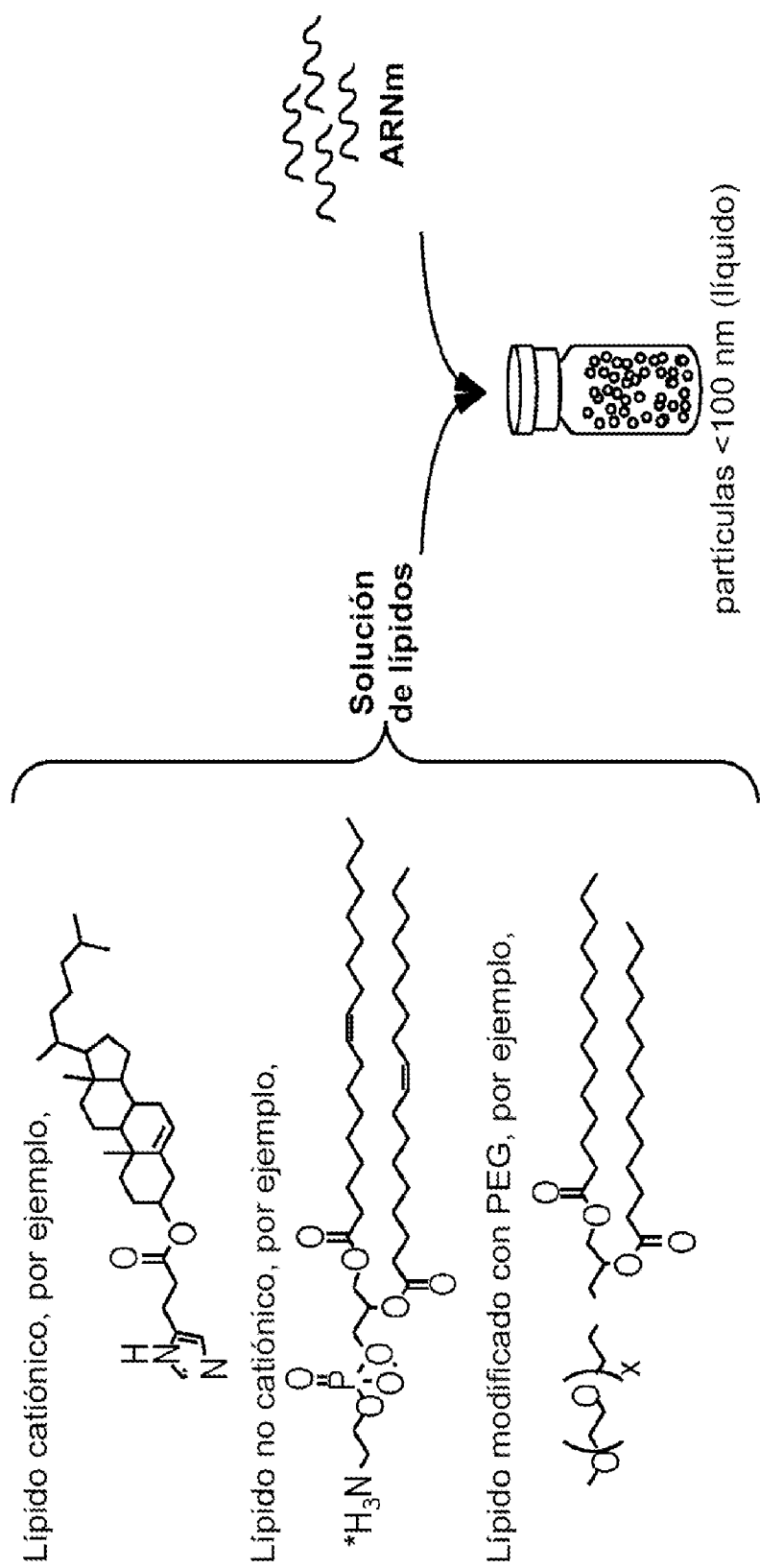


FIGURA 1

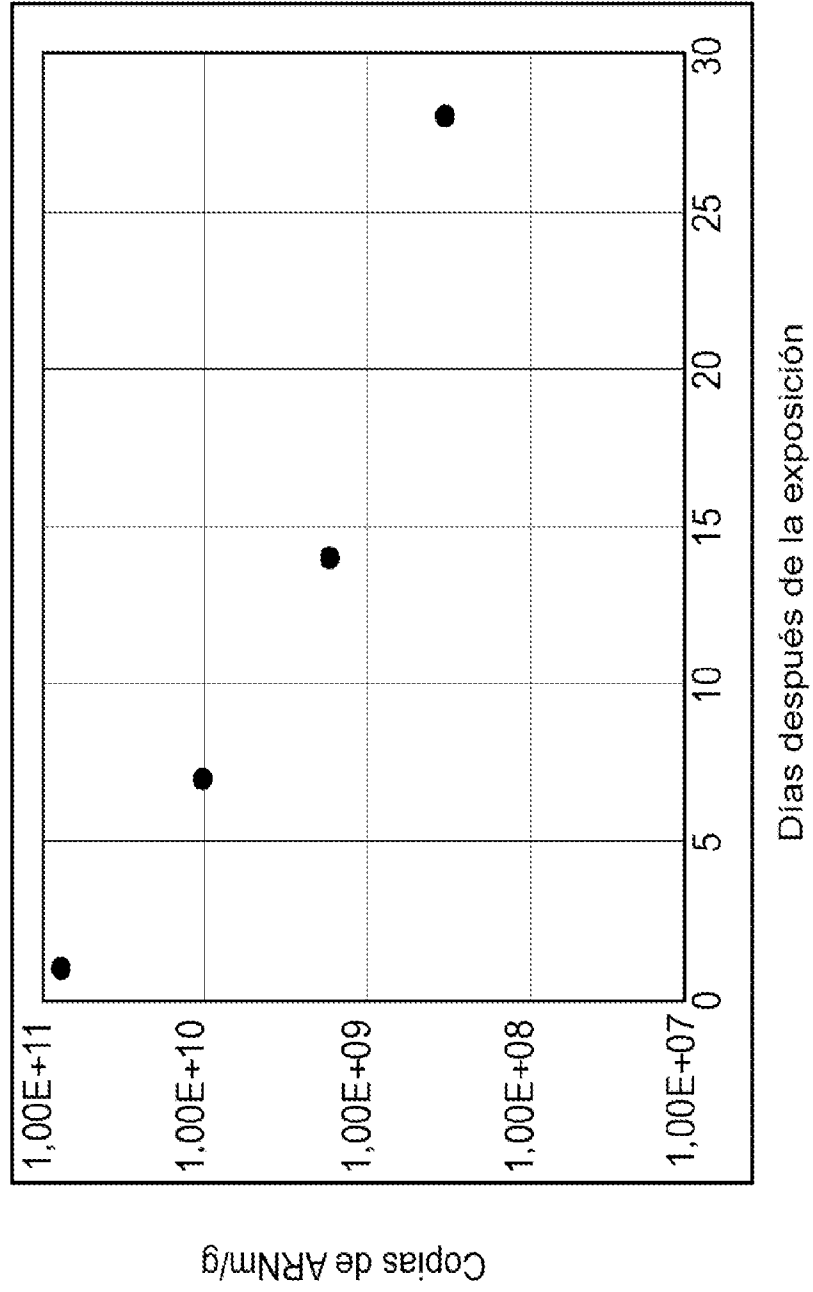


FIGURA 2

