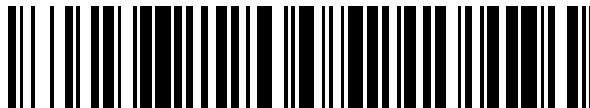


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 873**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

C07C 211/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2013 PCT/US2013/034602**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13149140**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013 E 13768446 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2830595**

54 Título: **Lípidos catiónicos ionizables**

30 Prioridad:

29.03.2012 US 201261617468 P

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

26.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 762 873 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).

DESCRIPCION

Lípidos catiónicos ionizables

5 ANTECEDENTES

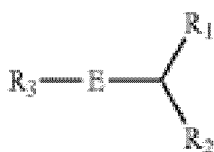
La administración liposomal de ácidos nucleicos se ha empleado como un medio para efectuar la administración específica del sitio de terapias a base de ADN plasmídico encapsulado, oligonucleótidos antisentido, ARN interferente corto y microARN, sin embargo, la administración eficiente de ácidos nucleicos a células y tejidos objetivo, también conocida como la transfección posterior de tales células y tejidos objetivo sigue siendo un desafío técnico. A pesar de la disponibilidad de múltiples sistemas y vehículos basados en liposomas para facilitar la administración de agentes terapéuticos a células y tejidos objetivo, todavía existen muchos problemas tanto en aplicaciones *in vivo* como *in vitro*. Por ejemplo, un inconveniente significativo de los sistemas de administración liposomales se relaciona con la construcción de liposomas que tengan suficiente cultivo celular o estabilidad *in vivo* para alcanzar las células y/o compartimentos intracelulares objetivo deseados, y la capacidad de tales sistemas de administración liposomales para liberar eficientemente sus materiales encapsulados a dichas células objetivo.

Además, muchos de los lípidos catiónicos que se emplean para construir tales vehículos a base de liposomas son generalmente tóxicos para las células objetivo. En particular, la cantidad de dicho lípido catiónico que es necesaria para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente encapsulado puede ser tóxica para las células objetivo. Por consiguiente, la toxicidad asociada con el lípido catiónico representa un obstáculo significativo para su uso general como vectores no virales, particularmente en las cantidades necesarias para administrar con éxito cantidades terapéuticamente eficaces de los materiales encapsulados a las células objetivo.

A pesar de las limitaciones anteriores, y como resultado de su capacidad para proteger y facilitar la administración de materiales encapsulados a una o más células objetivo, los vehículos a base de liposomas se consideran un portador atractivo para los agentes terapéuticos y están sujetos a continuos esfuerzos de desarrollo. Aunque los vehículos a base de liposomas que comprenden un componente lipídico catiónico han mostrado resultados prometedores con respecto a la encapsulación, la estabilidad y la localización del sitio, sigue habiendo una gran necesidad de mejorar los sistemas de administración a base de liposomas. En particular, sigue habiendo una necesidad de lípidos catiónicos e ionizables mejorados que demuestren propiedades farmacocinéticas mejoradas y que sean capaces de administrar macromoléculas, como ácidos nucleicos a una amplia variedad de tipos de células y tejidos con mayor eficacia. Es importante destacar que también sigue habiendo una necesidad particular de nuevos lípidos ionizables catiónicos que se caracterizan por tener una toxicidad reducida y son capaces de administrar eficientemente ácidos nucleicos y polinucleótidos encapsulados a células, tejidos y órganos específicos.

La US 2011/311583 A1 describe "lípidos y las sales e isómeros correspondientes de los mismos, que tienen la estructura,

XXXIII



en donde:

50 R_1 y R_2 son cada uno independientemente para cada caso alquilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alqueno C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, alquino C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, acilo C_{10} - C_{30} opcionalmente sustituido, o -conector-ligando;

55 R_3 es H, alquilo C_1 - C_{10} opcionalmente sustituido, alqueno C_2 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquino C_2 - C_{10} opcionalmente sustituido, alquiheterociclo, alquifosfato, alquifosforotioato, alquifosforoditioato, alquifosfonatos, alquilaminas, hidroxialquilos, ω -aminoalquilos, ω -aminoalquilos(sustituidos), ω -fosfoalquilos, ω -tiofosfoalquilos, polietilenglicol opcionalmente sustituido (PEG, mw 100-40K), mPEG opcionalmente sustituido (mw 120-40K), heteroarilo, heterociclo o conector-ligando;

