

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 019**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2019** **PCT/EP2019/071619**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2020** **WO20035460**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2019** **E 19749768 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024** **EP 3836903**

54 Título: **Formulaciones a base de lípidos que contienen sales para el suministro de ARN**

30 Prioridad:

**14.08.2018 EP 18189006**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.10.2024**

73 Titular/es:

**ETHRIS GMBH (100.0%)**  
**Semmelweisstrasse 3**  
**82152 Planegg, DE**

72 Inventor/es:

**DOHMEN, CHRISTIAN y**  
**MYKHAILYK, OLGA**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 983 019 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

Formulaciones a base de lípidos que contienen sales para el suministro de ARN

La presente invención se refiere a composiciones a base de lípidos que pueden usarse para el suministro eficiente de un ARN a un sujeto.

- 5 Se conocen en la técnica diversas formulaciones a base de lípidos, que pueden actuar como vectores de ácidos nucleicos para permitir su suministro al cuerpo de un paciente, por ejemplo, A.C. Silva y otros, Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16, y la literatura referida en la misma. GL67A es una formulación que se ha probado con éxito en estudios clínicos, para el suministro de pADN a través de la inhalación (E. Alton y otros, Efficacy and Mechanism Evaluation, Vol. 3, Número 5, julio de 2016). La formulación GL67A contiene, junto con pADN como ácido nucleico terapéuticamente activo, GL67 (también conocido como Genzyme Lipid 67, un colesterol catiónicamente derivatizado), 1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina (DOPE) y 1,2-dimiristoil-*sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000).

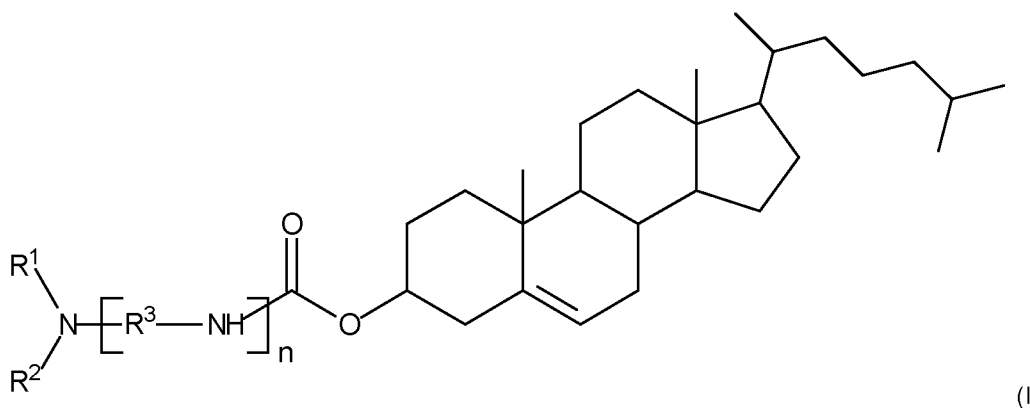
- 10 Sin embargo, se encontró que la formulación de lípidos era ineficaz para la transfección de ARN *in vivo* (O. Andries y otros, Molecular Pharmaceutics 2012, 9, 2136-2145). En vista de estos problemas, persiste la necesidad de formulaciones que puedan actuar como vectores efectivos para el suministro de ARN *in vivo* mientras que proporciona un perfil toxicológico beneficioso.

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que la presencia de una composición salina como se define en el presente documento conduce a un aumento significativo de la eficacia de transfección de formulaciones a base de lípidos del tipo usado en GL67A, que contiene ARN como ácido nucleico.

- 20 Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende

(i) partículas contenidas en una fase líquida, en la que las partículas comprenden ARN y una composición lipídica, y en la que la composición lipídica comprende:

(i-a) un derivado de colesterol de fórmula (I) o una sal del mismo:



- 25 en la que

$n$  es 0 o 1, preferentemente 0,

$R^1$  es un grupo  $-(CH_2)_q-NH_2$  o un grupo  $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$ ,

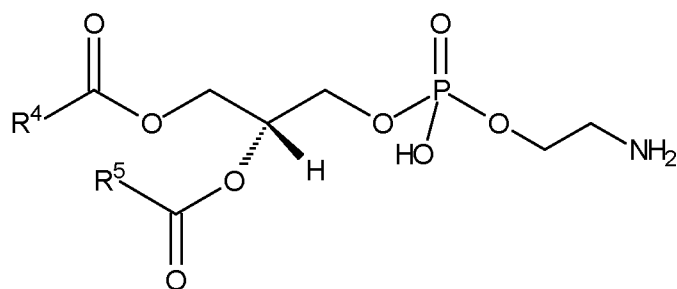
en la que  $q$ ,  $r$  y  $s$  son independientemente un número entero de 2 a 6,

$R^2$  es un grupo  $-(CH_2)_t-NH_2$  o un grupo  $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$ ,

- 30 en la que  $t$ ,  $u$  y  $w$  son independientemente un número entero de 2 a 6,

$R^3$  es un grupo alcanodiilo lineal que tiene de 1 a 4 átomos de carbono;

(i-b) un fosfoglicérido de fórmula (II) o una sal del mismo:



(II)

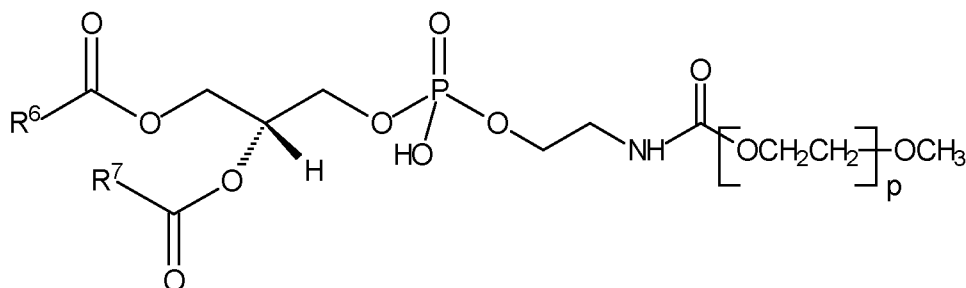
en la que

$R^4$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 20 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 20 átomos de carbono;

5  $R^5$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 20 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 20 átomos de carbono;

y

(i-c) un fosfoglicérido pegilado de fórmula (III) o una sal del mismo:



(III)

en la que

140  $p$  es un número entero de 5 a 200, preferentemente de 10 a 170 y con la máxima preferencia de 10 a

15  $R^6$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 20 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 20 átomos de carbono;

$R^7$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 20 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 20 átomos de carbono;

y

20 (ii) una composición salina disuelta en forma de cationes y aniones en la fase líquida, en la que la composición salina disuelta comprende uno o más cationes seleccionados de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{NH}_4^+$  y uno o más aniones seleccionados de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y en donde la concentración de los cationes de la composición salina disueltos en la fase líquida es de 1 a 1000 mM.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una composición de acuerdo con el primer aspecto descrito anteriormente, dicho procedimiento comprende las etapas de

25 a) disolver y mezclar los componentes de la composición lipídica en un solvente orgánico, seguido de la liofilización de la composición lipídica;

b) rehidratar la composición lipídica liofilizada a través de la adición de agua;

c) combinar la composición lipídica rehidratada con una solución acuosa del ARN para permitir que se formen las partículas que comprenden ARN y la composición lipídica que están contenidas en una fase líquida;

30 d) añadir la composición salina de manera que la composición salina se disuelva en forma de cationes y aniones en la fase líquida..

La adición de la composición salina puede lograrse convenientemente, por ejemplo, agregándolo junto con agua en la etapa b), agregándolo a la composición lipídica rehidratados siguiente a la etapa b), agregándolo junto con la solución acuosa del ARN en la etapa c), o agregándolo a la fase líquida siguiente a la etapa c), en la que están contenidas las partículas que comprenden ARN y la composición lipídica. Se apreciará que la adición puede llevarse a cabo en una etapa o en múltiples etapas, por ejemplo, en diferentes etapas del procedimiento.

A continuación, se proporcionará una descripción detallada de la invención y de sus aspectos discutidos anteriormente. Se apreciará en este contexto que estos aspectos están estrechamente interrelacionados. Por lo tanto, se entenderá que la información detallada que se proporciona con respecto a las características de un aspecto se aplicará también a otros aspectos que se basan en esta característica, a menos que se indique de otra manera.

## ARN

La composición de acuerdo con la invención comprenden ácido ribonucleico (ARN), con mayor preferencia ARN monocatenario, y con la máxima preferencia ARNm.

Con respecto al ARN, en principio puede emplearse cualquier tipo de ARN en el contexto de la presente invención. En una realización preferente, el ARN es un ARN monocatenario. El término "ARN monocatenario" significa una única cadena consecutiva de ribonucleótidos en contraste con las moléculas de ARN, en las que dos o más cadenas separadas forman una molécula bicatenaria debido a la hibridación de las cadenas separadas. El término "ARN monocatenario" no excluye que la molécula monocatenaria forme en sí misma estructuras bicatenarias, tales como estructuras secundarias (por ejemplo, bucles y tallo-bucles) o terciarias.

El término "ARN" cubre el ARN que codifica una secuencia de aminoácidos, así como el ARN que no codifica una secuencia de aminoácidos. Se ha sugerido que más del 80 % del genoma contiene elementos funcionales del ADN que no codifican proteínas. Estas secuencias no codificantes incluyen elementos de ADN reguladores (sitios de unión para factores de transcripción, reguladores y correguladores, etc.) y secuencias que codifican para transcritos que nunca se traducen en proteínas. Estos transcritos, que están codificados por el genoma y se transcriben en ARN pero no se traducen en proteínas, se denominan ARN no codificantes (ARNnc). Por lo tanto, en una realización, el ARN es un ARN no codificante. Preferentemente, el ARN no codificante es una molécula monocatenaria. Los estudios demuestran que los ARNnc son actores críticos en la regulación de los genes, el mantenimiento de la integridad genómica, la diferenciación celular y el desarrollo, y están mal regulados en diversas enfermedades humanas. Hay diferentes tipos de ARNnc: ARNnc cortos (20-50 nt), medianos (50-200 nt) y largos (>200 nt). El ARNnc corto incluye microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ipARN), ARN que interactúa con piwi (piARN) y ARN iniciador de la transcripción (itARN). Ejemplos de ncARN medianos son los ARN nucleares pequeños (npARN), los ARN nucleolares pequeños (nupARN), los ARN de transferencia (tARN), los ARN asociados al sitio de inicio de la transcripción (TSSaARN), los ARN pequeños asociados al promotor (PASR), y los transcritos corriente arriba del promotor (PROMPT). Los ARN no codificantes largos (ncIARN) incluyen ARN no codificante intergénico largo (ncilARN), ncIARN antisentido, ncIARN intrónico, ARN ultraconservados transcritos (T-UCR) y otros (Bhan A, Mandal SS, ChemMedChem. 26 de marzo de 2014. doi:10.1002/cmdc.201300534). De los ARN no codificantes mencionados anteriormente, sólo el ipARN es bicatenario. Por lo tanto, dado que en una realización preferente el ARN no codificante es monocatenario, es preferente que el ARN no codificante no sea ipARN. En otra realización, el ARN es un ARN codificante, es decir, un ARN que codifica una secuencia de aminoácidos. Tales moléculas de ARN también se refieren como ARNm (ARN mensajero) y son moléculas de ARN monocatenarias. El ARN puede prepararse mediante metodología de síntesis química y enzimática conocida por un experto en la técnica, o mediante el uso de tecnología recombinante, o pueden aislarse de fuentes naturales, o mediante una combinación de las mismas.

Los ARN mensajeros (ARNm) son copolímeros que están formados por bloques de construcción de fosfato de nucleósido principalmente con adenosina, citidina, uridina y guanosina como nucleósidos, que como portadores intermedios llevan la información genética del ADN en el núcleo de la célula al citoplasma, donde es traducido a proteínas. Ellos son, por lo tanto, adecuados como alternativas para la expresión genética.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que ARNm significa cualquier molécula de polirribonucleótido que, si entra en la célula, es adecuada para la expresión de una proteína o de un fragmento de la misma, o es traducible a una proteína o a un fragmento de la misma. El término "proteína" aquí abarca cualquier tipo de secuencia de aminoácidos, es decir, cadenas de dos o más aminoácidos que están unidos cada uno a través de enlaces peptídicos, y también incluye péptidos y proteínas de fusión.

El ARNm contiene una secuencia de ribonucleótidos que codifica una proteína o un fragmento de la misma cuya función en la célula, o en los alrededores de la célula, es necesaria o beneficiosa, por ejemplo, una proteína cuya falta o forma defectuosa es un desencadenante de una enfermedad o dolencia, cuya provisión puede moderar o prevenir una enfermedad o una dolencia, o una proteína que puede promover un proceso que es beneficioso para el cuerpo, en una célula o sus alrededores. El ARNm puede contener la secuencia de la proteína completa o una variante funcional de la misma. Además, la secuencia de ribonucleótidos puede codificar una proteína que actúa como factor, inductor, regulador, estimulador o enzima, o un fragmento funcional de la misma, donde esta proteína es una cuya función es necesaria para remediar un trastorno, en particular un trastorno metabólico, o para iniciar procesos in vivo, tales como la formación de nuevos vasos sanguíneos, tejidos, etc. Aquí, se entiende que variante funcional significa

un fragmento que en la célula puede asumir la función de la proteína cuya función en la célula es necesaria, o la falta o forma defectuosa de esta es patogénica. Además, el ARNm también puede tener otras regiones funcionales y/o regiones no codificantes 3' o 5'. Las regiones no codificantes 3' y/o 5' pueden ser las regiones que flanquean naturalmente la secuencia que codifica la proteína, o secuencias artificiales que contribuyen a la estabilización del ARN. Los expertos en la técnica pueden determinar las secuencias adecuadas para esto en cada caso mediante experimentos de rutina.

En una realización preferente, el ARNm contiene un capuchón 5' (5-prima-capuchón; capuchón-0) que consiste en un m7GpppG conectado al ARNm a través de 5' a un enlace 5' trifosfato, un grupo metilo adicional en el penúltimo nucleótido desde el extremo 5' del ARNm (Cap-1, Análogo Capuchón Anti-Sentido (ARCA)) y/o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y/o una cola poliA en el extremo 3', en particular, para mejorar la traducción. El ARNm puede tener otras regiones que promueven la traducción tales como, por ejemplo, estructuras cap-2 o estructuras de tallo-bucle de histonas.

Como se indicó anteriormente, a menos que se indique de otra manera en un contexto específico, el término ARNm como se usa en la presente memoria abarca ARNm modificado, es decir, el ARNm puede ser ARNm modificado.

En otra realización, el ARNm contiene ácidos nucleicos marcados (preferentemente, nucleótidos y/o ribonucleótidos) tales como, por ejemplo, isótopos y/o nucleótidos marcados con fluorescencia. Las moléculas de ARNm marcadas juegan, por ejemplo, un papel importante en el estudio de la conformación intracelular de moléculas de ARN y ADN.

En una realización preferente, el ARN, preferentemente el ARNm, es una molécula que contiene nucleótidos/ribonucleótidos modificados. Además de los cuatro ribonucleótidos clásicos, a saber, adenosina, guanosina, citidina y uridina, existen numerosos análogos de cada una de estas nucleobases. A veces a lo largo de la literatura, estos análogos, o moléculas de ARN/ARNm que incluyen uno o más de estos análogos, se refieren como modificados en términos de la presente invención (por ejemplo, nucleótidos modificados o ribonucleótidos modificados). Algunos análogos difieren de las nucleobases canónicas anteriores, pero aún pueden existir en la naturaleza. Otros análogos son de origen no natural. Se contempla cualquier tipo de análogo.