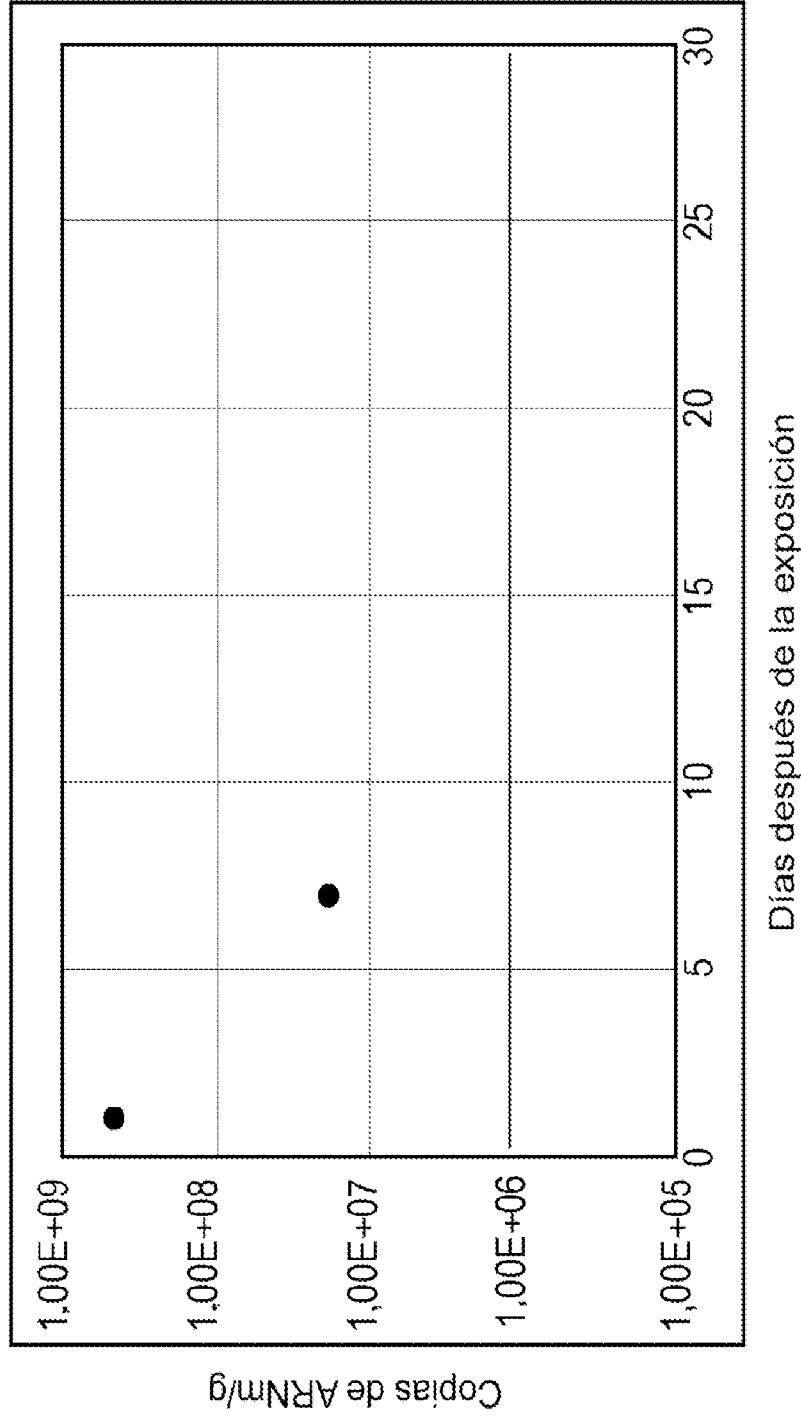


FIGURA 3

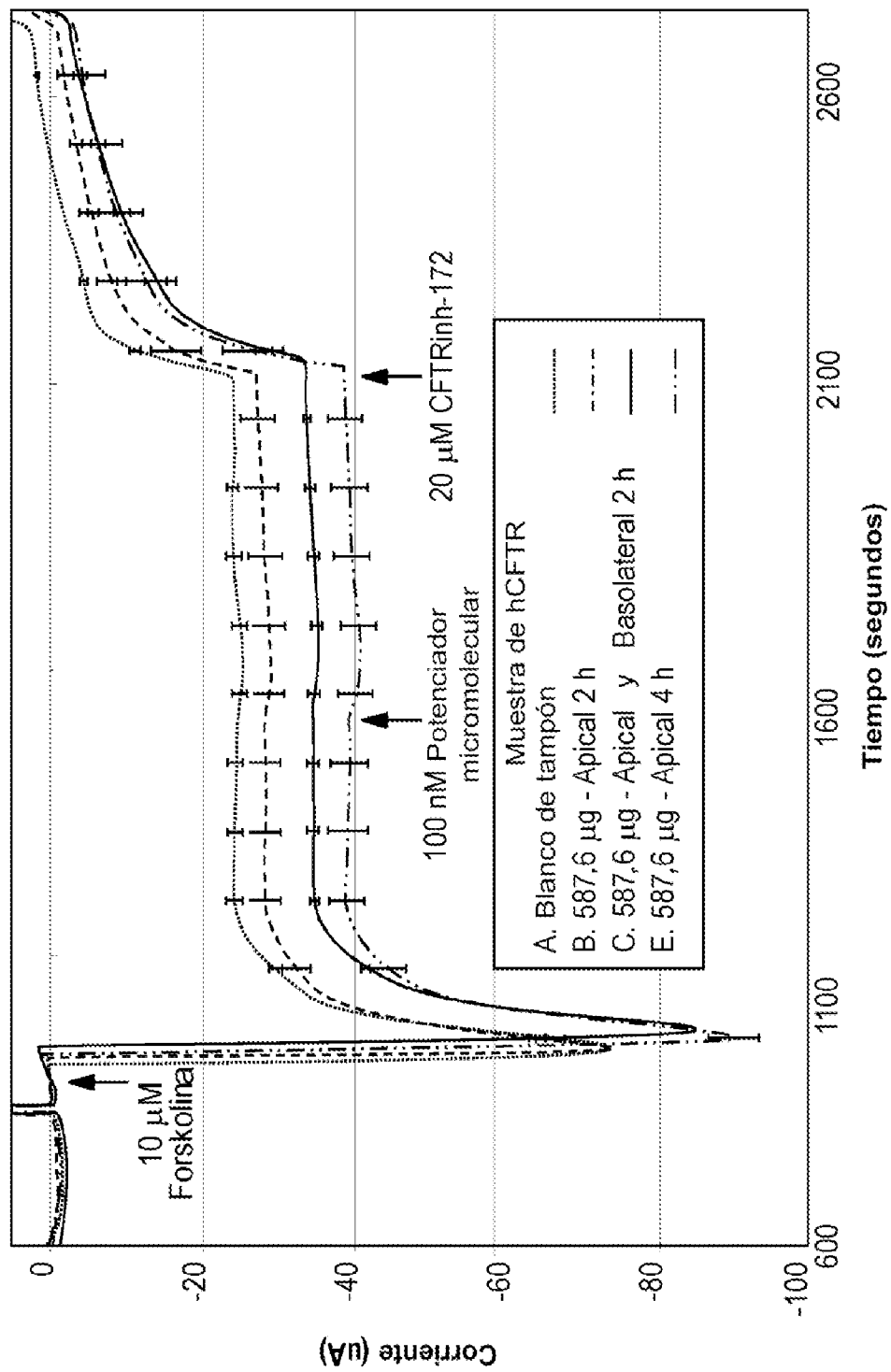


FIGURA 4