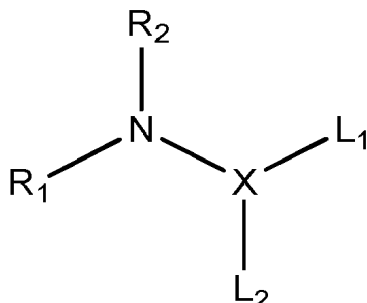
60 E es O, S, N(Q), C(O), N(Q)C(O), C(O)N(Q), (Q)N(CO)O, O(CO)N(Q), S(O), NS(O)₂N(Q), S(O)₂, N(Q)S(O)₂, SS, O=N, arilo, heteroarilo, cíclico o heterociclo; y

Q es H, alquilo, ω -aminoalquilo, ω -aminoalquilo(sustituido), ω -fosfoalquilo o ω -tiofosfoalquilo".

65 RESUMEN

Las realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Específicamente, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura:



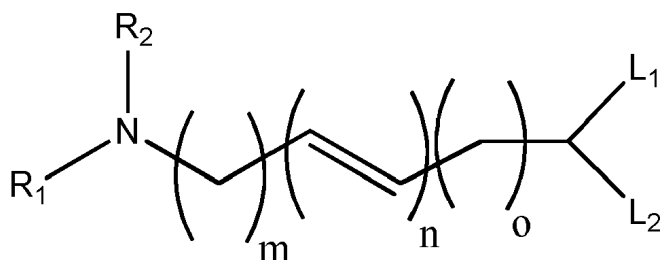
20 en la que R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C₁-C₂₀ variablemente saturado o insaturado y un acilo C₆-C₂₀ variablemente saturado o insaturado; en la que L₁ y L₂ son cada uno un alquenilo C₁₈ no sustituido, poliinsaturado; y en donde x se selecciona del grupo que consiste de un alquilo C₅-C₂₀ y un alquenilo C₁-C₂₀ variablemente insaturado.

25 En la presente se describen nuevos compuestos lipídicos catiónicos e ionizables, composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos y métodos relacionados de su uso. En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en la presente son útiles como composiciones liposomales o como componentes de composiciones liposomales para facilitar la administración y la posterior transfección de una o más células objetivo. En ciertas realizaciones, las composiciones lipídicas divulgadas en la presente son lípidos catiónicos y/o ionizables. Por ejemplo, los compuestos lipídicos divulgados en la presente pueden comprender un grupo funcional ionizable básico como una amina. En algunas realizaciones, los compuestos descritos en la presente se han diseñado en base a una o más características o propiedades deseadas, por ejemplo, para mejorar la eficacia de la transfección o para promover resultados biológicos específicos.

35 En ciertas realizaciones divulgadas en la presente, los compuestos lipídicos comprenden generalmente un grupo de cabeza polar hidrófilo y un grupo de cola hidrófobo no polar. Por ejemplo, los compuestos lipídicos divulgados en la presente pueden comprender generalmente uno o más grupos de cabeza funcionales catiónicos y/o ionizables, como un grupo funcional amina que tiene uno o más sustituyentes alquilo o arilo. En ciertas realizaciones, los compuestos lipídicos divulgados en la presente puede comprender un grupo de cabeza funcional amino ionizable catiónico al que está unido (por ejemplo, unido covalentemente) dos grupos, sustituyentes o fracciones alquilo funcionales (por ejemplo, un grupo R₁ y un grupo R₂, en donde tanto R₁ como R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de alquilos C₁-C₁₀).

45 En algunas realizaciones, el grupo de cabeza hidrófilo (por ejemplo, un grupo alquil amino) está unido (por ejemplo, unido covalentemente) a un grupo de cola hidrófobo (lipófilo). Por ejemplo, el grupo de cola lipófilo (por ejemplo, uno o más de un grupo L₁ y un grupo L₂) de los compuestos divulgados en la presente puede comprender uno o más grupos no polares, como colesterol o un alquilo variable insaturado opcionalmente sustituido (por ejemplo, un octadeca-9,12-dieno u octadec-6, 9-dieno opcionalmente sustituido).

50 En ciertas realizaciones, la presente divulgación se refiere a compuestos que tienen la estructura de fórmula (I):



(I)

65 en la que R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, un alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado y un acilo C₆-C₂₀ opcionalmente sustituido

variablenente saturado o insaturado; en donde L_1 y L_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, un alquilo C_1-C_{30} opcionalmente sustituido, un alqueno C_1-C_{30} variablenente insaturado opcionalmente sustituido y un alquino C_1-C_{30} opcionalmente sustituido; en donde m y 0 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de cero y cualquier número entero positivo (por ejemplo, donde m es tres); y en donde n es cero o cualquier número entero positivo (por ejemplo, donde n es uno).