Las modificaciones preferentes se establecen en la siguiente tabla (Tabla 1):

Nombre	Modificación de la base (posición-5)	Modificación del azúcar (posición 2')	Naturalmente en ARNm
Uridina			
5-metiluridina 5'-trifosfato (m5U)	CH <sub>3</sub>	-	no
5-yodouridina 5'-trifosfato (I5U)	I	-	no
5-bromouridina 5'-trifosfato (Br5U)	Br	-	no
2-tiouridina 5'-trifosfato (S4U)	S (en la posición 2)	-	no
4-tiouridina 5'-trifosfato (S2U)	S (en la posición 4)	-	no
2'-metil-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'm)	-	CH <sub>3</sub>	si
2'-amino-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'NH <sub>2</sub> )	-	NH <sub>2</sub>	no
2'-azido-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'N <sub>3</sub> )	-	N <sub>3</sub>	no
2'-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'F)	-	F	no
Pseudouridina (ψ)	-	-	si
N1-metil-pseudouridina (N1mψ)	-	-	no
Citidina			
5-metilcitidina 5'-trifosfato (m5C)	CH <sub>3</sub>	-	si
5-yodocitidina 5'-trifosfato (I5U)	I	-	no
5-bromocitidina 5'-trifosfato (Br5U)	Br	-	no
2-tiocitidina 5'-trifosfato (S2C)	S (en la posición 2)	-	no
2'-metil-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'm)	-	CH <sub>3</sub>	si
2'-amino-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'NH <sub>2</sub> )	-	NH <sub>2</sub>	no
2'-azido-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'N <sub>3</sub> )	-	N <sub>3</sub>	no
2'-fluoro-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'F)	-	F	no
Adenosina			
N6-metiladenosina 5'-trifosfato (m6A)	CH <sub>3</sub> (en la posición 6)	-	si
N1-metiladenosina 5'-trifosfato (m1A)	CH <sub>3</sub> (en la posición 1)	-	no
2'-O-metiladenosina 5'-trifosfato (A2'm)	-	CH <sub>3</sub>	si
2'-amino-2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (A2'NH <sub>2</sub> )	-	NH <sub>2</sub>	no
2'-azido-2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (A2'N <sub>3</sub> )	-	N <sub>3</sub>	no
2'-fluoro-2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (A2'F)	-	F	no
Guanosina			
N1-metilguanosina 5'-trifosfato (m1G)	CH <sub>3</sub> (en la posición 1)	-	no
2'-O-metilguanosina 5'-trifosfato (G2'm)	-	CH <sub>3</sub>	si
2'-amino-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (G2'NH <sub>2</sub> )	-	NH <sub>2</sub>	no
2'-azido-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (G2'N <sub>3</sub> )	-	N <sub>3</sub>	no
2'-fluoro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (G2'F)	-	F	no

Para el ARN, preferentemente el ARNm, de acuerdo con la invención, todos los nucleótidos de uridina y los nucleótidos de citidina pueden modificarse cada uno de la misma forma, o puede usarse una mezcla de nucleótidos modificados para cada uno. Los nucleótidos modificados pueden tener modificaciones naturales o no naturales. Puede usarse una mezcla de varios nucleótidos modificados. Por lo tanto, por ejemplo, una parte de los nucleótidos modificados puede tener modificaciones naturales, mientras que otra parte tiene modificaciones que no ocurren naturalmente, o puede usarse una mezcla de nucleótidos modificados que ocurren naturalmente y/o que no ocurren naturalmente. Además, una parte de los nucleótidos modificados puede tener una modificación de la base y otra parte una modificación del azúcar. De la misma manera, es posible que todas las modificaciones sean modificaciones de la base, o todas las modificaciones sean modificaciones del azúcar, o cualquier mezcla adecuada de los mismos. Al variar las modificaciones, puede ajustarse selectivamente la estabilidad y/o la duración de acción del ARN, preferentemente el ARNm, de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención, se usan al menos dos modificaciones diferentes para un tipo de nucleótido, donde un tipo de nucleótido modificado tiene un grupo funcional a través del que pueden unirse otros grupos. También pueden usarse nucleótidos con diferentes grupos funcionales, con el fin de proporcionar sitios de unión para la unión de diferentes grupos. Por lo tanto, por ejemplo, una parte de los nucleótidos modificados puede tener un grupo azido, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un grupo tiol o algún otro grupo reactivo que sea adecuado para la reacción en condiciones predefinidas. El grupo funcional también puede ser tal que, bajo determinadas condiciones, pueda activar un grupo presente de forma natural capaz de unirse, de modo que puedan acoplarse moléculas con funciones. Los nucleótidos que se modifican para que proporcionen sitios de unión también pueden introducirse como modificaciones de adenosina o guanosina. La selección de las modificaciones adecuadas particulares y la selección de los sitios de unión que se pondrán a disposición dependen de qué grupos se van a introducir y con qué frecuencia van a estar presentes. Por lo tanto, el contenido de nucleótidos provistos de grupos funcionales y/o activantes depende de qué tan alto sea el contenido de grupos a acoplar y puede ser determinado fácilmente por los expertos en la técnica. Por regla general, el contenido de nucleótidos modificados con grupos funcionales y/o activadores, si están presentes, es de 1 a 25 % de los nucleótidos modificados. Los expertos en la técnica pueden determinar, si es necesario, los grupos más adecuados en cada caso y el contenido óptimo de los mismos, mediante experimentos de rutina.

En una realización preferente, el ARN, preferentemente el ARNm de acuerdo con la invención se caracteriza porque

las uridinas modificadas son seleccionadas de 2-tiouridina, 5-metiluridina, pseudouridina, 5-metiluridina 5'-trifosfato (m5U), 5-idouridina 5'-trifosfato (I5U), 4-tiouridina 5'-trifosfato (S4U), 5-bromouridina 5'-trifosfato (Br5U), 2'-metil-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'm), 2'-amino-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'NH<sub>2</sub>), 2'-azido-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'N<sub>3</sub>) y 2'-fluoro-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (U2'F).

5 En otra realización preferente, el ARN, preferentemente el ARNm de acuerdo con la invención se caracteriza porque las citidinas modificadas son seleccionadas de 5-metilcitidina, 3-metilcitidina, 2'-tio-citidina, 2'-metil-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'm), 2'-amino-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'NH<sub>2</sub>), 2'-fluoro-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'F), 5-yodocitidina 5'-trifosfato (I5U), 5-bromocitidina 5'-trifosfato (Br5U) y 2'-azido-2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (C2'N<sub>3</sub>).

10 En una realización preferente, el ARNm es un ARNm que contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados. Preferentemente, es un ARNm que contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados como se describe en el documento WO2011/012316. Se informa que el ARNm descrito en el mismo muestra una estabilidad aumentada y una inmunogenicidad disminuida. En una realización preferente, tal que en un ARNm modificado se modifica de 5 a 50 % de los nucleótidos de citidina y de 5 a 50 % de los nucleótidos de uridina. Los nucleótidos que contienen adenosina y guanosina pueden ser no modificados. Los nucleótidos de adenosina y  
15 guanosina pueden ser no modificados o ser parcialmente modificados, y preferentemente están presente en forma no modificada. Preferentemente de 10 a 35 % de los nucleótidos de citidina y uridina están modificados, y de manera particularmente preferente el contenido de los nucleótidos de citidina modificados se encuentra en un intervalo de 7,5 a 25 %, y el contenido de nucleótidos de uridina modificados en un intervalo de 7,5 a 25 %. Se ha encontrado que, de hecho, un contenido relativamente bajo, por ejemplo, solo el 10 % de los nucleótidos de citidina y uridina modificados  
20 puede lograr las propiedades deseadas. Es particularmente preferente que los nucleótidos de citidina modificados sean los residuos de 5-metilcitidina, y los nucleótidos de uridina modificados son residuos de 2-tiouridina. Con la máxima preferencia, el contenido de nucleótidos de citidina modificados y el contenido de nucleótidos de uridina modificados es de 25 %, respectivamente.

25 En ciertas otras realizaciones, en tal ARN modificado, preferentemente ARNm, de 5 a 50 % de las citidinas son análogos de C y de 5 a 50 % de las uridinas son análogos de U. En ciertas realizaciones, en tal ARN modificado, preferentemente ARNm, de 5 a 40 % de las citidinas son análogos de C y de 5 a 40 % de las uridinas son análogos de U. En ciertas realizaciones, en tal ARN modificado, preferentemente ARNm, de 5 a 30 % de las citidinas son análogos de C y de 5 a 30 % de las uridinas son análogos de U. En ciertas realizaciones, en tal ARN modificado, preferentemente ARNm, de 10 a 30 % de las citidinas son análogos de C y de 10 a 30 % de las uridinas son análogos de U. En ciertas realizaciones, en tal ARN modificado, preferentemente ARNm, de 5 a 20 % de las citidinas son análogos de C y de 5 a 20 % de las uridinas son análogos de U. En ciertas realizaciones, en tal ARN modificado, preferentemente ARNm, de 5 a 10 % de los nucleótidos de citidina y de 5 a 10 % de los nucleótidos de uridina son modificados. En ciertas realizaciones, en tal ARNm modificado, preferentemente ARNm, se modifican el 25 % de los nucleótidos de citidina y el 25 % de los nucleótidos de uridina. En ciertas realizaciones, los nucleótidos que contienen  
35 adenosina y guanosina pueden ser no modificados. En ciertas realizaciones, los nucleótidos de adenosina y guanosina pueden ser no modificados o parcialmente modificados, y están presentes preferentemente en forma no modificada. Como se señaló anteriormente, en ciertas realizaciones, los análogos de U se refieren a un solo tipo de análogo de U. En ciertas realizaciones, los análogos de U se refieren a dos o más tipos de análogos de U. En ciertas realizaciones, los análogos de C se refieren a un solo tipo de análogo de C. En ciertas realizaciones, análogos de C se refiere a dos o más tipos de análogos de C.

40 En ciertas realizaciones, el porcentaje de citidinas en un ARN, preferentemente un ARNm que son análogos de citidina, no es el mismo que el porcentaje de uridinas en el ARN, preferentemente en el ARNm que son análogos de uridina. En ciertas realizaciones, el porcentaje de análogos de citidina es menor que el porcentaje de análogos de uridina. Como se indicó anteriormente, esto puede ocurrir en presencia o ausencia de análogos de adenosina y guanosina pero, en ciertas realizaciones, es en ausencia de análogos de adenosina y análogos de guanosina. En ciertas realizaciones, el ARN, preferentemente el ARNm de la divulgación comprende menos de 15 %, menos del 10 %, menos de 5 % o menos de 2 % de análogos de adenosina, análogos de guanosina o ambos.

45 En ciertas realizaciones, un ARN, preferentemente un ARNm de la presente invención comprende análogos de citidina y análogos de uridina, y de 5 a 20 % de las citidinas son análogos de citidina, y de 25 a 45 % de las uridinas son análogos de uridina. En otras palabras, el ARN, preferentemente el ARNm comprende citidinas modificadas y no modificadas y uridinas modificadas y no modificadas, y de 5 a 20 % de las citidinas comprenden análogos de citidina mientras que de 25 a 45 % de las uridinas comprenden análogos de uridina. En otras realizaciones, el ARN, preferentemente el ARNm comprende de 5 a 10 % de análogos de citidina y de 30 a 40 % de análogos de uridina, tal como 7-9 % de análogos de citidina, tal como aproximadamente 7, 7,5 u 8 % y, tal como 32-38 % de análogos de  
55 uridina, tal como aproximadamente 33, 34, 35, 36 %.

En ciertas realizaciones, puede usarse cualquiera de los análogos de uridina y los análogos de citidina descritos en la presente memoria, la pseudouridina puede excluirse opcionalmente. En ciertas realizaciones, el análogo de citidina comprende o consiste en (por ejemplo, en el caso de consiste en, es el tipo de análogo único usado) 5-yodocitidina y el análogo de uridina comprende o consiste en (por ejemplo, en el caso de consiste en, es el tipo de análogo único usado) 5-yodouridina.

60 En ciertas realizaciones de cualquiera de los anteriores, el porcentaje de análogos de un nucleótido dado se refiere al porcentaje de entrada (por ejemplo, el porcentaje de análogos en una reacción inicial, tal como una reacción de transcripción in vitro inicial). En ciertas realizaciones de cualquiera de las precedentes, el porcentaje de análogos de

un nucleótido dado se refiere a la producción (por ejemplo, el porcentaje en un compuesto sintetizado o transcrito). Ambas opciones están igualmente contempladas.

El ARN, preferentemente las moléculas de ARNm de la presente invención pueden producirse de forma recombinante en sistemas *in vivo* mediante procedimientos conocidos por un experto en la técnica.

- 5 Alternativamente, el ARN modificado, preferentemente las moléculas de ARNm de la presente invención pueden producirse en un sistema *in vitro* al utilizar, por ejemplo, un sistema de transcripción *in vitro* que es conocido por el experto en la técnica. Un sistema de transcripción *in vitro* capaz de producir ARN, preferentemente ARNm, requiere una mezcla de entrada de nucleósidos trifosfatos modificados y no modificados para producir ARN modificado, preferentemente moléculas de ARNm con las propiedades deseadas de la presente invención. En ciertas
- 10 realizaciones, de 5 a 50 % de las citidinas son análogos de citidina en tal mezcla de entrada, y de 5 a 50 % de las uridinas son análogos de uridina en tal mezcla de entrada. En ciertas realizaciones, de 5 a 40 % de las citidinas son análogos de citidina en tal mezcla de entrada, y de 5 a 40 % de las uridinas son análogos de uridina en tal mezcla de entrada. En ciertas realizaciones, de 5 a 30 % de las citidinas son análogos de citidina en tal mezcla, y de 5 a 30 % de las uridinas son análogos de uridina en tal mezcla de entrada. En ciertas realizaciones, de 5 a 30 % de las citidinas son análogos de citidina en tal mezcla, y de 10 a 30 % de las uridinas son análogos de uridina en tal mezcla. En ciertas
- 15 realizaciones, de 5 a 20 % de las citidinas son análogos de citidina en tal mezcla de entrada, y de 5 a 20 % de las uridinas son análogos de uridina en tal mezcla de entrada. En ciertas realizaciones, de 5 a 10 % de las citidinas son análogos de citidina en tal mezcla de entrada, y de 5 a 10 % de las uridinas son análogos de uridina en tal mezcla de entrada. En ciertas realizaciones, el 25 % de las citidinas son análogos de citidina en tal mezcla de entrada, y el 25 % de las uridinas son análogos de uridina en tal mezcla de entrada. En ciertas realizaciones, la mezcla de entrada no comprende análogos de adenosina y/o guanosina. En otras realizaciones, opcionalmente, la mezcla de entrada comprende uno o más análogos de adenosina y/o guanosina (o ninguno de ellos o ambos).
- 20 En ciertas realizaciones, el porcentaje de citidinas en una mezcla de entrada que son análogos de citidina no es el mismo que el porcentaje de uridinas en una mezcla de entrada que son análogos de uridina. En ciertas realizaciones, el porcentaje de análogos de citidina en una mezcla de entrada es menor que el porcentaje de análogos de uridina en una mezcla de entrada. Como se indicó anteriormente, esto puede ocurrir en presencia o ausencia de análogos de adenosina y guanosina en la mezcla de entrada pero, en ciertas realizaciones, es en ausencia de análogos de adenosina y análogos de guanosina en la mezcla de entrada.
- 25 En ciertas realizaciones, una mezcla de entrada de nucleótidos para un sistema de transcripción *in vitro* que produce un ARN, preferentemente el ARNm de la presente invención comprende análogos de citidina y análogos de uridina, y de 5 a 20 % de las citidinas de la mezcla de entrada son análogos de citidina, y de 25 a 45 % de las uridinas de la mezcla de entrada son análogos de uridina. En otras palabras, la mezcla de entrada comprende citidinas modificadas y no modificadas y uridinas modificadas y no modificadas, y de 5 a 20 % de las citidinas de la mezcla de entrada comprenden análogos de citidina mientras que de 25 a 45 % de las uridinas de la mezcla de entrada comprenden
- 30 análogos de uridina. En otras realizaciones, la mezcla de entrada comprende de 5 a 10 % de análogos de citidina y de 30 a 40 % de análogos de uridina, tal como 7-9 % de análogos de citidina, tal como 7, 7,5 u 8 % y, tal como 32-38 % de análogos de uridina, tal como 33, 34, 35, 36 %.
- 35 En ciertas realizaciones, puede usarse cualquiera de los análogos de uridina y los análogos de citidina descritos en la presente memoria, la pseudouridina puede excluirse opcionalmente. En ciertas realizaciones, el análogo de citidina comprende o consiste en (por ejemplo, es el tipo de análogo de C único usado) 5-yodocitidina y el análogo de uridina comprende o consiste en (por ejemplo, es el tipo de análogo de U simple usado) 5-yodouridina.
- 40 Los análogos ejemplares se describen en las tablas anteriores. Debe entenderse que para los polirribonucleótidos modificados que codifican el polipéptido deseado (módulo (a)), los análogos y el nivel de modificación se consideran, a menos que se indique de otra manera, en todo el polirribonucleótido que codifica el polipéptido deseado (módulo (a)), lo cual incluye las regiones no traducidas 5' y 3' (por ejemplo, el nivel de modificación es en base al intervalo de entrada de análogos en una reacción de transcripción *in vitro*, de tal manera que los análogos pueden incorporarse en las posiciones que se transcriben).
- 45 Además, el ARN modificado, preferentemente las moléculas de ARNm, pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo, mediante síntesis química convencional en un sintetizador automático de secuencias de nucleótidos, al utilizar un soporte en fase sólida y técnicas estándar, o mediante síntesis química de las respectivas secuencias de ADN y transcripciones posteriores, *in vitro* o *in vivo*, del mismo.
- 50

En otra realización preferente, el ARNm puede combinarse con sitios de unión a diana, secuencias de diana y/o con sitios de unión a microARN, para permitir la actividad del ARNm deseado solo en las células relevantes. En una realización preferente adicional, el ARN puede combinarse con microARN o shARN corriente abajo de la cola 3' poliA.