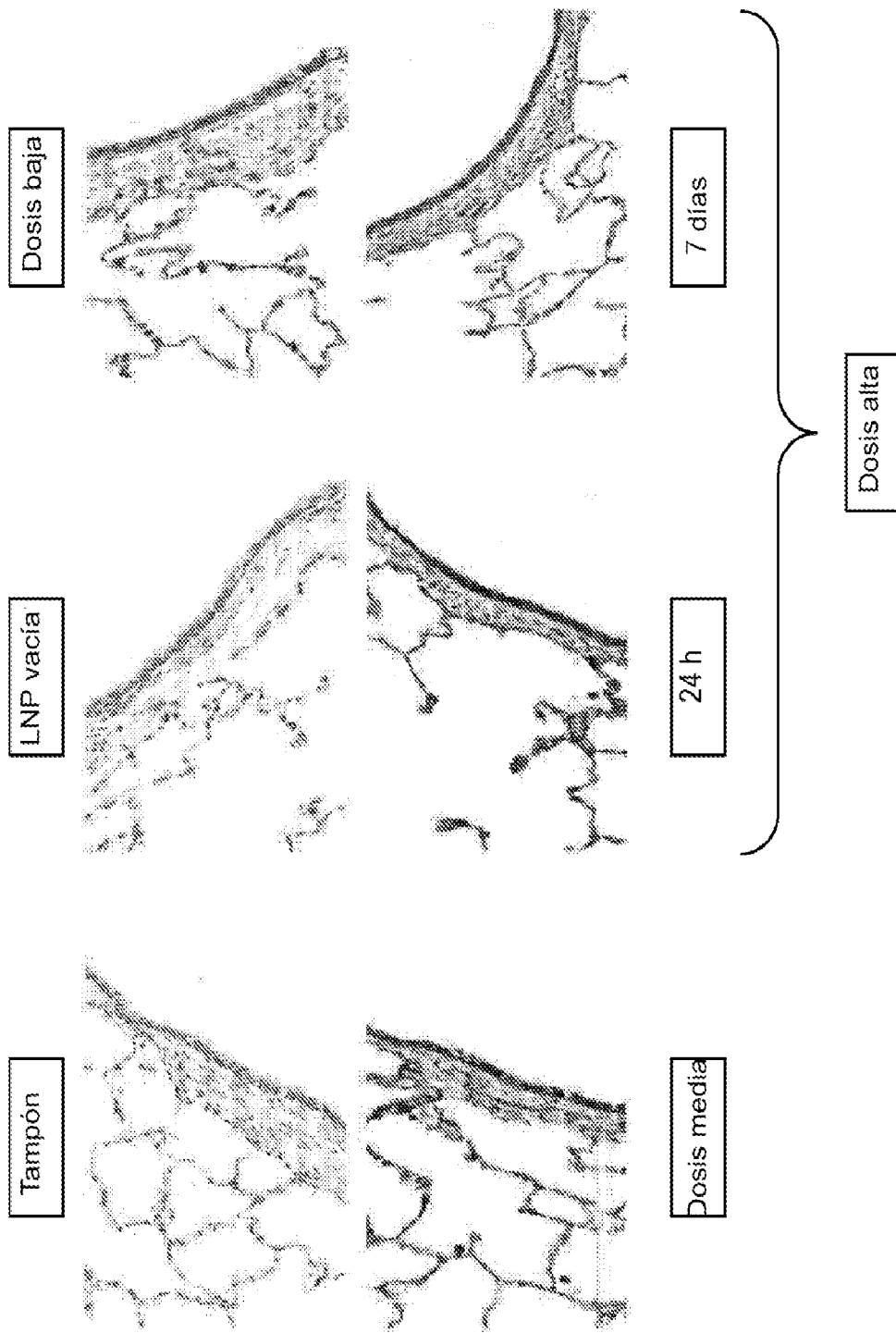


FIGURA 5

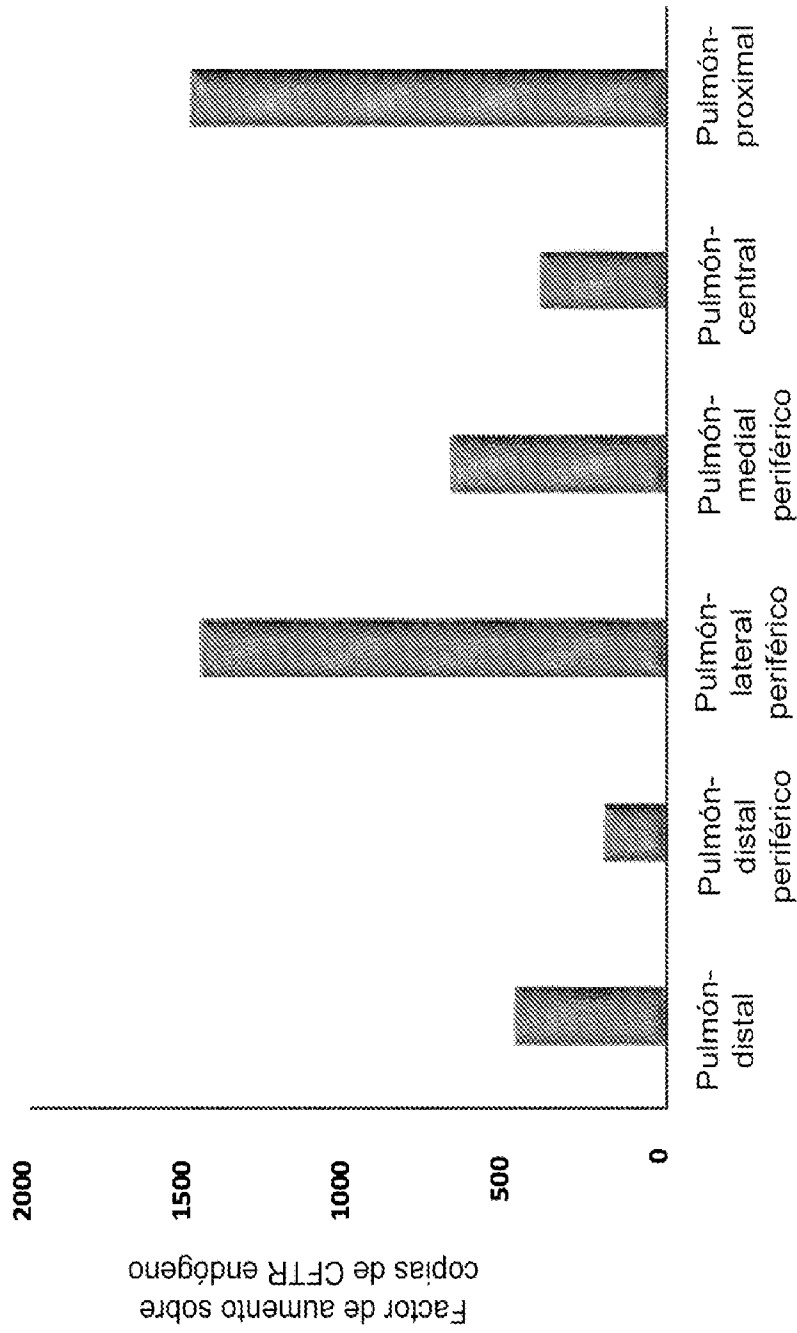


FIGURA 6