En ciertas realizaciones, el compuesto tiene la estructura de fórmula (I), en la que R_1 y R_2 son cada uno metilo. En tal realización, el grupo de cabeza catiónico polar del compuesto comprende un grupo dimetil amino ionizable.

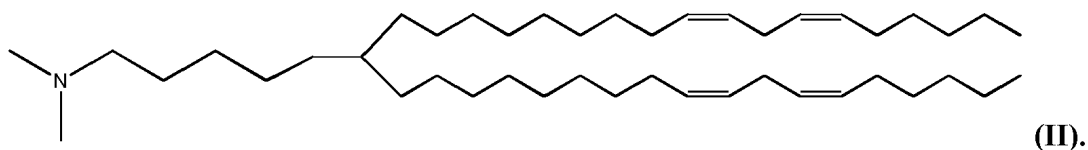
En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura de fórmula (I), en la que L_1 y L_2 son cada uno un alqueno C_6-C_{20} opcionalmente sustituido poliinsaturado. Por ejemplo, se contemplan los compuestos en los que L_1 y L_2 son cada uno un alqueno C_{18} opcionalmente sustituido poliinsaturado. En otras realizaciones, L_1 y L_2 son cada uno un alqueno C_{18} no sustituido poliinsaturado. En otras realizaciones más, L_1 y L_2 son cada uno un octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno) opcionalmente sustituido. En otras realizaciones más, L_1 es hidrógeno y L_2 es colesterol.

En ciertas realizaciones divulgadas en la presente, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde 0 es cero. Alternativamente, en otras realizaciones, 0 es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más).

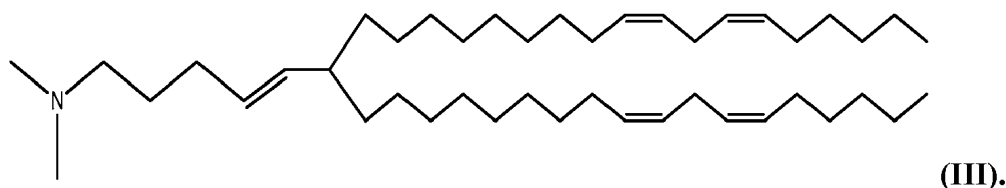
En ciertas realizaciones divulgadas en la presente, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde m es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En algunas realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I) en donde m es cuatro. En algunas realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde m es tres.

También se divulgan en la presente compuestos que tienen la estructura de fórmula (I), en donde n es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En otras realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde n es cero.

En algunas realizaciones particulares, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde R_1 y R_2 son cada uno metilo; en donde L_1 y L_2 son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); en donde m es cuatro; en donde n es cero; y en donde 0 es uno. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al compuesto (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-15,18-dien-1-amina. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (II) (referida en la presente "HGT5000").

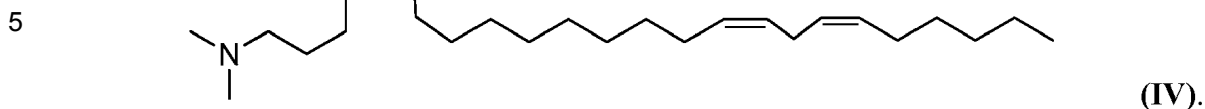


En algunas realizaciones particulares, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde R_1 y R_2 son cada uno metilo; en donde L_1 y L_2 son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); en donde m es 3; en donde n es uno; y en donde 0 es cero. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al compuesto (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-4,15,18-trien-1-amina. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (III) (referida en la presente "HGT5001").

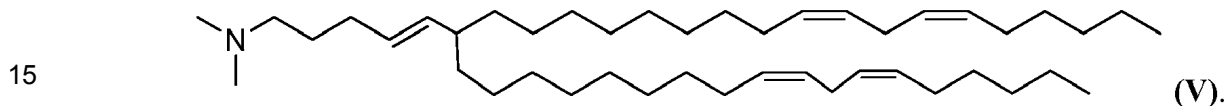


Debe entenderse que en aquellas realizaciones divulgadas en la presente en las que n es uno, tales compuestos pueden ser un isómero cis, un isómero trans o, alternativamente, una mezcla racémica de los mismos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones donde n es uno, n es un isómero cis, como se representa por un compuesto