- 55 En general, los efectos terapéuticos pueden lograrse mediante la interacción del ácido ribonucleico con moléculas y organelos celulares. Tal interacción sola puede, por ejemplo, activar el sistema inmune innato, como es el caso de ciertos oligonucleótidos CpG y secuencias diseñadas para interactuar específicamente con receptores de tipo toll, y otros receptores extra o intracelulares. Además, la captación o la introducción de ácidos ribonucleicos (preferentemente los ARNm) en las células puede pretender dirigir la expresión de secuencias de nucleótidos, tales como genes comprendidos en el ácido ribonucleico (preferentemente el ARNm), puede pretender la regulación
- 60 negativa, a silenciar o anular la expresión genética endógena como consecuencia de la presencia intracelular de un ácido nucleico exógeno introducido, o puede pretender la modificación de secuencias de ácido nucleico endógeno tales como reparación, escisión, inserción o intercambio de bases seleccionadas o de tramos completos de secuencias del ácido nucleico endógeno, o puede pretender interferir con prácticamente cualquier proceso celular como



consecuencia de la presencia intracelular y la interacción de un ácido ribonucleico exógeno introducido (preferentemente un ARNm). La sobreexpresión de ácidos ribonucleicos exógenos introducidos (preferentemente los ARNm) puede pretender compensar o complementar la expresión genética endógena, en particular en los casos en los que un gen endógeno es defectuoso o silencioso, lo que conduce a un producto de la expresión genética nula, insuficiente o defectuosa o disfuncional, tal como es el caso con muchas enfermedades metabólicas y hereditarias, como fibrosis quística, hemofilia o distrofia muscular, por nombrar algunas. La sobreexpresión de ácidos ribonucleicos exógenos introducidos (preferentemente los ARNm) también puede pretender que el producto de la expresión interactúe o interfiera con cualquier proceso celular endógeno, tal como la regulación de la expresión génica, la transducción de señales y otros procesos celulares. La sobreexpresión de ácidos ribonucleicos exógenos introducidos (preferentemente los ARNm) también puede pretender dar lugar a una respuesta inmune en el contexto del organismo en el que reside o se hace residir a una célula transfectada o transducida. Son ejemplos, la modificación genética de células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, para que presenten un antígeno con fines de vacunación. Otros ejemplos son, la sobreexpresión de citocinas en tumores para provocar una respuesta inmune específica al tumor. Además, la sobreexpresión de ácidos ribonucleicos exógenos introducidos (preferentemente los ARNm) también puede pretender generar células genéticamente modificadas de forma transitoria, in vivo o ex vivo, para terapias celulares, tales como células T modificadas o precursoras, o células madre u otras células para medicina regenerativa.

La regulación negativa, el silenciamiento o la desactivación de la expresión genética endógena con fines terapéuticos puede lograrse, por ejemplo, mediante la interferencia de ARN (iARN), con ribozimas, oligonucleótidos antisentido, tARN, ARN bicatenario largo donde tal regulación negativa puede ser específica o inespecífica de secuencia, y también puede conducir a la muerte celular, como es el caso cuando se introducen ARN bicatenarios largos en las células. La regulación negativa, el silenciamiento o la eliminación de la expresión genética endógena o pre-existente puede ser útil en el tratamiento de enfermedades adquiridas, hereditarias o que se contraen espontáneamente, incluidas infecciones virales y cáncer. También puede preverse que la introducción de ácidos nucleicos en las células pueda practicarse como medida preventiva para prevenir, por ejemplo, infecciones virales o neoplasias. La regulación negativa, el silenciamiento o la eliminación de la expresión genética endógena puede ejercerse a nivel transcripcional y a nivel traduccional. Los expertos en la técnica conocen múltiples mecanismos e incluyen, por ejemplo, modificaciones epigenéticas, cambios en la estructura de la cromatina, unión selectiva de factores de transcripción por el ácido nucleico introducido, hibridación del ácido nucleico introducido con secuencias complementarias en ADN genómico, ARNm u otras especies de ARN por apareamiento de bases, incluidos mecanismos de apareamiento de bases no convencionales, tal como la formación de triple hélice. De manera similar, la reparación de genes, los cambios de base o de secuencia pueden lograrse a nivel genómico y a nivel de ARNm, incluida la omisión de exón. Los cambios de base o de secuencia pueden lograrse, por ejemplo, mediante la escisión del ADN de un sitio específico guiado por ARN, mediante mecanismos de corte y empalme que aprovechan el trans-empalme, el trans-empalme en ribozimas, los quimeraplastos, el trans-empalme de ARN mediado por espirosomas o al aprovechar el grupo II o los intrones reorientados, o al aprovechar la mutagénesis de inserción mediada por virus, o al aprovechar la inserción genómica dirigida mediante el uso de sistemas de integrasa procariota, eucariota o viral. Como los ácidos nucleicos son los portadores de los planes de construcción de los sistemas vivos y participan en muchos procesos celulares de manera directa e indirecta, en teoría cualquier proceso celular puede verse influido por la introducción de ácidos nucleicos en las células desde el exterior. En particular, esta introducción puede llevarse a cabo directamente in vivo y ex vivo en cultivo de células u órganos, seguido del trasplante de tales órganos o células modificados a un receptor. Las partículas para su uso en el contexto de la presente invención, con ácidos nucleicos como agente terapéuticamente activo, pueden ser útiles para todos los propósitos descritos anteriormente.

Como se mencionó anteriormente, el ARNm puede contener preferentemente una secuencia de ribonucleótidos que codifica una proteína o un fragmento de la misma cuya función en la célula, o en los alrededores de la célula, es necesaria o beneficiosa, por ejemplo, la pérdida o la forma defectuosa de una proteína que desencadena una enfermedad o dolencia, que al proveerse puede moderar o prevenir una enfermedad o una dolencia, o una proteína que puede promover un proceso que es beneficioso para el cuerpo, en una célula o sus alrededores.

De hecho, en los últimos años, el ARN (en particular, el ARNm) se ha vuelto cada vez más relevante como una nueva entidad farmacológica. A diferencia de la terapéutica genética basada en ADN, el ARNm no necesita ser transportado al núcleo, sino que se traduce directamente a proteína en el citoplasma (J Control Release, 2011, 150:238-247, y Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71:484-489).

Además, se conocen numerosos trastornos genéticos, causados por la mutación de un solo gen, y son candidatos para enfoques terapéuticos de ARN, preferentemente el ARNm. Los trastornos causados por mutaciones de un solo gen, como la fibrosis quística, la hemofilia y muchos otros, pueden ser dominantes o recesivos con respecto a la probabilidad de que un determinado rasgo aparezca en la descendencia. Mientras que un alelo dominante manifiesta un fenotipo en individuos que tienen solo una copia del alelo, para un alelo recesivo el individuo debe tener dos copias, una de cada padre para manifestarse. Por el contrario, los trastornos poligénicos son causados por dos o más genes, y la manifestación de la enfermedad respectiva suele ser fluida y asociada a factores ambientales. Ejemplos de trastornos poligénicos son hipertensión, nivel elevado de colesterol, cáncer, trastornos neurodegenerativos, enfermedades mentales y otros. También en estos casos, el ARN terapéutico, preferentemente el ARNm, que representa uno o más de estos genes, puede ser beneficioso para esos pacientes. Además, un trastorno genético no tiene que haberse transmitido de los genes de los padres, sino que también puede ser causado por nuevas

mutaciones. También en estos casos, el ARN terapéutico, preferentemente el ARNm, que representa la secuencia genética correcta, puede ser beneficioso para los pacientes.

Un catálogo en línea con 22,993 entradas de Genes Humanos y Trastornos Genéticos junto con los genes respectivos y la descripción de sus fenotipos están disponibles en la página web de ONIM (Herencia Mendeliana del Hombre en Línea) (<http://onim.org>); las secuencias de cada uno están disponibles de la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Como ejemplos no limitantes, la siguiente **Tabla 2** enumera algunas enfermedades congénitas y el(los) gen(es) correspondiente(s). Debido al alto grado de interacción de las vías de señalización celular, la mutación de un determinado gen causa una multiplicidad de síntomas patológicos, de los cuales solo se enumera uno característico en la **Tabla 2**.

En algunas realizaciones de la presente invención, la proteína terapéutica que está codificada por el ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención se elige de las proteínas celulares enumeradas en la **Tabla 2**. Por lo tanto, la molécula de ARN, preferentemente el ARNm, de la invención puede codificar una proteína celular terapéutica, en la que la proteína terapéutica codificada es una de las listadas en la **Tabla 2** o un homólogo de la misma.

En otra realización de la presente invención, la proteína terapéutica que está codificada por el ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención se elige de las proteínas secretadas enumeradas en la **Tabla 2**. Por lo tanto, el ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención puede codificar una proteína de fusión terapéutica, en la que la proteína terapéutica codificada o un homólogo de la misma es una de las listadas en la **Tabla 2**, y la segunda proteína es un péptido señal que permite la secreción de la proteína terapéutica. Un péptido señal es una secuencia de aminoácidos corta, típicamente de 5-30 aminoácidos de longitud, presente en el extremo N-terminal de dicha proteína terapéutica y que conduce a la proteína de fusión hacia la vía secretora de la célula a través de ciertos orgánulos (es decir, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi o los endosomas). Por lo tanto, dicha proteína de fusión se secreta a partir de la célula o de un orgánulo celular o se inserta en una membrana celular (por ejemplo, proteínas transmembrana multicapa) en un compartimento celular o en la superficie celular.

Por lo tanto, en realizaciones preferentes de la presente invención, el ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención puede codificar, pero no se limita a, las siguientes proteínas de los genes que causan, predisponen o protegen de enfermedades. Los ejemplos no limitantes de tales trastornos que pueden tratarse (o prevenirse), incluidos aquellos en los que dicho polipéptido, proteína o péptido se selecciona del grupo que consiste en los que se describen en la siguiente **Tabla 2**.

En algunas realizaciones, la secuencia codificante del ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención puede transcribirse y traducirse en una proteína de longitud parcial o completa que comprende actividad celular a un nivel igual o mayor que el de la proteína nativa. En algunas realizaciones, el ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención codifica un polipéptido farmacéuticamente o terapéuticamente activo, proteína o péptido que tengan un efecto preventivo o terapéutico, en el que dicho polipéptido, proteína o péptido se selecciona del grupo que consiste en los que se describen en la siguiente **Tabla 2**. El ARN, preferentemente el ARNm, más específicamente la secuencia codificante del mismo, puede usarse para expresar una proteína de longitud parcial o completa, con actividad celular a un nivel igual o menor que el de la proteína nativa. Esto puede permitir el tratamiento de enfermedades para las que puede estar indicada la administración de una molécula de ARN.

**Tabla 2:** Ejemplos no limitativos de genes humanos y trastornos genéticos

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
<b>Enfermedades de la sangre</b>		
Anemia de Fanconi	Anemia y neutropenia, evidencia de que un mecanismo de reparación del ADN está afectado	FANCA, autosómica recesiva
Hemofilia-A	Sangrado anormal	Factor de coagulación VIII, cromosoma X recesiva
Hemofilia-B	Sangrado anormal	Factor de coagulación IX, cromosoma X recesiva
Esferocitosis Hereditaria (varios tipos)	eritrocitos de forma esférica (esferocitos)	Anquirina (ANK1)
Hemoglobinuria paroxística nocturna	Anemia y presencia de sangre en la orina	PIG-A, cromosoma X
Porfiria cutánea tarda	Sobreproducción de hemo, sobrecarga de hierro	Uroporfirinógeno descarboxilasa (UROD), autosómica recesiva
Inmunodeficiencia severa combinada (SCID)	Debido a la síntesis defectuosa del ADN hay una	Adenosina desaminasa, autosómica recesiva, IL-2R- $\gamma$ ,

	inmunodeficiencia severa en la inmunidad humoral y celular	JAK3, (IL-7R- $\alpha$ , RAG1/2, Artemisa, CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$
Anemia falciforme	Hemoglobina anormal (HbS)	$\beta$ -Hemoglobina (HB), autosómica recesiva
Talasemia (forma $\alpha$ y $\beta$ )	Falta de hemoglobina $\alpha$ o $\beta$ que provoca anemia	Eliminación de HBA1 y/o HBA2,
Enfermedad de von Willebrand (tres tipos conocidos, el tipo III es el más severo)	Sangrado anormal, hemorragia similar a la hemofilia A y B	Formas autosómicas dominantes y recesivas
<b>Cáncer</b>		
Melanoma maligno	La mutación P16 conduce a la proliferación descontrolada de fibroblastos	Inhibidor de quinasa dependiente de Ciclina 2 (CDKN2)
Neurofibromatosis (2 tipos)	Los tumores benignos en los nervios auditivos conduce a la sordera	NF1, NF2, autosómico dominante
<b>Sordera (oído)</b>		
Sordera	Pérdida de la audición	Sordera-1A (DFNB1), autosómica recesiva
Síndrome de Pendred	Pérdida de la audición	Pendrina (PDS), autosómica recesiva
<b>Corazón</b>		
Ataxia telangiectasia	Alterada reparación de daños en el ADN,	ATM,
Ateroesclerosis	Aumento del colesterol en sangre	apoE,
Síndrome de LQT (QT largo)	Defecto del canal de potasio	LQT1 y otros genes
Síndrome de von-Hippel Lindau	Crecimiento anormal de vasos sanguíneos, que puede provocar cáncer	VHL, autosómica dominante
Síndrome de William Beuren	La delección de elastina da como resultado defectos vasculares, estenosis aórtica supravalvular	Delección de genes de elastina y LIM quinasa
<b>Trastornos metabólicos y enfermedades por almacenamiento de glucógeno</b>		
Adrenoleucodistrofia	Transporte y metabolismo de ácidos grasos alterados	ABCD1, cromosoma X
Alcaptonuria	Defecto del metabolismo del nitrógeno, la orina se oscurece cuando se expone al oxígeno	Oxidasa homogentísica, autosómica recesiva
Diabetes tipo I	Producción alterada de insulina	IDDM1, IDDM2, GCK,...
Galactosemia	trastorno del metabolismo de la galactosa	Gen de la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT), autosómica recesiva
Enfermedad de Gaucher	Alteración del metabolismo de las grasas	Glucocerebrosidasa
Malabsorción de glucosa y galactosidasa	Transporte alterado de glucosa y galactosa fuera de la luz intestinal que resulta en diarrea	SGLT1, autosómica recesiva
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo I, enfermedad de Von-Gierke	Acumulación de glucosa en hígado y riñón	Glucosa-6-Fosfatasa, autosómica recesiva
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II, enfermedad de Pompe	Acumulación de glucógeno en hígado, corazón, músculo esquelético, cardiomegalia	$\alpha$ -1-Glucosidasa, autosómica recesiva
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo III, enfermedad de Cori	Acumulación de glucógeno en hígado, corazón, músculo esquelético, hepatomegalia	Enzima desramificante, autosómica recesiva

Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo V, enfermedad de McArdle	No puede usarse el glucógeno en las células musculares.	Fosforilasa muscular, autosómica recesiva
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	La incapacidad para mantener el glutatión conduce a anemia hemolítica	G6PD, cromosoma X recesiva
Hemocromatosis hereditaria (tipo 4)	Exceso de hierro en el cuerpo (especialmente hígado) debido a una absorción excesiva de hierro en el intestino	Hemocromatosis (HFE)
Homocistinuria	Defecto del metabolismo del nitrógeno	Defecto de la cistación sintetasa, autosómica recesiva
Síndrome de Lesch Nyhan	Acumulación de ácido úrico que conduce a gota, cálculos de ureato y pérdida de masa muscular.	HPRT1, cromosoma X
Enfermedad de la Orina con Jarabe de Arce	El defecto del metabolismo de los aminoácidos conduce a la acumulación de $\alpha$ -cetoácidos, y a la muerte en los primeros meses si no se trata	Alfa deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDH)
Síndrome de Menkes	Capacidad reducida para absorber cobre, conduce a la muerte en la infancia si no se trata	ATP7A, cromosoma X recesiva
Obesidad	Peso corporal elevado	Los niveles elevados de leptina poligénica pueden influir
Fenilketonuria	La incapacidad para descomponer la fenilalanina en tirosina conduce a retraso mental	Fenilalanina hidroxilasa (PAH), autosómica recesiva
Enfermedad de Tangier	niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad en el plasma	Gen del casete 1 de unión a ATP (ABCA1)
Síndrome de Zellweger (conduce a la muerte en los bebés)	Niveles altos de hierro y cobre en sangre	PXR1 (receptor en la superficie de los peroxisomas)
Enfermedad de Wilson	Acumulación de cobre en el cerebro y el hígado	ATP7B (ATPasa tipo P), autosómica recesiva
<b>Sistema musculoesquelético</b>		
Acondroplasia	Estatura baja con cabeza grande debido a la lenta proliferación de condrocitos	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF3R),
Síndrome de Charcot-Marie-Tooth y su forma más grave Síndrome de Dejerine-Sottas	Degeneración de los músculos de las extremidades	Diferentes formas causadas por diferentes mutaciones genéticas, autosómica recesiva y cromosoma X
Síndrome de Cockayne (tipo 2)	Envejecimiento prematuro y baja estatura, pérdida de la reparación "sobre la marcha" del ADN	proteína de complemento cruzado de reparación de escisión del grupo 8 (ERCC8)
Displasia condroectodérmica	Malformación de huesos y polidactilia	EVC, autosómica recesiva
Displasia diastrófica (DTD)	Manos malformadas, defecto del transportador de sulfato	Gen DTDST
Distrofia muscular de Duchenne	Agrandamiento del tejido muscular con posterior pérdida de función	DMD, cromosoma X recesiva
Fibrodisplasia Osificante Progresiva	Formación de hueso heterotópico	NOG, BMP, autosómica dominante
Ataxia de Friedreich	Agrandamiento del corazón y pérdida progresiva de la coordinación muscular	Frataxina, autosómica recesiva