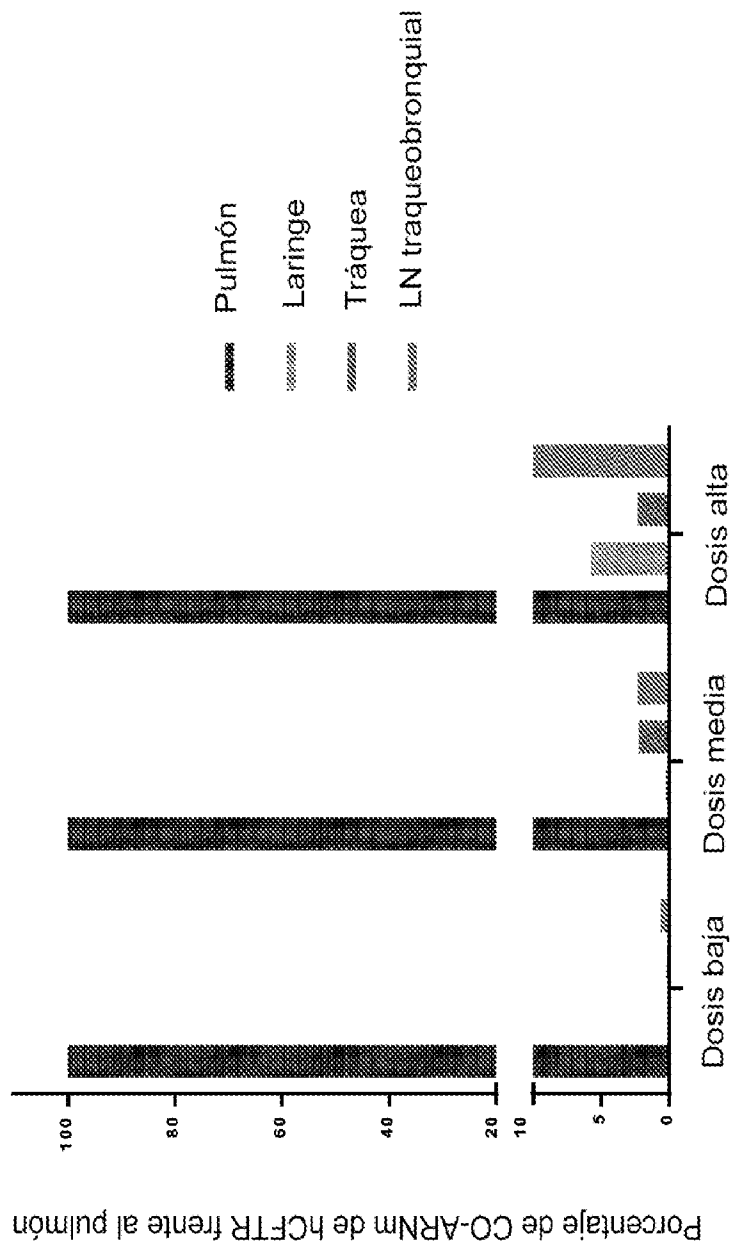
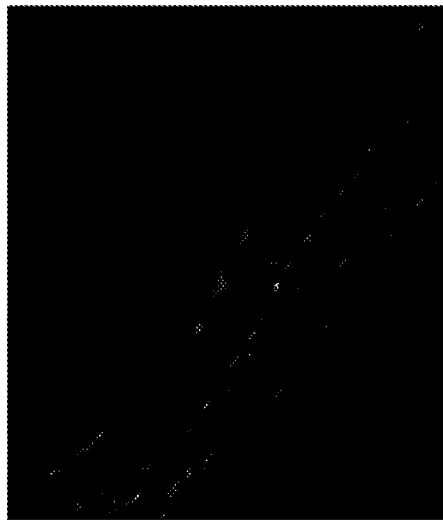
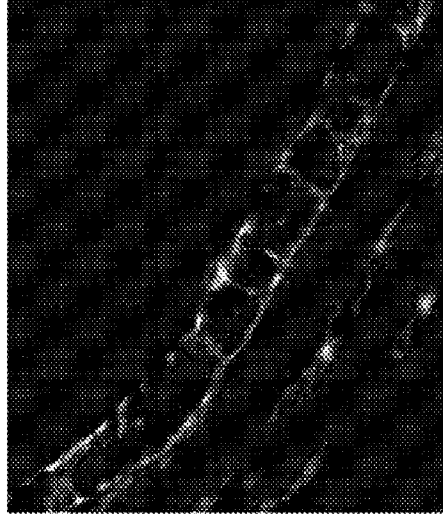


FIGURA 7

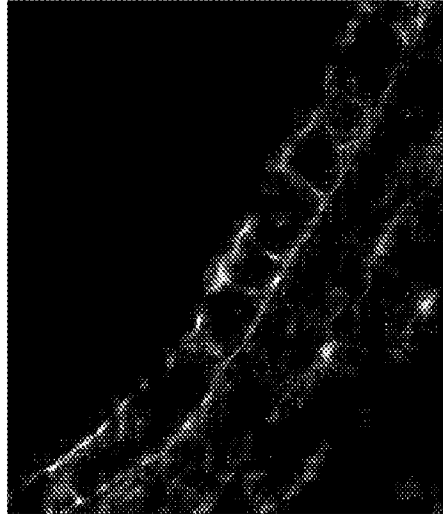
Células epiteliales bronquiales altas
Grupo 1, trehalosa al 10 %