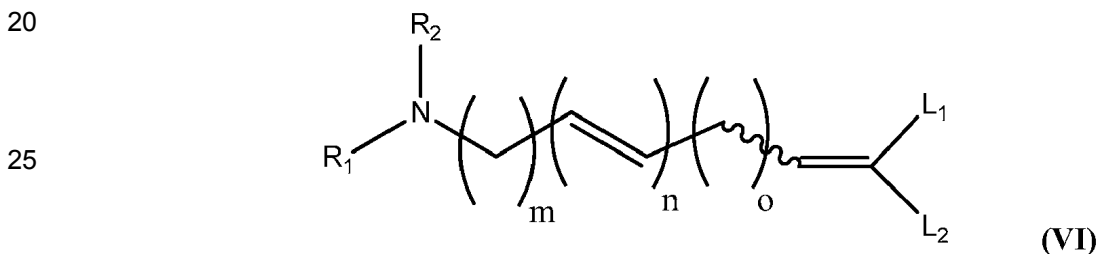
que tiene la estructura de fórmula (IV):



10 Alternativamente, en otras realizaciones en las que n es uno, n es un isómero trans, como se representa por un compuesto que tiene la estructura de fórmula (V):



También se describen compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI):



30 en donde R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, un alquilo C_1 - C_{20} opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6 - C_{20} opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado; en donde L_1 y L_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, un alquilo C_1 - C_{30} opcionalmente sustituido, un alquenilo C_1 - C_{30} opcionalmente sustituido variablemente insaturado y un alquinilo C_1 - C_{30} opcionalmente sustituido; y en donde m, n y 0 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de cero y cualquier número entero positivo.

35 En algunas realizaciones particulares, la presente divulgación está dirigida a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en la que R_1 y R_2 son cada uno metilo. En otras realizaciones, las presentes divulgaciones están dirigidas a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en la que R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y metilo.

40 También se contemplan compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde L_1 y L_2 son cada uno un alquenilo C_6 - C_{20} poliinsaturado opcionalmente sustituido (por ejemplo, donde L_1 y L_2 son cada uno un alquenilo C_{18} poliinsaturado opcionalmente sustituido o donde L_1 y L_2 son cada uno un alquenilo C_{18} no sustituido poliinsaturado). En ciertas realizaciones, divulgadas en la presente, L_1 y L_2 son cada uno un octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno) opcionalmente sustituido. En otras realizaciones L_1 es hidrógeno y L_2 es colesterol.

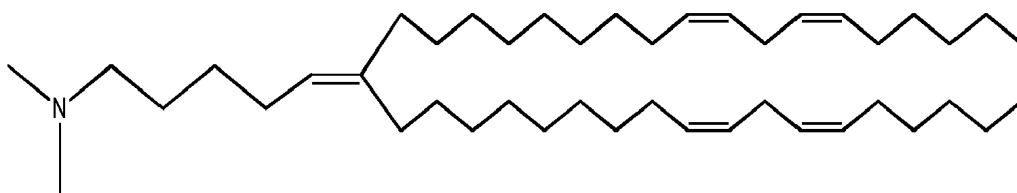
45 En ciertas realizaciones divulgadas en la presente, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde m es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En algunas realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde m es cuatro. En ciertas realizaciones, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde m es por lo menos cinco (por ejemplo, donde m es cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más).

50 En la presente también se divulgan compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde n es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En otras realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde n es cero.

55 En ciertas realizaciones divulgadas en la presente, las presentes divulgaciones están dirigidas a compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde o es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En ciertas realizaciones, las presentes divulgaciones se refieren a un

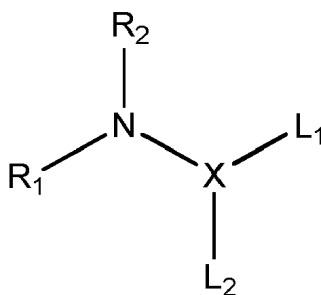
compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde o es por lo menos cinco (por ejemplo, en donde o es cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). Alternativamente, en otras realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde o es cero.

5 También se contemplan compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde R₁ y R₂ son cada uno metilo; en donde L₁ y L₂ son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); en donde m es 4; y en donde tanto n como 0 son cero. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al compuesto (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracososa-5,15,18-trien-1-amina. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al compuesto que tiene la estructura de fórmula (VII), (referido en la presente como "HGT5002"):



(VII).

También se divulgan en la presente compuestos que tienen la estructura de fórmula (VIII):



(VIII).