Hipofosfatasa	Producción de una versión anormal de fosfatasa alcalina que afecta el procedimiento de mineralización	ALPL, autosómica recesiva
Síndrome de Marfán	Trastorno del tejido conectivo por deficiencia de fibrilina	Fibrilina 1 (FBN), autosómica dominante
Distrofia miotónica (inicio durante la edad adulta temprana)	Defecto de la proteína quinasa en las células del músculo esquelético	Distrofia miotónica proteína quinasa (DMPK), autosómica dominante
Osteogénesis imperfecta (varios tipos)	El defecto en la formación de colágeno tipo I conduce a múltiples fracturas después del nacimiento	COL1A1, COL1A2
Síndrome de Prader-Willi	Disminución del tono muscular y retraso mental	SNRPN (ribonucleoproteína N pequeña) eliminada debido a una deleción en el cromosoma 15
<b>Neuronas y cerebro</b>		
Enfermedad de Alzheimer	Aumento de la producción de amiloide, incapacidad progresiva para recordar hechos	Poligénico, PS1, PS2,...
Esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (varias formas)	Degeneración progresiva de las células neuronales motoras (defecto en la eliminación de radicales superóxido)	Superóxido dismutasa 1 (SOD1), varios genes implicados
Síndrome de Angelman	Retraso mental con risa inadecuada	Impresión genómica en el cromosoma 15
Piruvato deshidrogenasa	Defectos neurológicos si no se trata	Piruvato deshidrogenasa, autosómica recesiva
Enfermedad de Refsum	La acumulación de ácido fitánico conduce a una neuropatía periférica	Fitanoil-CoA hidroxilasa (PHYH), autosómica recesiva
Síndrome de Rett	Retraso mental con desarrollo detenido entre los 6 y los 18 meses de edad	Proteína 2 de unión a metil-CpG (MECP2), cromosoma X dominante
Enfermedad de Tay-Sachs (varias formas de gravedad)	La descomposición alterada del gangliósido GM2 conduce a daño neurológico	HEXA ( $\beta$ -hexosaminidas A), autosómica recesiva
Enfermedad de LaFora	Forma agresiva de epilepsia	EPM2A, autosómica recesiva
Temblor esencial (formas variables)	Temblor incontrolable	ETM1, ETM2, autosómica dominante
Síndrome X Frágil	Falta de proteína de unión a ARN FMR1, retraso mental	El gen FMR1 no se expresa debido a una amplificación CGG en la región 5' UTR
Enfermedad de Huntington	Demencia progresiva que comienza en la edad adulta	HTT (huntingtina), autosómica dominante
<b>Intestino</b>		
Síndrome de Bartter (tipo 3)	Enfermedad renal	Gen del canal B del cloruro de riñón (CLCNKB), autosómica recesiva
Enfermedad renal poliquística (tipo 2)	enfermedad renal	PDK1, PDK2, autosómica dominante, también se conoce una forma autosómica recesiva (ARPKD)
<b>Pulmón</b>		
Alfa-1-antitripsina	Alvéolos defectuosos debido a la liberación incontrolada de elastasa	SERPINA1, autosómica codominante
Asma	Trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias	Poligénico

Fibrosis quística	Mucosidad excesivamente viscosa debido al transporte defectuoso de iones Cl <sup>-</sup>	CFTR (regulador transmembrana de la conductancia de la fibrosis quística), autosómica recesiva
Disfunción del metabolismo de los surfactantes (varios tipos)	Los recién nacidos tienen un peso corporal normal, pero no ganan peso	Transportador de casetes de unión a ATP (ABCA3)
Disquinesia ciliar primaria	Mucosidad excesivamente viscosa debido a una función de los cilios defectuosa/faltante	DNAI1, CCNO, CCDC40 entre otros
<b>Enfermedad por almacenamiento en los lisosomas</b>		
Enfermedad de Fabry	Más allá de otras, lesiones cutáneas por acumulación de ceramida trihexósido	α-Galactosidasa A, cromosoma X recesiva
Enfermedad de Gaucher Tipo-I: forma adulta (esperanza de vida normal bajo tratamiento) Tipo II: forma infantil (muerte antes de 1 año) Tipo III: forma juvenil (inicio en la primera infancia, menos grave que el Tipo II)	Acumulación de glucocerebrósidos (gangliósidos, esfingolípidos)	Glucocerebrosidasa, autosómica recesiva,
Síndrome de Hunter	Acumulación de mucopolisacáridos	L-iduronosulfat sulfatasa, cromosoma X recesiva
Síndrome de Hurler (muerte a los 10 años)	Acumulación de mucopolisacáridos	α-L-iduronidasa, autosómica recesiva
Enfermedad de Niemann-Pick (tres formas distintas A, B, C)	Defecto en la liberación de colesterol de los lisosomas, acumulación de Esfingomielina	Esfingomielinasa, autosómica recesiva
Enfermedad de Tay-Sachs (muerte alrededor de los 4 años)	Acumulación del gangliósido GM <sub>2</sub> en las células neuronales	Hexosaminidasa A, autosómica recesiva
<b>Piel</b>		
Albinismo	Defecto del metabolismo del nitrógeno	Deficiencia de tirosinasa, autosómica recesiva
Albinismo, oculocutáneo, tipo II	Biosíntesis reducida del pigmento de melanina	OCA2, autosómica recesiva
Síndrome de Ehlers-Danlos (varios tipos)	Hernia diafragmática, desprendimiento de retina	Varios defectos en la síntesis de colágeno
Epidermólisis ampollosa (varios tipos, incluidos EB simple, EB de Unión, EB Distrófica y síndrome de Kindler)	Defectos en el mantenimiento de la estabilidad estructural de los queratinocitos o la adhesión del queratinocito a la dermis subyacente	Epidermólisis ampollosa de tipo macular (EBM), Epidermólisis ampollosa progresiva 3 (EBR3), Epidermólisis ampollosa pseudojuntal 4 (EBR4), Desmoplaquina (DSP), Placoflina-1 (PKP1), creatina (KRT5, KRT14), plectina (PLEC), ITGA6, subunidad de integrina (ITGB4), subunidades de laminina (LAMA3, LAMP3, LAMB3, LAMC2), colágeno (COL17A1, COL7A1 (autosómica dominante), FERMT1, autosómica recesiva
Enfermedad de Hartnup	Defecto en la captación de triptófano en el tracto gastrointestinal, piel sensible a la luz	SLC6A19, autosómica recesiva
Telangiectasia hemorrágica hereditaria, síndrome de Osler-Weber-Rendu	Telangiectasia de la piel y las membranas mucosas	Endogлина (ENG), autosómica dominante

Hipercolesterolemia, familiar	elevación del colesterol sérico unido a lipoproteínas de baja densidad, acumulación en la piel y arteriosclerosis	Receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), apolipoproteína B (APOB), autosómica dominante
Xeroderma pigmentosa	defecto de la piel y melanoma debido a la exposición a los rayos UV	Defecto en la reparación del ADN, autosómica recesiva
Calvicie de patrón masculino	Conversión alterada de testosterona en dihidrotestosterona en la piel	5- $\alpha$ -reductasa
<b>Enfermedades genéticas del hígado</b>		
Trastornos del metabolismo de los aminoácidos	Interrupciones en el proceso multietapa que descompone el aminoácido tirosina y fenilalanina.	FAH, TAT, HPD, autosómica recesiva
Beta-talasemia intermedia	Escasez de glóbulos rojos maduros	HBB, autosómica recesiva
Síndrome de Crigler-Najjar	Deficiencia de glucuronidación en la que la bilirrubina se vuelve soluble en agua	UGT1A1, autosómica recesiva
Trastornos de la oxidación de los ácidos grasos	Deficiencia en el procesamiento de los ácidos grasos de cadena larga y los ácidos grasos de cadena muy larga que resulta en letargo e hipoglucemia	HADHA, ACADVL autosómica recesiva
Trastornos del metabolismo de la fructosa	Gluconeogénesis alterada que causa hipoglucemia	FBP1, ALDOB, autosómica recesiva
Galactosemia	Deficiencia en el procesamiento de galactosa	GALT, GALK1, GALE, autosómica recesiva
Enfermedades por almacenamiento del glucógeno	La ruptura alterada de la glucosa 6-fosfato y del glucógeno conduce a la acumulación del glucógeno, así como a moléculas de glucógeno anormales que causan daño celular.	G6PC, SLC37A4, AGL, GBE1, autosómica recesiva
Trastorno de biosíntesis de hemo	Disminución de la uroporfirinógeno descarboxilasa que da como resultado la acumulación de compuestos llamados porfirinas que causan niveles tóxicos en el hígado	UROD autosómica dominante, ALAS2 ligada a X dominante, ALAD autosómica recesiva
Trastornos del metabolismo (transporte) de lípidos	Escasez de proteína funcional, la cual impide el movimiento del colesterol y otros lípidos, lo que provoca su acumulación en las células.	NPC1, NPC2 autosómica recesiva, LDLR, autosómica dominante
Trastornos del metabolismo de los metales	Trastornos en el almacenamiento y el transporte de hierro y cobre que provoca acumulación en tejidos y órganos.	ATP7B, HAMP, HFE, HFE2, autosómica recesiva
Trastornos de los ácidos orgánicos (Acidurias/Acidemias)	Descomposición interrumpida de varios componentes básicos de proteínas (aminoácidos), ciertos lípidos y colesterol	BCKDHA, BCKDHB y DBT, PCCA y PCCB, MUT, MMAA, MMAB, MMADHC, MCEE, IVD, MCCC1 o MCCC2, autosómica recesiva

Hiperoxaluria primaria tipo 1	Desglose interrumpido del glicoxilato que conduce a daño renal	AGXT, GRHPR, autosómica recesiva
Colestasis intrahepática familiar progresiva	Acumulación de ácidos biliares en las células del hígado que causan daño hepático	ATP8B1, autosómica recesiva
Trastorno de la actividad de los trombocitos	La falta de actividad enzimática altera el equilibrio habitual entre sangrado y coagulación	ADAMTS13, autosómica recesiva
Trastornos del ciclo de la urea	Trastorno del ciclo de la urea que causa una forma de hiperamonemia	OTC (trastorno ligado al cromosoma X), CPS1, ASS1 y SLC25A13, ASL, autosómica recesiva

La **Tabla 2** anterior muestra ejemplos de genes en los que un defecto conduce a una enfermedad que puede tratarse con el ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención en el que el ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención comprende una secuencia de ribonucleótidos que codifica una versión intacta de la proteína o un fragmento funcional de la misma del gen defectuoso divulgado anteriormente. En realizaciones particularmente preferentes, pueden mencionarse enfermedades hereditarias que, por ejemplo, afectan a los pulmones, tales como deficiencia de SPB (proteína tensioactiva B), deficiencia de ABCA3, fibrosis quística y deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina, o que afectan a proteínas plasmáticas (por ejemplo, hemocromatosis congénita (deficiencia de hepcidina)), púrpura trombocitopénica trombótica (deficiencia de TPP, ADAMTS 13) y causan defectos de coagulación (por ejemplo, hemofilia a y b) y defectos del complemento (por ejemplo, deficiencia de proteína C), defectos inmunes como, por ejemplo, SCID (causado por mutaciones en diferentes genes como: RAG1, RAG2, JAK3, IL7R, CD45, CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ) o por deficiencias debidas a la falta de adenosina desaminasa, por ejemplo (ADA-SCID), granulomatosis séptica (por ejemplo, causada por mutaciones del gen gp-91-phox, el p47-phox, el gen p67-phox o el gen p33-phox) y enfermedades por almacenamiento, como la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Krabbe, MPS I, MPS II (síndrome de Hunter), MPS VI, enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II o mucopolisacaidosis.

Otros trastornos para los que puede ser útil el ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención incluyen trastornos tales como atrofia muscular espinal (SMA) relacionada con SMN1; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); Galactosemia relacionada con GALT; Fibrosis quística (FQ); Trastornos relacionados con SLC3A1 que incluyen cistinuria; Trastornos relacionados con COL4A5, incluido el síndrome de Alport; deficiencias de galactocerebrosidasa; Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X y adrenomieloneuropatía; Ataxia de Friedreich; Enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; Esclerosis tuberosa relacionada con TSC1 y TSC2; Síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB); Cistinosis relacionada con CTNS; los trastornos relacionados con FMR1 que incluyen el síndrome del X frágil, el síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil y el síndrome de insuficiencia ovárica prematura del X frágil; Síndrome de Prader-Willi; telangiectasia hemorrágica hereditaria (AT); Enfermedad de Niemann-Pick tipo C1; las enfermedades relacionadas con lipofuscinosis ceroides neuronales que incluyen la lipofuscinosis neuroide neuronal juvenil (JNCL), enfermedad de Batten juvenil, enfermedad de Santavuori-Haltia, enfermedad de Jansky-Bielschowsky y deficiencias de PTT-1 y TPP1; Ataxia infantil relacionada con EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 y EIF2B5 con hipomielinización del sistema nervioso central/sustancia blanca que desaparece; Ataxia Episódica Tipo 2 relacionada con CACNA1A y CACNB4; los trastornos relacionados con MECP2 que incluyen el síndrome de Rett clásico, la encefalopatía neonatal grave relacionada con MECP2 y el síndrome PPM-X; Síndrome de Rett atípico relacionado con CDKL5; Enfermedad de Kennedy (SBMA); Arteriopatía cerebral autosómica dominante relacionada con Notch-3 con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); Trastornos convulsivos relacionados con SCN1A y SCN1B; los trastornos relacionados con la polimerasa G que incluyen síndrome de Alpers-Huttenlocher, neuropatía atáxica sensorial relacionada con POLG, disartria y oftalmoparesia, y oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante y recesiva con delecciones de ADN mitocondrial; Hipoplasia suprarrenal ligada al cromosoma X; Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X; Enfermedad de Fabry; y enfermedad de Wilson.

En todas estas enfermedades, una proteína, por ejemplo, una enzima, es defectuosa, que puede tratarse mediante tratamiento con el ARN, preferentemente el ARNm, que codifica cualquiera de las proteínas anteriores de la presente invención, lo que produce la proteína codificada por el gen defectuoso o un fragmento funcional del mismo disponible. Las terapias de reemplazo de transcripciones/terapias de reemplazo de enzimas no afectan el defecto genético subyacente, pero aumentan la concentración de la enzima en la que el paciente es deficiente. Como un ejemplo, en la enfermedad de Pompe, la terapia de reemplazo de transcripción/terapia de reemplazo de enzima reemplaza la deficiencia de la enzima lisosomal alfa-glucosidasa ácida (GAA).

Por lo tanto, ejemplos no limitantes de proteínas que pueden ser codificadas por el ARNm de la presente invención son eritropoyetina (EPO), hormona del crecimiento (somatotropina, hGH), regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), factores de crecimiento como GM-SCF, G-CSF, MPS, proteína C, hepcidina, ABCA3 y proteína tensioactiva B. Otros ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con el ARN de



acuerdo con la invención son hemofilia A/B, enfermedad de Fabry, CGD, ADAMTS13, enfermedad de Hurler, cromosoma X A- $\gamma$ -globulinemia mediada, inmunodeficiencia relacionada con la adenosina desaminasa y síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido, que está relacionado con SP-B. Particularmente preferente, el ARN, preferentemente el ARNm, de acuerdo con la invención contiene la secuencia codificante de la proteína tensioactiva B (SP-B) o de la eritropoyetina. Otros ejemplos de proteínas que pueden ser codificadas por el ARN, preferentemente el ARNm, de la presente invención de acuerdo con la invención son factores de crecimiento tales como la hormona del crecimiento humana hGH, BMP-2 o factores de angiogénesis.

Alternativamente, el ARN, preferentemente el ARNm, puede contener una secuencia de ribonucleótidos que codifica un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo más pequeño (por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras) que pueden usarse en entornos terapéuticos para, por ejemplo, conferir inmunidad a un sujeto. Los anticuerpos correspondientes y sus aplicaciones terapéuticas son conocidas en la técnica.

En otra realización, el ARN, preferentemente el ARNm, puede codificar un anticuerpo monoclonal o policlonal funcional, que puede ser útil para seleccionar como diana y/o inactivar una diana biológica (por ejemplo, una citocina estimulante como el factor de necrosis tumoral). De manera similar, el ARN, preferentemente la secuencia de ARNm puede codificar, por ejemplo, anticuerpos anti-factor nefrótico funcionales útiles para el tratamiento de glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II o el síndrome urémico hemolítico agudo, o alternatively puede codificar anticuerpos anti-factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) útiles para el tratamiento de enfermedades mediadas por VEGF, como el cáncer.

Alternativamente, el ARN, preferentemente el ARNm, puede contener una secuencia de ribonucleótidos que codifica un antígeno que preferentemente puede usarse en entornos terapéuticos.

En otra realización, el ARN, preferentemente el ARNm, puede contener una secuencia de ribonucleótidos que codifica un polipéptido o una proteína que puede usarse en tecnologías de edición del genoma. La edición del genoma es un tipo de ingeniería genética en la que el ADN se inserta, elimina o reemplaza en el genoma de un organismo mediante nucleasas. Estas nucleasas crean rupturas específicas de sitio en lugares deseados del genoma. Las roturas inducidas se reparan mediante unión de extremos no homóloga o recombinación homóloga, lo que da como resultado mutaciones dirigidas en el genoma, de este modo se "edita" el genoma. Las roturas pueden ser roturas monocatenarias o roturas bicatenarias (DSB), mientras que se prefieren las roturas bicatenarias (DSB). Se conocen en la técnica numerosos sistemas de edición del genoma que utilizan diferentes polipéptidos o proteínas, es decir, por ejemplo, el sistema CRISPR-Cas, meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y nucleasas basadas en efectores de tipo activador de la transcripción (TALEN). Los métodos para la ingeniería del genoma se revisan en Trends in Biotechnology, 2013, 31 (7), 397-405.