CFTR



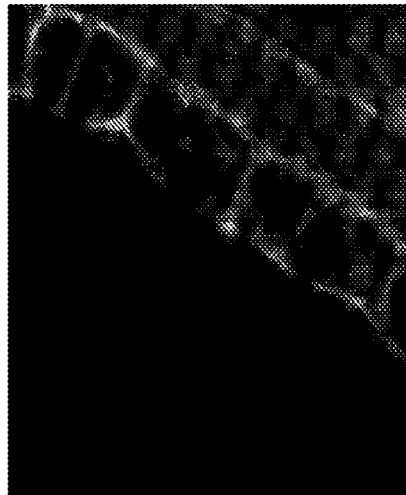
ZO1



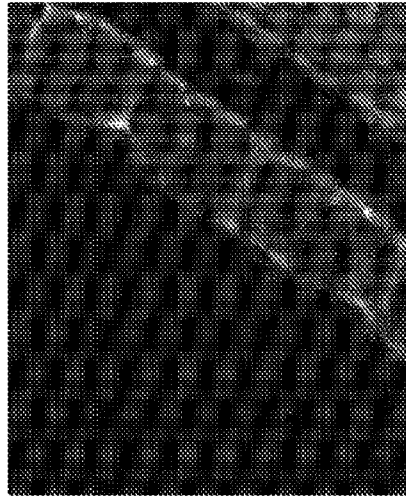
COMBINADO

Figura 8A

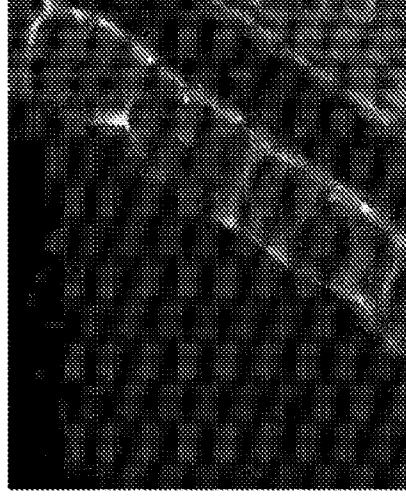
Células epiteliales bronquiales altas
Grupo 3, ARNm de CFTR 500µg/kg
60 minutos de exposición



CFTR



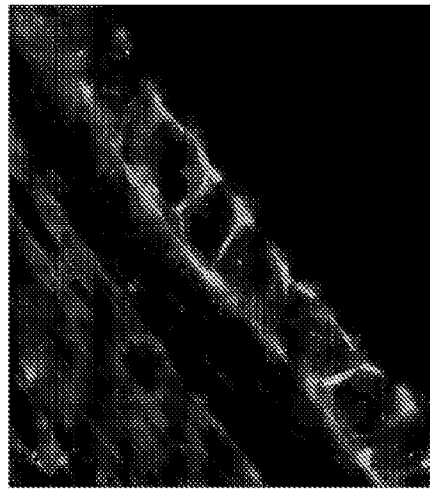
ZO1



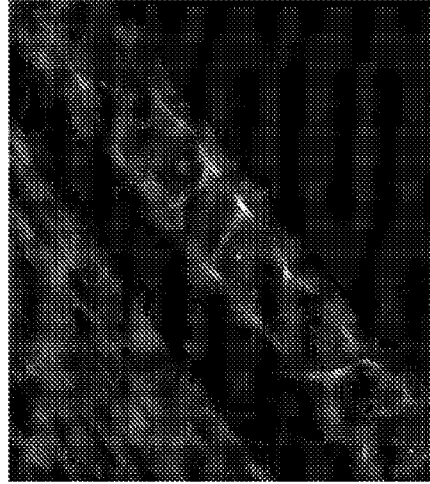
COMBINADO

Figura 8B

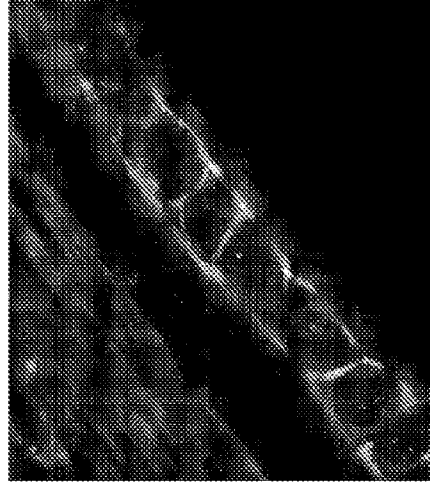
Células epiteliales bronquiales altas
Grupo 5, ARNm de CFTR 1000µg/kg
120 minutos de exposición



CFTR



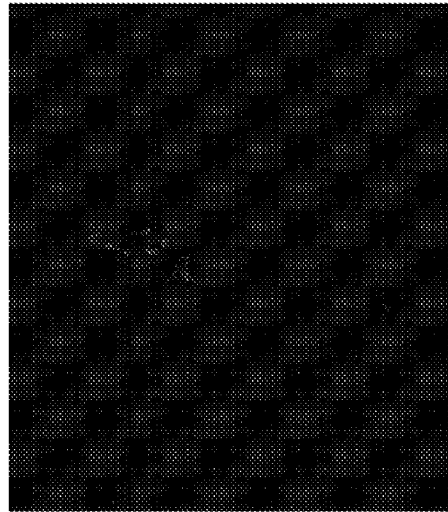
ZO1



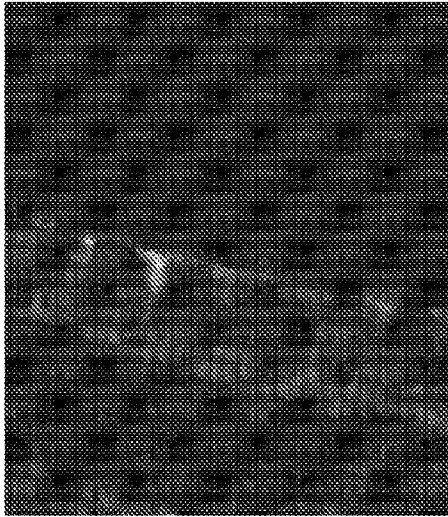
COMBINADO

Figura 8C

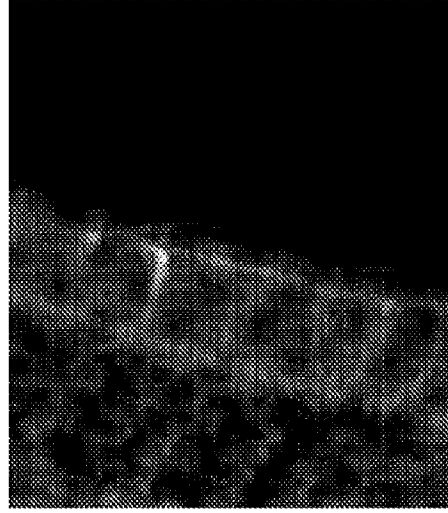
Células epiteliales bronquiales bajas
Grupo 1, trehalosa al 10 %