Por lo tanto, en una realización preferente, el ARN, preferentemente el ARNm, puede contener una secuencia de ribonucleótidos que codifica un polipéptido o proteína de la familia de proteínas Cas (proteína asociada a CRISPR), preferentemente Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR). Las proteínas de la familia de proteínas Cas, preferentemente Cas9, pueden usarse en métodos basados en CRISPR/Cas9 y/o tecnologías de edición del genoma CRISPR/Cas9. Los sistemas CRISPR-Cas para la edición, regulación y orientación del genoma son revisados en Nat. Biotechnol., 2014, 32(4):347-355.

En otra realización preferente, el ARN, preferentemente el ARNm, puede contener una secuencia de ribonucleótidos que codifica una meganucleasa. Las meganucleasas son endodesoxirribonucleasas que, a diferencia de las endodesoxirribonucleasas "convencionales", reconocen un sitio de reconocimiento grande (por ejemplo, una secuencia de ADN bicatenario de 12 a 40 pares de base). Como resultado, el sitio respectivo aparece solo unas pocas veces, preferentemente solo una, en cualquier genoma dado. Por lo tanto, se considera que las meganucleasas son las enzimas de restricción naturales más específicas y, en consecuencia, son herramientas adecuadas en las tecnologías de edición del genoma.

En otra realización preferente, el ARN, preferentemente el ARNm, contiene una secuencia de ribonucleótidos que codifica una nucleasa con dedos de zinc (ZFN). Las ZFN son enzimas de restricción artificiales generadas al fusionar un dominio de unión al ADN con dedos de zinc a un dominio de escisión del ADN. Los dominios con dedos de zinc pueden diseñarse para apuntar a secuencias de ADN deseadas específicas, y esto permite que las nucleasas con dedos de zinc apunten a secuencias únicas dentro de genomas complejos. Con el aprovechamiento de la maquinaria de reparación del ADN endógeno, las ZFN pueden usarse para alterar con precisión el genoma de organismos superiores y, por tanto, son herramientas adecuadas en las tecnologías de edición del genoma.

En otra realización preferente, el ARN, preferentemente el ARNm, puede contener una secuencia de ribonucleótidos que codifica una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN). Los TALEN son enzimas de restricción que pueden modificarse para cortar secuencias específicas de ADN. Las TALEN son proteínas de fusión en las que, un dominio de unión a ADN efector de TAL, se fusiona con un dominio de escisión de ADN de una nucleasa. Los efectores de tipo activador de la transcripción (TALEs) pueden diseñarse para unir prácticamente cualquier secuencia de ADN deseada. Por lo tanto, cuando se combina con una nucleasa, el ADN puede cortarse en ubicaciones específicas deseadas.

Alternativamente a lo anterior, el ARN contiene una secuencia de ribonucleótidos que no debe expresarse como proteína o polipéptido. Por lo tanto, el término ARN no solo debe entenderse que significa cualquier molécula de polinucleótido que, si se introduce en una célula, es traducible a un polipéptido/proteína o fragmento del mismo. Más bien, también se contempla que el ARN contiene una secuencia de ribonucleótidos que solo se transcribe en un ARN (funcional), en el que dicho ARN es el producto final (y, por consiguiente, no requiere ser traducido). En este contexto, se prevé que el ARN contenga una secuencia de ribonucleótidos que proporciona preferentemente la información genética para una secuencia de ipARN u otra secuencia de ribonucleótidos deseada.

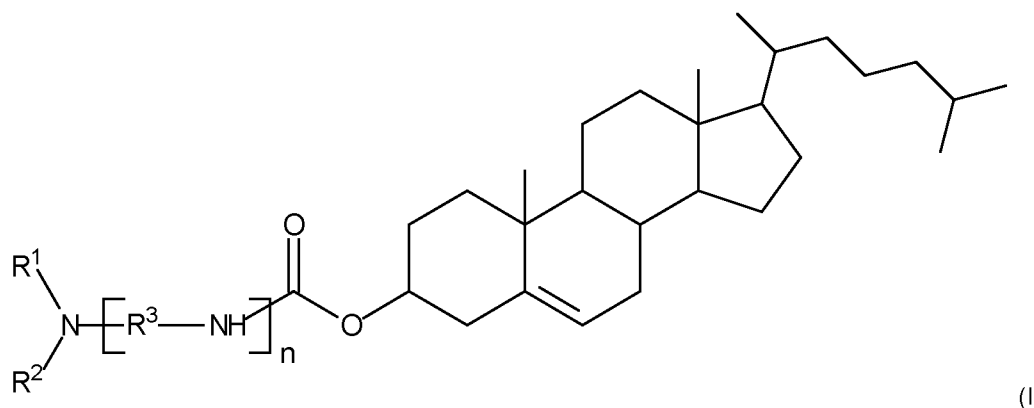
- 5 Se entenderá que las partículas para su uso en el contexto de la presente invención pueden comprender un solo tipo de ARN, pero alternativamente pueden comprender una combinación de dos o más tipos de ARN, por ejemplo, en la forma de partículas que comprenden dos o más tipos de ARN en partículas individuales o en forma de una mezcla de partículas que difieren en el tipo de ARN que contienen.

#### Composición lipídica

- 15 La composición de acuerdo con la invención comprende partículas que comprenden ARN y una composición lipídica.

La composición lipídica comprende (i-a) un derivado de colesterol de fórmula (I) o una sal del mismo, (i-b) un fosfoglicérido de fórmula (II) o una sal del mismo y (i-c) un fosfoglicérido pegilado de fórmula (III) o una sal del mismo. Pueden estar presentes otros componentes lipídicos, pero preferentemente los componentes (i-a), (i-b) y (i-c) son los únicos componentes lipídicos en la composición lipídica contenida en las partículas.

- 20 El componente (i-a) de la composición lipídica es un derivado de colesterol de fórmula (I) o una sal del mismo:



en la que

$n$  es 0 o 1,

$R^1$  es un grupo  $-(CH_2)_q-NH_2$  o un grupo  $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$ ,

- 25 en la que  $q$ ,  $r$  y  $s$  son independientemente un número entero de 2 a 6,

$R^2$  es un grupo  $-(CH_2)_t-NH_2$  o un grupo  $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$ ,

en la que  $t$ ,  $u$  y  $w$  son independientemente un número entero de 2 a 6,

$R^3$  es un grupo alcanodiilo lineal que tiene de 1 a 4 átomos de carbono.

Los compuestos de esta fórmula y su preparación se describen, por ejemplo, en el documento US 5,783,565.

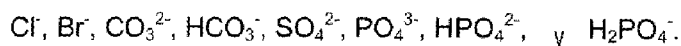
- 30 El número entero  $n$  en la fórmula (I) es preferentemente 0.

Los números enteros  $q$ ,  $r$ ,  $s$ ,  $t$ ,  $u$  y  $w$  se seleccionan preferentemente e independientemente de 3 y 4.

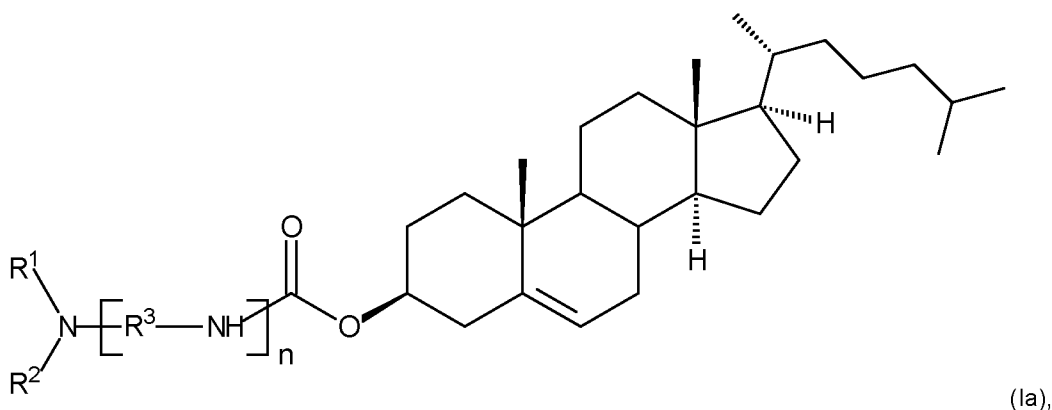
También es preferente que  $R^1$  sea un grupo  $-(CH_2)_q-NH_2$  y  $R^2$  es un grupo  $-(CH_2)_t-NH_2$  o un grupo  $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$ , o que  $R^2$  es un grupo  $-(CH_2)_t-NH_2$  y  $R^1$  es un grupo  $-(CH_2)_q-NH_2$  o un grupo  $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$ . En ambos casos,  $n$  también es preferentemente 0.

- 35 Las formas de sal del derivado de colesterol de la fórmula (I) pueden proporcionarse al protonar uno o más de los grupos amino contenidos en el compuesto, con un ácido de modo que el compuesto lleve una carga catiónica. Como se apreciará, un grupo amino protonado es uno en el que un átomo de hidrógeno adicional está unido al átomo de nitrógeno del grupo amino, de modo que resulta un nitrógeno tetravalente que lleva una carga catiónica. Los átomos

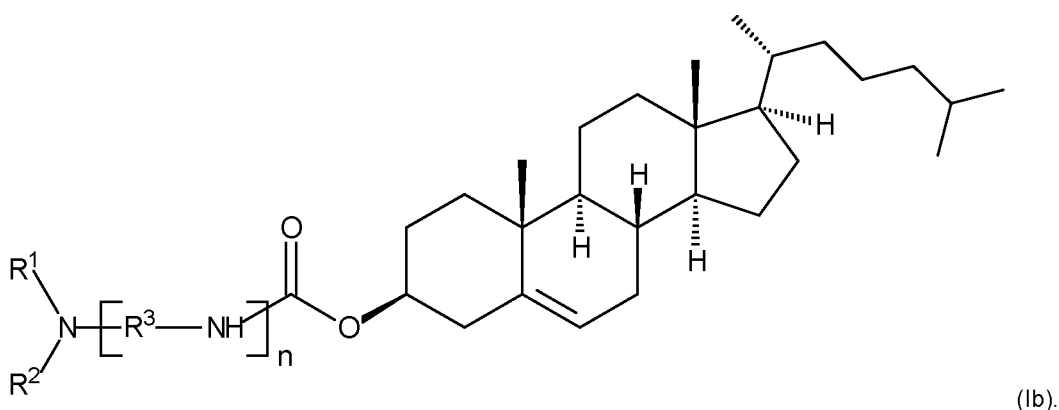
de nitrógeno adecuados en el compuesto de fórmula (I) son el átomo de nitrógeno contenido en el grupo  $-N(R^1)(R^2)$ , y los átomos de nitrógeno contenidos en  $R^1$  y en  $R^2$ , respectivamente. En las composiciones de la presente invención, el compuesto de fórmula (I) puede formar una sal con los grupos ácidos del ARN. Sin embargo, no se excluyen otros aniones. Como otros aniones ejemplares, son particularmente adecuados los aniones que pueden estar presentes en la composición salina contenida como componente (ii) en la composición de acuerdo con la presente invención, es decir, uno o más aniones seleccionados de



Como entenderá el lector experto, el compuesto de fórmula (I), como un derivado de colesterol, puede ilustrarse mediante la fórmula preferida (Ia):



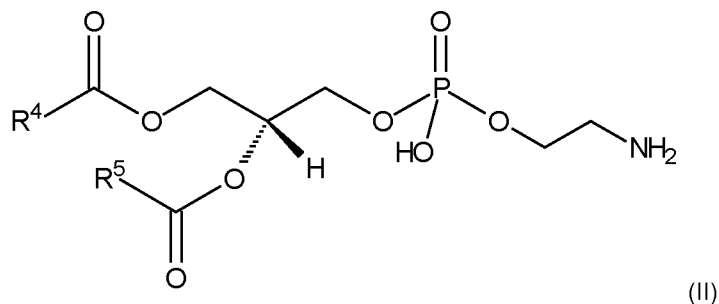
o la fórmula (Ib) aún más preferente:



En las fórmulas (Ia) y (Ib), las definiciones y definiciones preferentes para  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $n$  dado anteriormente con respecto a la fórmula (I) continúan aplicándose.

El más preferente como componente (i-a) de la composición lipídica es GL67, en el que, con respecto a la fórmula (I), (Ia) y (Ib),  $n$  es 0,  $R^1$  es un grupo  $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$  y  $R^2$  es un grupo  $-(\text{CH}_2)_4\text{-NH-}(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$ .

El componente (i-b) de la composición lipídica es un fosfoglicérido de fórmula (II) o una sal del mismo:



en la que

$R^4$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 24 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 24 átomos de carbono;

$R^5$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 24 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 24 átomos de carbono.

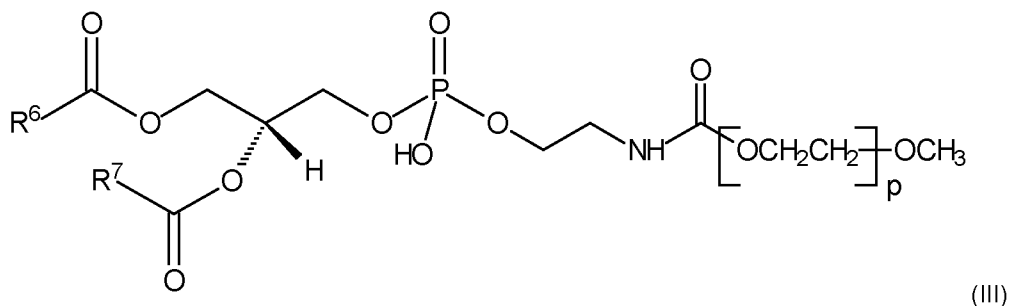
- 5 Preferentemente,  $R^4$  y  $R^5$  son cada uno un grupo alquilo lineal que tiene de 14 a 20 átomos de carbono, o son cada uno un grupo alquenilo lineal que tiene uno o dos dobles enlaces y 14 a 20 átomos de carbono. Con mayor preferencia  $R^4$  y  $R^5$  son cada uno un grupo alquenilo lineal que tiene un doble enlace y de 14 a 20 átomos de carbono.

10 Las formas salinas adecuadas del compuesto de fórmula (II) incluyen formas salinas internas en las que el protón del grupo -OH ácido unido al átomo de P mostrado en la fórmula (II) protona el grupo amino mostrado en la misma. Las formas de sal adecuadas del compuesto de fórmula (II) también incluyen sales formadas por el grupo -OH ácido desprotonado con otro catión, o sales formadas por el grupo amino protonado con otro anión. Como otros cationes ejemplares, son particularmente adecuados los cationes que pueden estar presentes en la composición salina contenida como componente (ii) en la composición de acuerdo con la presente invención, es decir, uno o más cationes seleccionados de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$ , y  $Mg^{2+}$ . Como sales ejemplares formadas por el grupo amino protonado, puede mencionarse una sal formada con los grupos ácidos del ARN, pero no se excluye la presencia de otros aniones, y ejemplos preferidos de aniones adecuados son aquellos que también pueden estar presentes como aniones en la composición salina contenida como componente (ii) en la composición de acuerdo con la invención, es decir, uno o más aniones seleccionados de

$Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $H_2PO_4^-$ .

- 20 Con mayor preferencia como componente (i-b) de la composición lipídica es 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), o una sal de la misma.

El componente (i-c) de la composición lipídica es un fosfoglicérido pegilado de fórmula (III) o una sal del mismo:



en la que

- 25  $p$  es un número entero de 5 a 200, preferentemente de 10 a 170 y con la máxima preferencia de 10 a 140;

$R^6$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 20 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 20 átomos de carbono;

- 30  $R^7$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 20 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 20 átomos de carbono.

Preferentemente,  $R^6$  y  $R^7$  son cada uno un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 20 átomos de carbono, con mayor preferencia,  $R^6$  y  $R^7$  son cada uno un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 16 átomos de carbono.

Por lo tanto, también es preferente que, en la fórmula (III),  $R^6$  y  $R^7$  sean cada uno un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 16 átomos de carbono y  $p$  es un número entero de 10 a 140.

- 35 Las formas salinas del compuesto de fórmula (III) son generalmente sales que son farmacéuticamente aceptables. Las sales típicas del compuesto de fórmula (III) son sales formadas por el grupo -OH ácido desprotonado con un catión. Como cationes ejemplares, son particularmente adecuados los cationes que pueden estar presentes en la composición salina contenida como componente (ii) en la composición de acuerdo con la presente invención, es decir, uno o más cationes seleccionados de

40  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca^{2+}$ , y  $Mg^{2+}$ .

Muy preferente como un componente (i-c) en la composición lipídica es el 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) o una sal del mismo en la que el PEG (polietilenglicol) contiene de 10 a 140 unidades repetidas,

es decir, con respecto a la fórmula (III),  $R^6$  y  $R^7$  son cada uno un grupo alquilo lineal que tiene 13 átomos de carbono, y p es un número entero de 10 a 140 en esta realización muy preferente. Con la máxima preferencia como un componente (ic) es 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) o una sal del mismo, en el que 5000 indica el peso molecular promedio en número del resto de PEG, correspondiente a un valor promedio de p de aproximadamente 113.

Por lo tanto, se apreciará que una composición lipídica particularmente preferente para su uso en el contexto de la presente invención es aquella en la que:

el componente (i-a) es GL67 o una sal del mismo,

el componente (i-b) es 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o una sal de la misma, y

componente (i-c) es 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) o una sal del mismo, en el que el resto de PEG (polietilenglicol) contiene de 10 a 140 unidades repetidas y es con mayor preferencia 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) o una sal del mismo.

En la composición lipídica contenida en las partículas de la presente composición, la relación molar de los componentes (i-a), (i-b) y (i-c), es decir (i-a): (i-b): (i-c), es preferentemente 1: (0,5 a 5): (0,01 a 1), con mayor preferencia 1: (1 a 5): (0,01 a 0,5) y con la máxima preferencia 1: (1 a 3): (0,02 a 0,2).

La composición lipídica contiene preferentemente los componentes (i-a), (i-b) y (i-c) como únicos componentes lipídicos.

De acuerdo con lo anterior, una composición muy preferente de acuerdo con la invención es una que comprende:

(i) partículas contenidas en una fase líquida, en la que las partículas comprenden ARNm y una composición lipídica, y en la que la composición lipídica comprende:

(ia) GL67 o una sal del mismo,

(i-b) es 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o una sal de la misma, y

(i-c) es 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) o una sal del mismo, en el que el resto de PEG (polietilenglicol) contiene de 10 a 140 unidades repetidas y es con mayor preferencia 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) o una sal del mismo,

en una relación molar de los componentes (i-a): (i-b): (i-c) de 1: (1 a 3): (0,02 a 0,2); y

(ii) una composición salina disuelta en forma de cationes y aniones en la fase líquida, en la que la composición salina disuelta comprende uno o más cationes seleccionados entre  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{NH}_4^+$  y uno o más aniones seleccionados entre  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , y en el que la concentración de los cationes de la composición salina disueltos en la fase líquida es de 1 a 1000 mM.

### Partículas

La composición de acuerdo con la invención comprende partículas que comprenden ARN y la composición lipídica, como se discutió anteriormente.

Las partículas comprenden típicamente nanopartículas que comprenden ARN y la composición lipídica o micropartículas que comprenden ARN y la composición lipídica. Como entenderá el lector experto, el "o" se usa en este contexto de una manera no exclusiva, a menos que se indique específicamente de otra manera. Por lo tanto, la referencia a nano- o micropartículas abarca composiciones que contienen nanopartículas, composiciones que contienen micropartículas, y composiciones que contienen tanto nanopartículas como micropartículas. Como se usa en la presente memoria, el término nanopartículas se refiere generalmente a partículas con un diámetro en el intervalo de tamaño nanométrico, es decir, un diámetro de 1 nm o más, e inferior a 1.000 nm. El término micropartículas se refiere generalmente a partículas con un diámetro en el intervalo de tamaño micrométrico, es decir, un diámetro de 1.000 nm o más, y 100  $\mu\text{m}$  o menos. Preferentemente, las partículas consisten en nanopartículas que comprenden ARN y la composición lipídica, o micropartículas que comprenden ARN y la composición lipídica.

Las partículas contenidas en las composiciones de acuerdo con la presente invención muestran preferentemente un diámetro promedio de partículas en el intervalo de 1 a 5.000 nm, con mayor preferencia de 10 a 4.000 nm y con la máxima preferencia de 50 a 3.000 nm.

El límite superior para el diámetro de las partículas individuales en las composiciones de acuerdo con la invención es preferentemente de 20  $\mu\text{m}$ , con mayor preferencia de 10  $\mu\text{m}$  y con la máxima preferencia de 5  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, como se entenderá por lo anterior, una formulación de partícula muy preferente sería una con un diámetro promedio de partícula en el intervalo de 50 a 3.000 nm, y partículas con un diámetro máximo de partícula de 5  $\mu\text{m}$ .

Los diámetros de partícula y el diámetro promedio de partícula de la formulación de nano- o micropartículas, como se menciona en la presente memoria, pueden determinarse convenientemente a través de la dispersión dinámica de la luz (DLS). Generalmente, los diámetros y el diámetro promedio a los que se hace referencia en la presente memoria se indican como diámetros hidrodinámicos de las partículas en estado suspendido, determinados mediante la dispersión dinámica de la luz. Dado que el equipo de medición (por ejemplo, Malvern ZetaSizer) tiene en cuenta el efecto de la temperatura al informar los resultados, los diámetros medidos generalmente no dependen de la temperatura. Sin embargo, la medición se realiza normalmente a temperatura ambiente (25 °C). Como medio de dispersión para las mediciones de DLS, se usa típicamente agua.

En las partículas contenidas en las composiciones de acuerdo con la invención, los grupos ácidos del ARN típicamente protonarán los grupos amino contenidos en la formulación de lípidos, de modo que las moléculas de ARN aniónico y las moléculas de lípidos catiónicos puedan interactuar, lo que resulta preferentemente en la formación de complejos entre las moléculas de ARN y las moléculas de lípidos.

La relación N/P del número de átomos de nitrógeno N derivados del derivado de colesterol de fórmula (I) en la composición lipídica, y el número de grupos fosfato P en el ARN, está preferentemente en el intervalo de 1 a 100, con mayor preferencia de 1 a 30, y con la máxima preferencia de 2 a 20.

Preferentemente, las partículas tienen forma de liposomas o nanopartículas lipídicas.

De acuerdo con lo anterior, una composición muy preferente de acuerdo con la invención es una que comprende:

(i) nano- o micropartículas contenidas en una fase líquida, en la que las nano- o micropartículas comprenden ARNm y una composición lipídica, en la que la composición lipídica comprende:

(i-a) GL67 o una sal del mismo,

(i-b) es 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o una sal de la misma, y

(i-c) es 1,2-dimiristoíloil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) o una sal del mismo, en el que el resto de PEG (polietilenglicol) contiene de 10 a 140 unidades repetidas y es con mayor preferencia 1,2-dimiristoíloil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) o una sal del mismo,

en una relación molar de los componentes (i-a): (i-b): (i-c) de 1: (1 a 3): (0,02 a 0,2),

y en el que la relación N/P del número de átomos de nitrógeno N derivados del derivado de colesterol de fórmula (I) en la composición lipídica al número de grupos fosfato P en el ARNm es de 2 a 20; y

(ii) una composición salina disuelta en forma de cationes y aniones en la fase líquida, en la que la composición salina disuelta comprende uno o más cationes seleccionados entre Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y uno o más aniones seleccionados entre Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, y H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, y en el que la concentración de los cationes de la composición salina disueltos en la fase líquida es de 1 a 1000 mM.

Además del ARN y la composición lipídica, las partículas en las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender uno o más componentes adicionales, por ejemplo, excipientes o aditivos que son típicamente componentes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, tales componentes adicionales pueden facilitar el transporte a sitios específicos o promover la absorción adicional de las partículas en sitios específicos, después de que se hayan administrado a un paciente, o pueden ayudar a estabilizar las partículas o el agente terapéuticamente activo contenido en el mismo.

Además del ARN y la composición lipídica, las partículas contenidas en las composiciones de acuerdo con la invención puede comprender, como un aditivo opcional o como aditivos opcionales, uno o más componentes que ejercen una función efectora durante el suministro del agente terapéutico, y preferentemente durante el suministro de un ácido ribonucleico como un agente terapéutico para y dentro de una célula. Tales componentes pueden ser, pero no se limitan a, polianiones, lípidos adicionales, oligómeros o polímeros protectores, poloxámeros (también conocidos como plurónicos), poloxaminas, ligandos dirigidos, agentes endosomolíticos, péptidos de señal y penetrantes de células, nanopartículas magnéticas y no magnéticas, inhibidores de ARNasa, colorantes fluorescentes, radioisótopos o agentes de contraste para imágenes médicas. El término "función efectora" abarca cualquier función que apoye la consecución de un efecto biológico pretendido del agente terapéuticamente activo de la composición en o dentro de una diana biológica, o en los alrededores de una diana biológica. Por ejemplo, se han formulado composiciones para el suministro de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos no codificantes o polianiones de ácidos nucleicos como materiales de relleno (Kichler y otros, 2005, J Gene Med, 7, 1459-1467). Tales materiales de relleno son adecuados para reducir la dosis de un ácido nucleico que tiene un efecto biológico pretendido, mientras se mantiene la extensión o el grado de ese efecto obtenido a una dosis de ácido nucleico más alta, en ausencia de tal material de relleno. También se han usado polianiones de ácido nucleico para obtener una expresión genética in vivo prolongada con una toxicidad reducida (Uchida y otros, 2011, J Control Release, 155, 296-302).

Otros polímeros de protección ejemplares descritos en la literatura que pueden ser componentes útiles para una

formulación de partícula que comprende un complejo de un ácido nucleico con un excipiente catiónico, incluye hidroxietil almidón (HES; Noga y otros, Journal of Controlled Release, 2012, 159(1): 92-103, un polipéptido PAS-/PA (polipéptido de Pro, Ala, Ser (o Pro, Ala): Schlapschy y otros Protein Eng Des Sel. 2013 Aug; 26 (8): 489-501 o Polysarcosine (Psar.; Heller y otros, Macromol Biosci 2014; 14: 1380-1395).

- 5 Los ligandos dirigidos pueden ser útiles, por ejemplo, en formulaciones de partícula para el suministro de ácido ribonucleico para la transfección preferencial y mejorada de las células diana (Philipp y Wagner en "Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3era edición, capítulo 15. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009). Un ligando dirigido puede ser cualquier compuesto que confiera a las composiciones de la presente invención una función de reconocimiento a diana y/o de unión a diana, de manera directa o indirecta. Ejemplares de
- 10 ligandos dirigidos son los análogos de prostaciclina divulgados en el documento WO 2011/076391, tales como Iloprost o Treprostinil. Un anticuerpo también puede actuar como un ligando dirigido. Como ligandos para partículas, pueden mencionarse el ácido fólico y la N-acetil galactosamina. En términos más generales, una diana es una estructura biológica distinta, a la cual un ligando dirigido puede unirse específicamente a través de interacción molecular, y donde tal unión conducirá finalmente a la acumulación preferencial del agente terapéutico, como un ácido nucleico,
- 15 comprendido en la composición en un tejido diana y/o en o dentro de una célula diana.

Además, los agentes endosomolíticos como los péptidos endosomolíticos (Plank y otros, 1998, Adv Drug Deliv Rev, 34, 21-35), o cualquier otro compuesto que sea adecuado para mejorar la liberación endosómica de un ácido nucleico endocitosado, son componentes útiles de las composiciones de la presente invención. De manera similar, los péptidos penetrantes en las células (en otro contexto también conocidos como dominios de transducción de proteínas)

20 (Lindgren y otros, 2000, Trends Pharmacol Sci, 21, 99-103) pueden ser componentes útiles de la composición de la presente invención para mediar el suministro intracelular de un ácido nucleico. El llamado péptido TAT cae dentro de esta clase y también tiene una función de localización nuclear (Rudolph y otros, 2003, J Biol Chem, 278, 11411-11418).

Preferentemente, las partículas tiene una carga activa, expresada como el peso del ARN como agente terapéuticamente activo al peso total de las partículas en la formulación de partícula, en el intervalo de 0,1 a 95 %

25 (p/p), con mayor preferencia de 0,5 a 80 % (p/p), con la máxima preferencia de 1 a 50 % (p/p).

*Composición que comprende las partículas y la composición salina*

La composición de acuerdo con la invención comprende partículas que comprenden ARN y la composición lipídica junto con la composición salina. Como se apreciará, la información anterior con respecto a las realizaciones adecuadas y preferentes del ARN, de la composición lipídica y de las partículas que las comprenden, son aplicadas en el contexto

30 de la siguiente discusión.

Dado que la composición de acuerdo con la invención contiene ARN como un agente terapéuticamente activo y es adecuada para la administración del agente terapéuticamente activo a un paciente, puede denominarse composición terapéutica o composición farmacéutica.

En la composición de acuerdo con la presente invención que comprende las partículas que comprenden ARN y la

35 composición lipídica en una fase líquida, las partículas que comprenden ARN y la composición lipídica se dispersan preferentemente en la fase líquida. Como implica el término "disperso", las partículas forman una fase discontinua en la fase líquida continua en este caso. Generalmente, es preferente que la dispersión se proporcione como una dispersión de dos fases, con una fase líquida continua, y las partículas que comprenden ARN y la composición lipídica dispersa como una fase discontinua en el mismo.

La composición de acuerdo con la invención, en la que las partículas que comprenden ARN y la composición lipídica están contenidas en una fase líquida, preferentemente comprende las partículas en una cantidad que proporciona el

40 ARN contenido en las partículas a una concentración de 0,01 a 50 mg/ml, con mayor preferencia de 0,02 a 30 mg/ml y con la máxima preferencia de 0,05 a 10 mg/ml, en base al volumen total de la composición.

La composición salina está contenida como un componente adicional en la fase líquida de la composición de acuerdo con la invención, en la que las partículas que comprenden ARN y la composición lipídica están contenidas, preferentemente dispersas. La composición salina se disuelve preferentemente en la fase líquida. Sin embargo, sus

45 cationes y/o aniones también pueden estar asociados parcialmente con las partículas contenidas en la fase líquida.

La composición salina está disuelta en forma de cationes y aniones en la fase líquida de la composición de acuerdo con la presente invención en la que las partículas comprenden ARN y la composición lipídica también está contenida.

50 Como entenderá el lector experto, los cationes y aniones contenidos en la composición de acuerdo con la invención serán generalmente cationes y aniones farmacéuticamente aceptables.

Los cationes de la composición salina comprenden, o pueden consistir en, uno o más tipos de cationes seleccionados de

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , y  $\text{Mg}^{2+}$ .

Preferiblemente, comprenden, o pueden consistir en, una combinación de los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{NH}_4^+$ .

Los aniones de la composición salina comprenden, o pueden consistir en, uno o más tipos de aniones seleccionados de,

$\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

5 Preferiblemente, comprenden, o pueden consistir en, una combinación de los aniones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  o  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , y  $\text{HPO}_4^{2-}$  o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

Como sales adecuadas a modo de ejemplo que pueden usarse por separado o en combinación para proporcionar la composición salina contenida en la fase líquida, se pueden mencionar  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{NH}_2\text{PO}_4$ .

10 La concentración de los cationes de la composición salina disueltos en la fase líquida es de 1 a 1000 mM. Como entenderá el lector experto, esto indica la concentración total de cationes disueltos en la fase líquida, en función del volumen total de la fase líquida (típicamente a 20 °C). Preferiblemente, la concentración de los cationes es de 1 a 500 mM, más preferiblemente de 1 a 200 mM.

15 Como entenderá el lector experto, la concentración de los aniones no tiene que ser idéntica a la concentración de los cationes, ya que se pueden usar y combinar cationes y aniones con diferentes valencias. Por tanto, la cantidad molar de aniones disueltos puede ser diferente de la cantidad molar de aniones disueltos. Sin embargo, como también entenderá el experto, la concentración de los aniones disueltos en la fase líquida será suficiente para equilibrar la carga de los cationes disueltos en la misma.

20 La fase líquida en la que están contenidas las partículas, preferentemente dispersas, típicamente contiene agua como solvente. Preferentemente, el agua proporciona el 50 % o más, con mayor preferencia el 70 % o más y todavía más preferentemente 90% o más en volumen (en base al volumen total de la fase líquida a 20 °C). Lo más preferido, el agua es el único solvente contenidos en la fase líquida.

Como aditivos opcionales adicionales ejemplares de la fase líquida, pueden mencionarse uno o más seleccionados de sales, azúcares, disolventes orgánicos y tampones. Pueden usarse tampones que se usan convencionalmente en aplicaciones farmacéuticas o biológicas. Para cationes opcionales de tampones, también deberán tenerse en cuenta las consideraciones anteriores relativas a la concentración de cationes disueltos en la fase líquida.

25 De acuerdo con lo anterior, una composición muy preferente de acuerdo con la invención es una que comprende:

(i) nano- o micropartículas dispersas en una fase líquida que comprende agua como solvente, en la que las nano- o micropartículas comprenden ARNm y una composición lipídica, en la que la composición lipídica comprende:

(i-a) GL67 o una sal del mismo,

(i-b) es 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o una sal de la misma, y

30 (i-c) es 1,2-dimiristoílosn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) o una sal del mismo, en el que el resto de PEG (polietilenglicol) contiene de 10 a 140 unidades repetidas y es con mayor preferencia 1,2-dimiristoílosn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) o una sal del mismo,

en una relación molar de los componentes (i-a): (i-b): (i-c) de 1: (1 a 3): (0,02 a 0,2),

35 y en el que la relación N/P del número de átomos de nitrógeno N derivados del derivado de colesterol de fórmula (I) en la composición lipídica al número de grupos fosfato P en el ARNm es de 2 a 20; y

(ii) una composición salina disuelta en forma de cationes y aniones en la fase líquida, en la que los cationes comprenden uno o más seleccionados entre  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , y  $\text{Mg}^{2+}$  y los aniones comprende uno o más seleccionados entre  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , y en el que la concentración de los cationes de la composición salina disueltos en la fase líquida es de 1 a 1000 mM.