CFTR



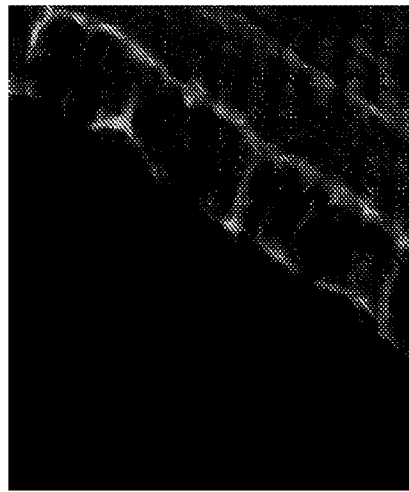
ZO1



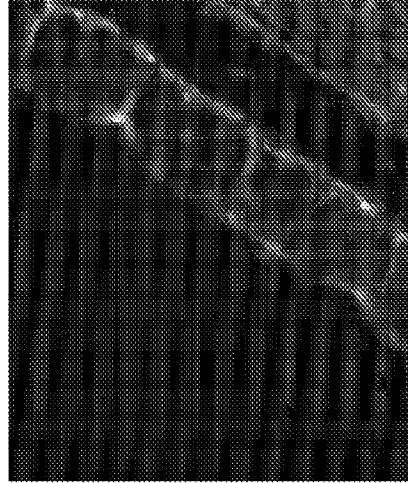
COMBINADO

Figura 9A

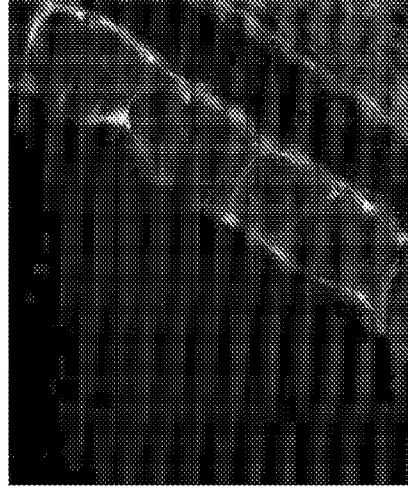
Células epiteliales bronquiales bajas
Grupo 3, ARNm de CFTR 500µg/kg
60 minutos de exposición



CFTR



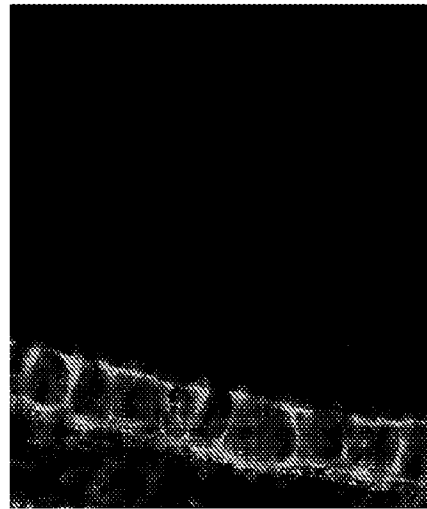
ZO1



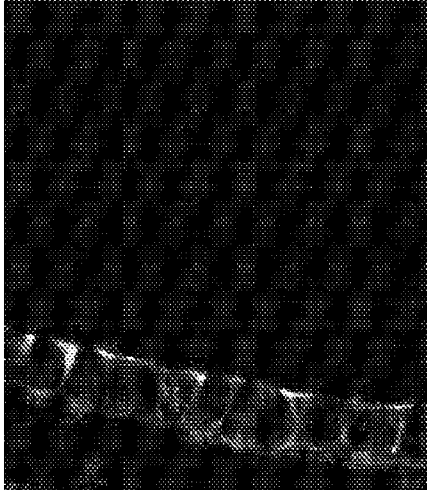
COMBINADO

Figura 9B

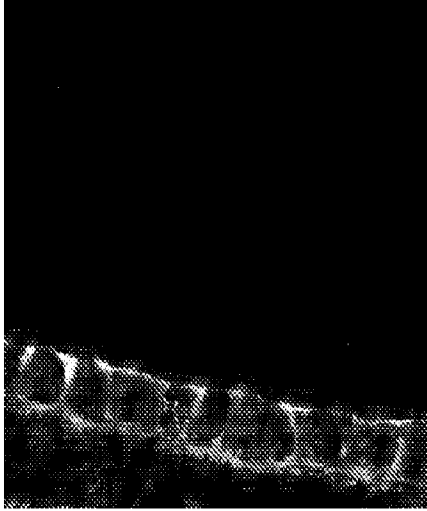
Células epiteliales bronquiales bajas
Grupo 5, ARNm de CFTR 1000µg/kg
120 minutos de exposición