#### 40 *Aplicaciones farmacéuticas*

45 Como ya se mencionó anteriormente, las moléculas de ARN, preferentemente las moléculas de ARNm, que están presentes en las composiciones de acuerdo con la presente invención como se definió anteriormente, son particularmente útiles en un entorno médico y en el tratamiento de ciertas enfermedades y, en particular, en terapias basadas en ARN. Por lo tanto, las composiciones de acuerdo con la invención que comprenden las moléculas de ARN son adecuadas como composiciones farmacéuticas.

La composición de acuerdo con la presente invención es adecuada para la administración a un sujeto. Por lo tanto, el ARN, preferentemente el ARNm, contenido en el mismo también puede ser suministrado al sujeto. Una vía preferente de administración para la composición es la administración al tracto respiratorio o a través de él, en particular la administración pulmonar o la administración nasal.

50 Sin embargo, el lector experto apreciará que la composición de la invención también puede administrarse a través de



otras vías de administración que son conocidas en la técnica para las formulaciones de partículas de un agente terapéuticamente activo, tal como la administración intravenosa en forma de una dispersión.

Los dispositivos para formar un aerosol a partir de una composición que comprende partículas contenidas en un líquido, o para nebulizar tal composición son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Pueden usarse para lograr la administración de la composición de acuerdo con el primer aspecto de la invención en el tracto respiratorio o a través de él, en particular la administración pulmonar. Para la administración a través de la nariz, puede usarse, por ejemplo, un dispositivo de pulverización nasal o de infusión nasal.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un dispositivo para formar un aerosol a partir de una composición en forma de partículas contenida en un líquido, o para nebulizar tal composición, dispositivo que comprende la composición de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. El dispositivo es preferentemente un inhalador seleccionado de un inhalador de dosis medida, un nebulizador y un dispositivo de pulverización nasal.

A través de tal administración a un sujeto, el ARN contenido en las partículas puede suministrarse a las células diana en el tracto respiratorio o a través de él. El término "suministrado a células diana" significa preferentemente la transferencia del ARN, preferentemente ARN monocatenario como el ARNm, al interior de la célula.

La composición puede ser administrada al sujeto en una dosis adecuada. El régimen de dosificación será determinado por el médico de cabecera y los factores clínicos. Como se conoce bien en la técnica médica, las dosificaciones para cada sujeto dependen de muchos factores, incluido el tamaño del sujeto, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto en particular que se administrará, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general, y otros fármacos que se administren simultáneamente. Una dosis típica de sustancias terapéuticamente activas puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1 ng a varios gramos. La dosificación de un ARN(m) para la expresión o para la inhibición de la expresión debe corresponder a este intervalo; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de estos ejemplares de intervalos, especialmente al considerar los factores antes mencionados. Generalmente, el régimen como una administración regular de la composición farmacéutica debe estar en el intervalo de 0,01 µg a 10 mg de unidades por kilogramo de peso corporal por día. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal, respectivamente. El progreso puede monitorearse mediante evaluación periódica. La dosificación variará, pero una dosis preferente para la administración de ARN(m), como constituyente de la composición de la presente invención, es de aproximadamente de  $10^6$  a  $10^{19}$  copias de la molécula de ARN(m).

También disponible mediante la presente invención está un procedimiento de tratamiento, que comprende administrar la composición de acuerdo con la invención a un paciente, preferentemente a través de la administración al tracto respiratorio o a través de él, con mayor preferencia a través de la administración pulmonar o la administración nasal. Por lo tanto, el ARN contenido en dicha composición puede causar un efecto preventivo o terapéutico. En particular, el término "paciente" comprende animales y humanos.

Al administrar la composición de la presente invención a un sujeto, pueden tratarse o prevenirse enfermedades. El término "enfermedad" se refiere a cualquier condición patológica concebible que pueda tratarse, prevenirse o vacunarse al emplear la composición de la presente invención. Dichas enfermedades pueden, por ejemplo, ser heredadas, adquiridas, infecciosas o no infecciosas, relacionadas con la edad, cardiovasculares, metabólicas, intestinales, neoplásicas (en particular cáncer) o genéticas. Una enfermedad puede basarse, por ejemplo, en irregularidades de procesos fisiológicos, procesos moleculares, reacciones bioquímicas dentro de un organismo, que a su vez pueden basarse, por ejemplo, en el equipamiento genético de un organismo, en factores conductuales, sociales o ambientales tales como la exposición a los productos químicos o la radiación.

Los términos "tratamiento" o "tratar" usados en la presente memoria generalmente significan obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Por consiguiente, el tratamiento de la presente invención puede relacionarse con el tratamiento de estados (agudos) de una determinada enfermedad, pero también puede relacionarse con el tratamiento profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma. Preferentemente, el término "tratamiento" debe entenderse como terapéutico en términos de curar parcial o completamente una enfermedad y/o efectos adversos y/o síntomas atribuidos a la enfermedad. "Agudo" a este respecto significa que el sujeto muestra síntomas de la enfermedad. En otras palabras, el sujeto a tratar necesita realmente un tratamiento y el término "tratamiento agudo" en el contexto de la presente invención se refiere a las medidas tomadas para tratar realmente la enfermedad después del inicio de la enfermedad o el brote de la enfermedad. El tratamiento también puede ser profiláctico o preventivo, es decir, medidas tomadas para la prevención de enfermedades, por ejemplo, para prevenir la infección y/o la aparición de la enfermedad. El progreso terapéutico puede monitorearse mediante evaluación periódica.

Generalmente, el ARN, preferentemente el ARNm, se incluye en una cantidad efectiva en la composición de acuerdo con la presente invención. El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para inducir una respuesta terapéutica detectable en el sujeto al que se va a administrar la composición farmacéutica. De acuerdo con lo anterior, el contenido del ARN, preferentemente el ARNm, en la composición farmacéutica no está limitado en la medida en que sea útil para el tratamiento, como se describe anteriormente. Como se señaló anteriormente, la composición de

acuerdo con de la invención, en la que las partículas que comprenden ARN y la composición lipídica están contenidas en una fase líquida, preferentemente comprende las partículas en una cantidad que proporciona el ARN contenido en las partículas en una concentración de 0,01 a 50 mg/ml, con mayor preferencia de 0,02 a 30 mg/ml y con la máxima preferencia de 0,05 a 10 mg/ml, en base al volumen total de la composición.

- 5 De acuerdo con esta invención, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición de acuerdo con la invención, para su administración a un sujeto. Los sujetos ejemplares incluyen un mamífero tal como un perro, gato, cerdo, vaca, oveja, caballo, roedor, por ejemplo, rata, ratón y cobaya, o un primate, por ejemplo, gorila, chimpancé y humano. En una forma de realización más preferente, el sujeto es un humano.
- 10 La composición farmacéutica de la presente invención puede ser para su uso en terapias basadas en ARN. Como se mencionó anteriormente, la molécula de ARN, preferentemente la molécula de ARNm, comprende una secuencia que codifica una proteína y, en consecuencia, puede usarse en terapias basadas en ARN en las que el ARN, preferentemente el ARNm, codifica un polipéptido o una proteína terapéuticamente o farmacéuticamente activa, que tiene un efecto terapéutico o preventivo. Por lo tanto, en realizaciones preferentes, la composición farmacéutica de la
- 15 presente invención puede ser para su uso en terapias basadas en ARN, en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, como se indica en la **Tabla 2** anterior. Por consiguiente, las terapias basadas en ARN de acuerdo con la presente invención pueden ser para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, como se indica en la **Tabla 2** anterior.
- 20 Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para su uso en terapias basadas en ARN, en los casos donde los defectos genéticos descritos en la **Tabla 2** anterior conducen a una enfermedad que puede ser tratada o prevenida mediante una terapia de reemplazo de un transcrito/terapia de reemplazo de enzima con la molécula de ARN, preferentemente la molécula de ARNm, de la presente invención, en la que la molécula de ARN codifica una versión intacta de la proteína o un fragmento funcional de la misma, lo que compensa el gen defectuoso divulgado.
- 25

En otras realizaciones, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para su uso en terapias basadas en ARN, de acuerdo con la presente invención en la que el ARN, preferentemente el ARNm, codifica un polipéptido, una proteína o un péptido terapéuticamente o farmacéuticamente activo, que tiene un efecto terapéutico o preventivo, en el que dicho polipéptido, proteína o péptido se selecciona del grupo codificado por los genes, como se indica en la **Tabla 2**.

30

La composición farmacéutica de la presente invención es particularmente adecuada para su uso en terapias basadas en ARN en el tratamiento o la prevención de enfermedades pulmonares. Como ejemplares de enfermedades, pueden mencionarse la alfa-1-antitripsina, el asma, la fibrosis quística, la disfunción del metabolismo del tensioactivo o la disquinesia ciliar primaria, como se indica en la **Tabla 2** anterior.

35

En otras realizaciones ejemplares, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para su uso en terapias basadas en ARN en el tratamiento o la prevención de enfermedades lisosomales, como la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Fabry, la MPS I, la MPS II (síndrome de Hunter), la MPS VI y las enfermedades por almacenamiento del glucógeno, tal como por ejemplo, la enfermedad por almacenamiento del glucógeno tipo I (la enfermedad de von Giercke), tipo II (la enfermedad de Pompe), tipo III (la enfermedad de Cori), tipo IV (la enfermedad de Andersen), tipo V (la enfermedad de McArdle), tipo VI (la enfermedad de Hers), tipo VII (la enfermedad de Tauri), tipo VII, tipo IX, tipo X, tipo XI (el síndrome de Fanconi-Bickel), tipo XI o tipo 0. Las terapias de reemplazo de transcripciones/terapias de reemplazo de enzimas no afectan el defecto genético subyacente, pero aumentan la concentración de la enzima en la que el paciente es deficiente. Como un ejemplo, en la enfermedad de Pompe, la terapia de reemplazo de transcripción/terapia de reemplazo de enzima reemplaza la deficiencia de la enzima lisosomal alfa-glucosidasa ácida (GAA).

40

45

De acuerdo con ejemplos adicionales, las terapias basadas en ARN de acuerdo con la presente invención pueden ser para su uso en el tratamiento del cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección viral, una disfunción inmunológica, una enfermedad autoinmune, un trastorno neurológico, un trastorno metabólico hereditario o un trastorno genético o cualquier enfermedad donde una proteína o un fragmento de proteína producido en una célula pueda tener un efecto beneficioso para el paciente. Los ejemplos de cáncer incluyen cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer de ano, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de apéndice, cáncer de ojo, cáncer gástrico, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de páncreas, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de endometrio, cáncer cardíaco y sarcoma. Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares incluyen aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad cardíaca pulmonar y cardiomiopatía. Los ejemplos de disfunciones inmunes y enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedades reumáticas, esclerosis múltiple y asma. Los ejemplos de infecciones virales incluyen, pero no se limitan a, infecciones por virus de inmunodeficiencia humana, virus del herpes simple, virus del papiloma humano, así como virus de la hepatitis B y C. Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y demencia. Los ejemplos de trastornos metabólicos hereditarios incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Gaucher y la Fenilcetonuria.

50

55

60

65

*Procedimientos de preparación*

Las técnicas adecuadas para la provisión de partículas que comprenden un ácido ribonucleico y una composición lipídica en una fase líquida están disponibles para el experto en la materia y pueden adaptarse para proporcionar las composiciones, de acuerdo con la invención, en la que las partículas comprenden ARN junto con la composición lipídica discutida anteriormente.

Por ejemplo, los liposomas como partículas que comprenden ARN y la composición lipídica pueden proporcionarse convenientemente mediante la rehidratación de la composición lipídica, tal como la rehidratación de películas lipídicas, seguida de técnicas de homogeneización como, por ejemplo, ultrasonidos o extrusión, cuando sea necesario. Un enfoque alternativo es la infusión de una composición lipídica disuelta en un solvente orgánico en agua o una solución acuosa. Como un procedimiento ejemplar, en el que puede basarse, por ejemplo, la formación de nanopartículas lipídicas, puede mencionarse el procedimiento de desplazamiento de disolvente.

Como un procedimiento alternativo para la provisión de composiciones de acuerdo con la invención, en las que las partículas están contenidas en una fase líquida, pueden mencionarse procedimientos de precipitación, tales como nanoprecipitación de las partículas.

La composición salina puede añadirse convenientemente a una fase líquida en la que las partículas comprenden ARN y una composición lipídica, o en la que van a proporcionarse las partículas. La adición de la composición salina a la fase líquida puede realizarse en una o más de varias etapas, que incluyen antes, durante o después de proporcionar las partículas que comprenden ARN y la composición lipídica en la fase líquida. Además, la composición salina se puede añadir en estado disuelto, por ejemplo en agua, o puede añadirse a la fase líquida para disolverse en ella.

Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una composición de acuerdo con el primer aspecto de la invención, dicho procedimiento comprende las etapas de:

a) disolver y mezclar los componentes de la composición lipídica en un solvente orgánico, seguido de la liofilización de la composición lipídica;

b) rehidratar la composición lipídica liofilizada a través de la adición de agua;

c) combinar la composición lipídica rehidratada con una solución acuosa del ARN para permitir que se formen partículas que comprenden ARN y la composición lipídica que están contenidas en una fase líquida; y

d) añadir la composición salina de manera que la composición salina se disuelva en forma de cationes y aniones en la fase líquida.

Se apreciará que, con vistas a la cantidad de composición salina añadida, se siguen aplicando las consideraciones anteriores con respecto a la concentración y las concentraciones preferidas de los cationes en la fase líquida de la composición de acuerdo con la invención, es decir, la concentración de los cationes de la composición salina disueltos en la fase líquida son de 1 a 1000 mM, preferiblemente de 1 a 500 mM, y aún más preferiblemente de 1 a 200 mM.

La adición de la composición salina puede lograrse convenientemente, por ejemplo, agregándolo junto con agua en la etapa b), agregándolo a la composición lipídica rehidratados siguiente a la etapa b), agregándolo junto con la solución acuosa del ARN en la etapa c), o agregándolo a la fase líquida siguiente a la etapa c), en la que están contenidas las partículas que comprenden ARN y la composición lipídica. Se apreciará que la adición puede llevarse a cabo en una etapa o en múltiples etapas, por ejemplo, en diferentes etapas del procedimiento. También se apreciará que se puede lograr la adición en múltiples etapas, en los casos en los que más de un catión y/o más de un anión están presentes en la composición salina, agregando por separado diferentes sales durante el procedimiento.

**Ejemplos****Abreviaturas**

<u>Abreviatura</u>	<u>Descripción</u>
RT	Temperatura ambiente
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
FLuc	Luciferasa de luciérnaga
sin	sin
cmARN	ácido ribonucleico químicamente modificado
FLuc	Luciferasa de luciérnaga
PG	1,2-propanodiol, propilenglicol
N/P	Número de átomos de nitrógeno en el derivado del colesterol (I) al número de grupos fosfato en el ARNm

**Ejemplo I: Aplicación nasal de formulación lipídica para suministro de ARNm al pulmón***Procedimientos:*

Formulación de complejo ARN-lípido a N/P5 (y N/P3):

Se produjeron soluciones madre de GL67, (MW 724,34 G/MOL), DOPE (744,03 G/MOL) y DMPE-PEG5000 (5688,86g/mol) a una concentración de 10 - 20 mg/ml cada una, en una mezcla 9:1 de t-butanol y agua. Los lípidos se mezclaron en una relación molar de 1:2: 0,05 (GL67:DOPE:DMPE-PEG5000) a una masa lipídica total de 5 mg, se congelaron a -80 °C durante la noche, y se liofilizaron durante al menos 96 h. Antes de su uso, la mezcla de lípidos secos se rehidrató mediante la adición de 400 µl de agua) (lo que dio como resultado una concentración total de lípidos de 12,5 mg/ml) seguido de la incubación a temperatura ambiente durante 30 min sin agitar, se agitó con vortex durante 10 s, seguido de ultrasonificación en un baño de agua a 37 °C durante 10 min. La mezcla de liposomas generada se diluyó para la complejación con ARNm. Para este propósito, se mezclaron 35,4 µl (17,36 µl para N/P5) de agua con 62,5 µl de excipiente de sal (CaCl<sub>2</sub> 1,8mM, MgSO<sub>4</sub> 0,80mM, KCl 5,32mM, NaHCO<sub>3</sub> 26,2mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0mM, pH 7,3) y se agitó con vortex durante 3 s. Se añadieron 27,06 µl 45,10 µl para N/P5) de la mezcla de liposomas, y la mezcla se agitó con vortex durante 10 s y se equilibró a 39 °C durante 3 min. Se equilibró 125 µl de solución de ARNm en agua (c: 0,5 mg/ml) a 39 °C durante 3 min. Para el ensamblaje del complejo, la dilución de ARNm se cargó en la jeringa de aguja fina (BD Micro-Fine Insuline jeringa 0,5 ml U40 8 mm, 07468060 Becton Dickinson), se inyectó rápidamente en la dilución de liposomas, se agitó inmediatamente con vortex durante 10 segundos, y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para ensamblar el complejo. A continuación, los complejos se almacenaron en hielo.