CFTR



ZO1



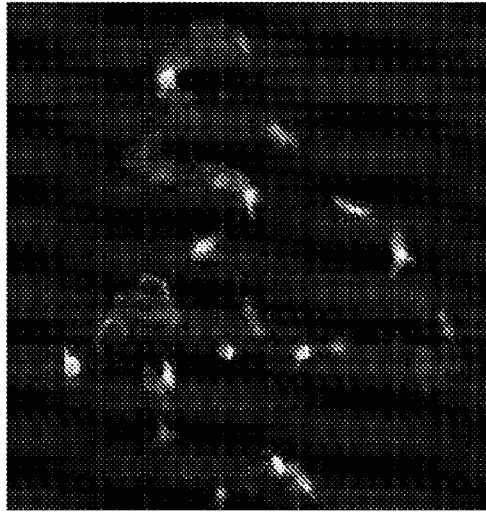
COMBINADO

Figura 9C

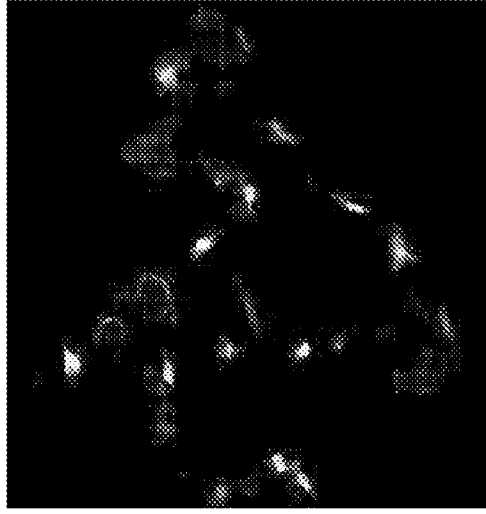
Región alveolar
Grupo 1, trehalosa al 10 %



CFTR



ZO1



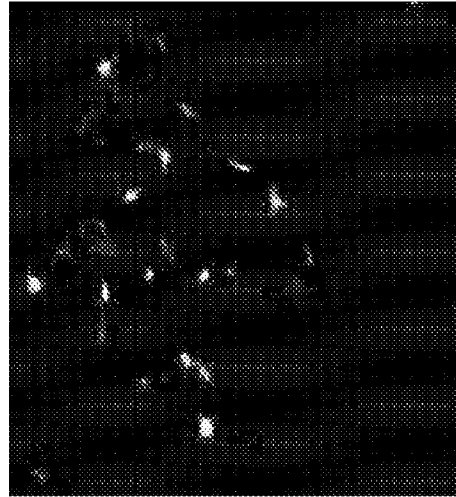
COMBINADO

Figura 10A

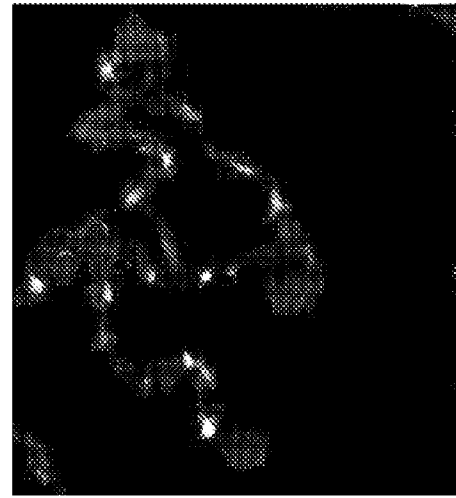
Región alveolar
Grupo 3, ARNm de CFTR 500µg/kg
60 minutos de exposición



CFTR



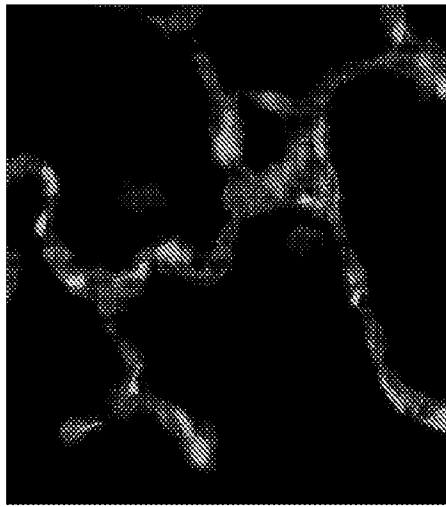
ZO1



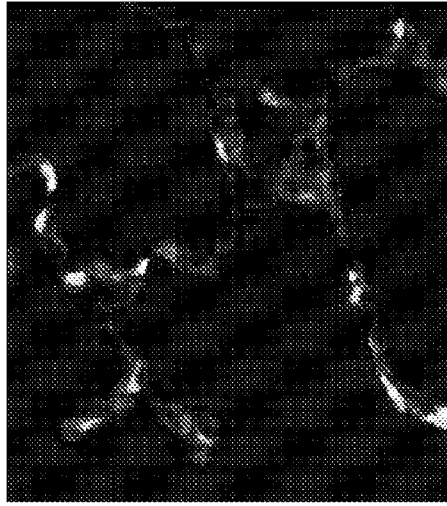
COMBINADO

Figura 10B

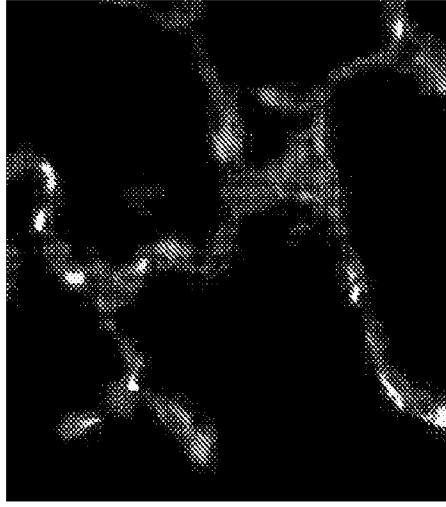
Región alveolar
Grupo 5, ARNm de CFTR 1000µg/kg
120 minutos de exposición



CFTR



ZO1



COMBINADO

Figura 10C