*Tratamiento de los animales:*

Se trataron ratones Balb/c (Laboratorios Charles River) con complejos a una dosis de ARNm de 10 µg/40 µl. La solución se aplicó como una gota en las fosas nasales del animal, durante la anestesia por inhalación con isoflurano (Isothesia, Henry Shine, Alemania).

*Detección del nivel de luciferasa en el tejido pulmonar:*

5 h después de la aplicación, los animales se sometieron a anestesia total mediante inyección intraperitoneal de fentanilo/midazolam/medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg de peso corporal). Se aplicaron 1,5 mg de D-luciferina disueltos en 50 µl de PBS mediante la vía de inhalación (inhalación de la solución después de aplicarla directamente a las fosas nasales) y se aplicaron sistémicamente 10 µl de D-luciferina mediante inyección intraperitoneal. Después de 10 minutos de incubación, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se diseccionó la arteria del riñón izquierdo y se perfundieron los pulmones con 5 ml de PBS helado mediante inyección en el ventrículo derecho. Se explantaron los pulmones y la tráquea y se colocaron en una placa de Petri para su posterior obtención de imágenes ex vivo. Las imágenes de bioluminiscencia se realizaron utilizando un sistema de imágenes in vivo IVIS 100 (Perkin Elmer, EE. UU.). Las imágenes se analizaron utilizando el software Living Image (Perkin Elmer, EE. UU.) mediante la medición de la radiancia en una región de interés (ROI) determinada. Los valores se muestran como radiancia promedio [p/s/cm<sup>2</sup>/sr].

*Resultados:*

Para el tratamiento de ratones Balb/c mediante olfateo dirigido al pulmón, se utilizó ARNm que codifica la luciferasa de luciérnaga formando un complejo en N/P 3 y 5. Los resultados del análisis de la actividad luciferasa de los pulmones explantados 5 h después del tratamiento (Figura 2) muestran que los complejos en una solución que contiene sal dan como resultado una mayor actividad de la proteína informadora en el tejido pulmonar en comparación con los mismos complejos en ausencia de una composición salina.

**Ejemplo III: Aplicación de formulación lipídica mediante nebulización.***Procedimientos:*

Formulación del complejo ARN-Lípido:

Los complejos se formularon como se describe en el ejemplo I. Como la dosis aplicada fue de 8 ml, los complejos se formaron en 4 alícuotas de 2 ml cada una.

*Tratamiento de animales*

Los ratones se colocan en grupos de 3 en una cámara de nebulización de cuerpo entero (DSI Buxco Mass Dosing Chamber, 37 x 20 x 20 cm) que se conecta a un nebulizador de malla (Aeroneb Solo, Aerogen). Los animales podían residir libremente dentro de la cámara. El aerosol generado se distribuyó homogéneamente mediante un flujo BIAS configurado en 3 l/min y un ciclo de trabajo del 100 %. El Aeroneb se llenó con porciones de 2 ml una tras otra. El volumen de formulación residual se almacenó en hielo hasta su completa nebulización.

Detección del nivel de luciferasa en tejido pulmonar:

24 h después de la aplicación, los animales se sometieron a anestesia total mediante inyección intraperitoneal de fentanilo/midazolam/medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg de peso corporal). Se aplicaron 1,5 mg de D-luciferina disueltos en 50 µl de PBS mediante la vía de inhalación (inhalación de la solución después de aplicarla directamente a las fosas nasales) y 10 µl de D-luciferina se aplicaron sistémicamente mediante inyección intraperitoneal. Después de 10 minutos de incubación, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se diseccionó la arteria del riñón izquierdo y se perfundieron los pulmones con 5 ml de PBS helado mediante inyección en el ventrículo derecho. Se explantaron los pulmones y la tráquea y se colocaron en una placa de Petri para su posterior obtención de imágenes ex vivo. Las imágenes de bioluminiscencia se realizaron utilizando un sistema de imágenes in vivo IVIS 100 (Perkin Elmer, EE. UU.). Las imágenes se analizaron utilizando el software Living Image (Perkin Elmer, EE. UU.) mediante la medición de la radiancia en una región de interés (ROI) determinada. Los valores se muestran como radiancia promedio [p/s/cm<sup>2</sup>/sr].

Resultados:

Para el tratamiento de ratones Balb/c mediante nebulización de complejos GL67 dirigidos al pulmón, se utilizó ARNm que codifica la luciferasa de luciérnaga formando un complejo en N/P 3 y 5. Los resultados del análisis de la actividad luciferasa de los pulmones explantados 24 h después del tratamiento (Figura 2) muestran que los complejos en una solución que contiene sal dan como resultado una mayor actividad de la proteína informadora en el tejido pulmonar en comparación con los mismos complejos en agua sin la composición salina. El hallazgo se puede observar tanto para los complejos N/P 3 como para los complejos N/P 5.

#### Figuras:

La Figura 1 muestra la actividad de luciferasa en pulmones explantados de ratones Balb/c 5 h después del tratamiento con complejos GL67 en N/P 3 y 5 en agua o agua que contiene sales (Ejemplo I).

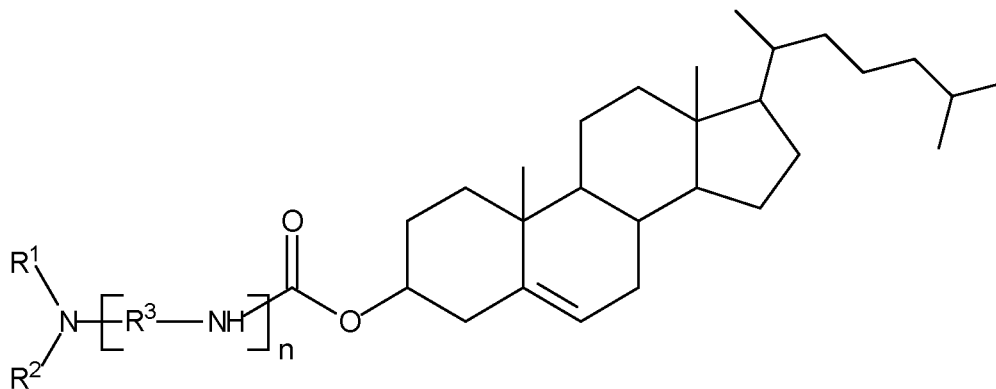
La Figura 2 muestra la actividad luciferasa en pulmones murinos 24 h después de la nebulización de complejos GL67 en agua o una solución salina. A: N/P3; B: N/P 5 (Ejemplo II).

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende

(i) partículas contenidas en una fase líquida, en la que las partículas comprenden ARN y una composición lipídica, y en la que la composición lipídica comprende:

5 (i-a) un derivado de colesterol de fórmula (I) o una sal del mismo:



(I)

en la que

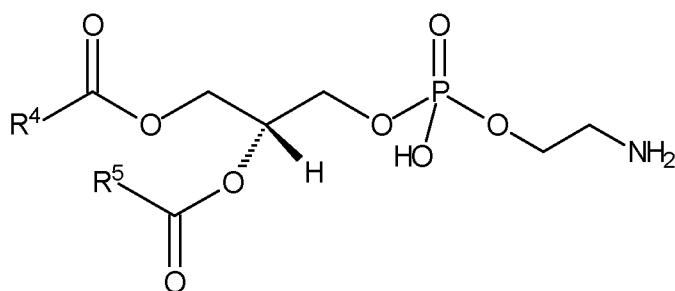
n es 0 o 1, preferentemente 0,

10  $R^1$  es un grupo  $-(CH_2)_q-NH_2$  o un grupo  $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$ , en la que q, r y s son independientemente un número entero de 2 a 6,

$R^2$  es un grupo  $-(CH_2)_t-NH_2$  o un grupo  $-(CH_2)_{tu}-NH-(CH_2)_w-NH_2$ , en la que t, u y w son independientemente un número entero de 2 a 6,

$R^3$  es un grupo alcanodiilo lineal que tiene de 1 a 4 átomos de carbono;

15 (i-b) un fosfoglicérido de fórmula (II) o una sal del mismo:



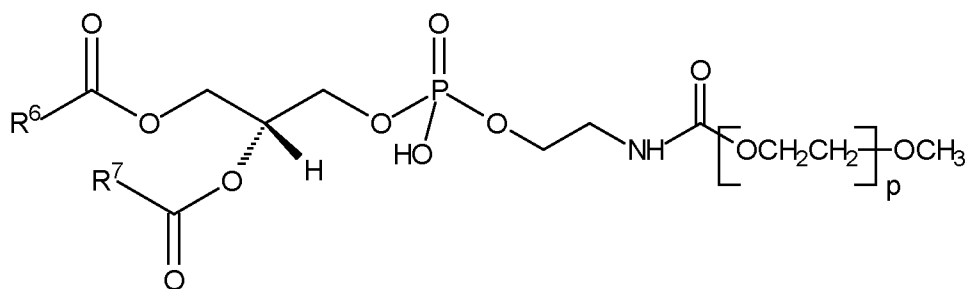
(II)

en la que

$R^4$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 24 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 24 átomos de carbono;

20  $R^5$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 24 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 24 átomos de carbono; y

(i-c) un fosfoglicérido pegilado de fórmula (III) o una sal del mismo:



(III)

en la que

p es un número entero de 5 a 200, preferentemente de 10 a 170 y con la máxima preferencia de 10 a 140;

5  $R^6$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 20 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 20 átomos de carbono;

$R^7$  es un grupo alquilo lineal que tiene de 10 a 20 átomos de carbono o un grupo alquenilo lineal que tiene de 1 a 3 dobles enlaces y de 10 a 20 átomos de carbono;

y

10 (ii) una composición salina disuelta en forma de cationes y aniones en la fase líquida, en la que la composición salina disuelta comprende uno o más cationes seleccionados entre  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $NH_4^+$  y uno o más aniones seleccionados de  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $HCO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ , y  $H_2PO_4^-$ , y en la que la concentración de los cationes de la composición salina disueltos en la fase líquida es de 1 a 1000 mM.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ARN es ARNm.

15 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el derivado de colesterol de fórmula (I) es GL67, en la que, con respecto a la fórmula (I), n es 0,  $R^1$  es un grupo  $-(CH_2)_3-NH_2$  y  $R^2$  es un grupo  $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$ .

4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el fosfoglicérido de fórmula (II) es 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina.

20 5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el fosfoglicérido pegilado de fórmula (III) es 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000.

6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la relación molar de los componentes (i-a): (i-b): (i-c) en la composición lipídica es 1: (0,5 a 5): (0,01 a 1).

7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que las partículas tienen un diámetro promedio de partículas en el intervalo de 1 a 5.000 nm.

25 8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la relación N/P del número de átomos de nitrógeno N derivados del derivado de colesterol de fórmula (I) con respecto al número de grupos fosfato P en el ARN está en el intervalo de 1 a 100.

9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la fase líquida en la que están contenidas las partículas y se disuelve la composición salina comprende agua.

30 10. Un procedimiento de preparación de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, dicho procedimiento comprende las etapas de:

a) disolver y mezclar los componentes de la composición lipídica en un solvente orgánico, seguido de la liofilización de la composición lipídica;

b) rehidratar la composición lipídica liofilizada a través de la adición de agua;

35 c) combinar la composición lipídica rehidratada con una solución acuosa del ARN para permitir que se formen partículas que comprenden ARN y la composición lipídica que están contenidas en una fase líquida; y

d) añadir la composición salina de manera que la composición salina se disuelva en forma de cationes y aniones en la fase líquida.

11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad a través de una terapia basada en ARN.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 en la que la enfermedad a tratar o prevenir es una enfermedad pulmonar.
- 5 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en la que el tratamiento o la prevención implica la administración de la composición a o a través del tracto respiratorio.



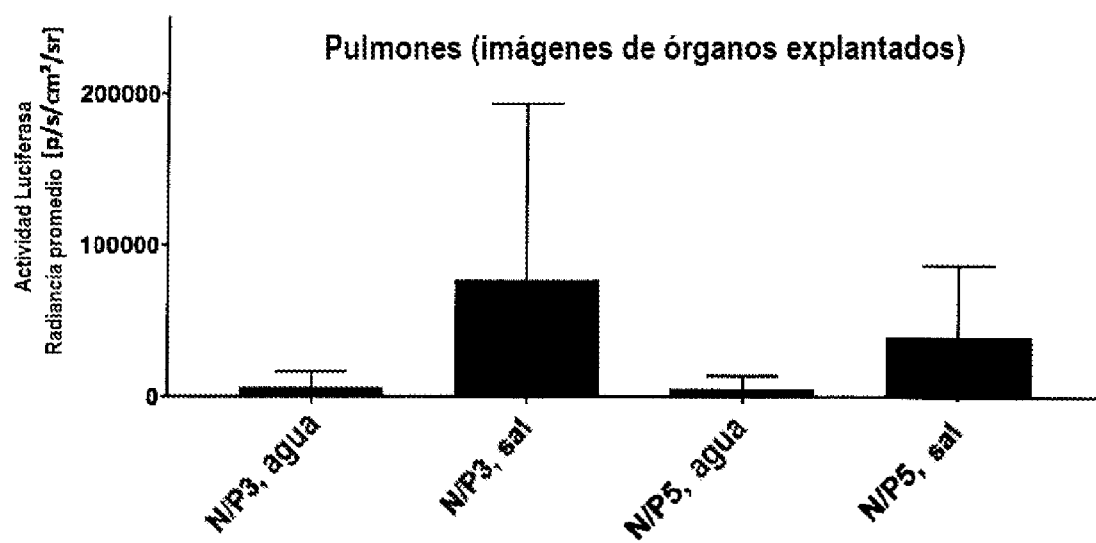


Figura 1

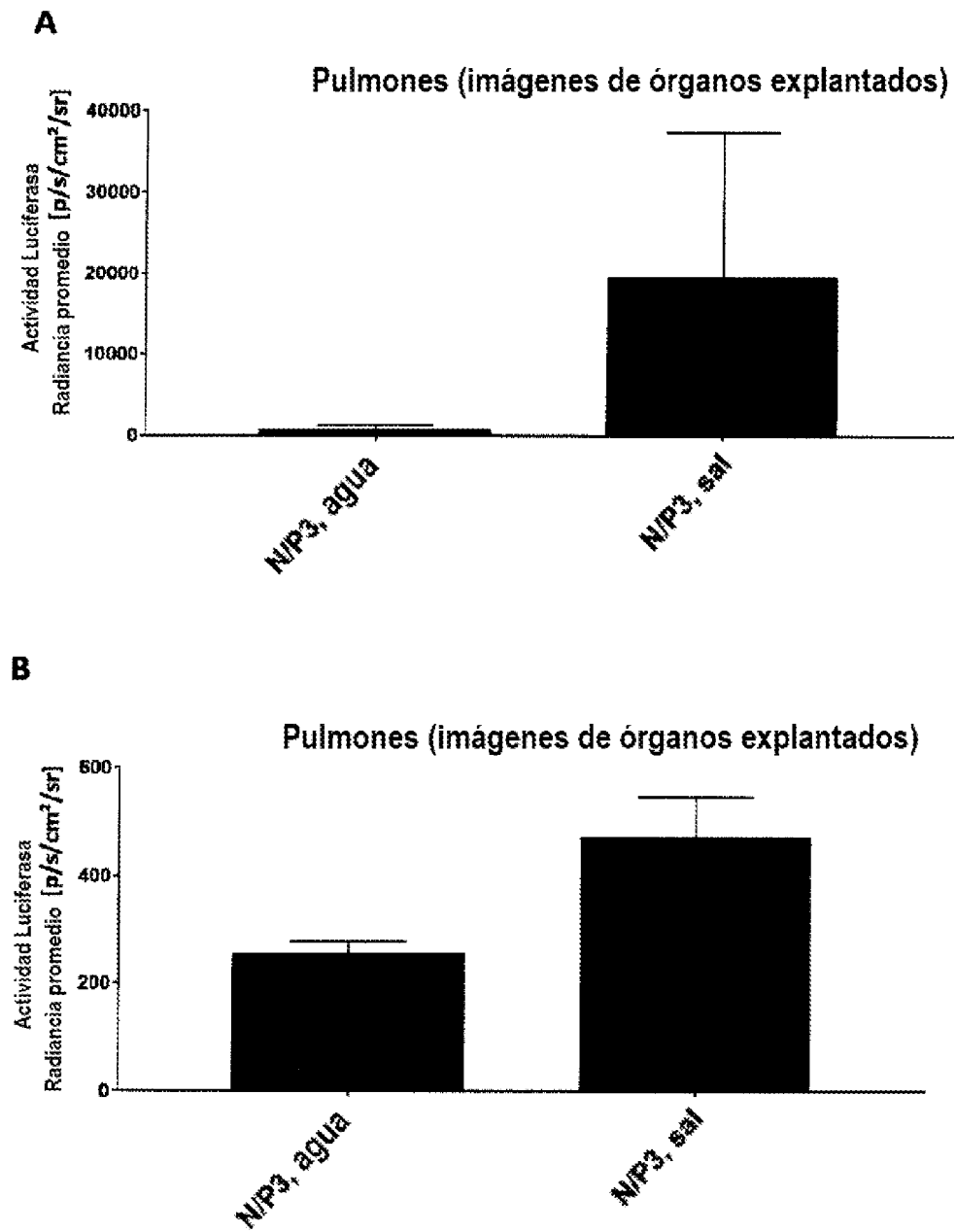


Figura 2