35 en donde R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo o alquenilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado y un acilo C₆-C₂₀ opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado; en donde L₁ y L₂ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C₁-C₃₀ opcionalmente sustituido, un alquenilo C₁-C₃₀ opcionalmente sustituido variablemente insaturado y un alquinilo C₁-C₃₀ opcionalmente sustituido; y en donde x se selecciona del grupo que consiste de un alquilo C₁-C₂₀ y un alquenilo C₁-C₂₀ variablemente insaturado.

40 En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en la que R₁ y R₂ son cada uno metilo. En otras realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en la que R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y un alquilo C₁-C₆.

45 En otras realizaciones, la presente divulgación se refiere a compuestos que tienen la estructura de fórmula (VIII), en la que L₁ y L₂ son cada uno un alquenilo C₁₈ no sustituido poliinsaturado. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, L₁ y L₂ son cada uno un octadeca-9,12-dieno opcionalmente sustituido (por ejemplo, L₁ y L₂ son cada uno un octadeca-9,12-dieno u octadec-6, 9- dieno no sustituido). En ciertas otras realizaciones, L₁ es hidrógeno y L₂ es el colesterol.

50 En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x es un alquenilo C₆. En otras realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x es hexano. En otras realizaciones más, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x es hex-1-eno. En otras realizaciones más, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x es hex-2-eno. En ciertas realizaciones, x no es hexano. En otras realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x es un alquenilo C₆₋₁₀ o un alquilo C₆₋₁₀.

55 En una realización particular, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VIII), en donde R₁ y R₂ son cada uno metilo; en donde L₁ y L₂ son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); y en donde x es hexano. En otra realización particular, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VIII), en donde R₁ y R₂ son cada uno metilo; en donde L₁ y L₂ son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); y en donde x es hex-1-eno. En otra realización particular más, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VIII), en donde R₁ y R₂ son cada uno metilo; en donde L₁ y L₂ son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); y en donde x es hex-2-eno.

Debe entenderse que en aquellas realizaciones descritas en la presente en las que los compuestos tienen una o más moléculas asimétricas o quirales (por ejemplo, uno o más enlaces dobles carbono-carbono insaturados), los isómeros *cis* (Z) y *trans* (E) están dentro del alcance de esta invención.

Las composiciones divulgadas en la presente pueden usarse para preparar una o más composiciones farmacéuticas y/o vehículos liposomales (por ejemplo, una nanopartícula lipídica). En tales realizaciones, tales composiciones o vehículos farmacéuticos pueden comprender además uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste de un lípido catiónico, un lípido modificado con PEG, un lípido no catiónico y un lípido auxiliar. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los compuestos descritos en la presente (por ejemplo, HGT5000, HGT5001 y/o HGT5002) son lípidos catiónicos o ionizables que pueden usarse como un componente de una composición liposomal para facilitar o mejorar la administración y liberación de materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos) a una o más células objetivo (por ejemplo, permeando o fusionando con las membranas lipídicas de tales células objetivo). Enriquecer las composiciones liposomales con uno o más de los compuestos divulgados en la presente puede usarse como un medio para mejorar (por ejemplo reducir) la toxicidad o conferir de otra manera una o más propiedades deseadas a tal composición liposomal enriquecida (por ejemplo administración mejorada de los polinucleótidos encapsulados a una o más células objetivo y/o toxicidad *in vivo* reducida de una composición liposomal). Por consiguiente, también se contemplan composiciones farmacéuticas, y en particular composiciones liposomales, que comprenden uno o más de los compuestos divulgados en la presente. En ciertas realizaciones, tales composiciones farmacéuticas y liposomales comprenden uno o más de un lípido modificado con PEG, un lípido no catiónico y un lípido auxiliar. Por ejemplo, se contemplan composiciones farmacéuticas y liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) que comprenden uno o más de los compuestos divulgados en la presente (por ejemplo, HGT5000, HGT5001, y/o HGT5002) y uno o más lípidos auxiliares, lípidos no catiónicos y componentes lipídicos modificados con PEG. También se contemplan composiciones farmacéuticas y liposomales que comprenden uno o más de los compuestos divulgados en la presente y que comprenden además uno o más lípidos catiónicos adicionales. De manera similar, también se contemplan composiciones liposomales y composiciones farmacéuticas (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) que comprenden uno o más de los compuestos HGT5000, HGT5001 y/o HGT5002 y uno o más de C12-200, DLinDMA, CHOL, DOPE, DMG-PEG-2000, ICE, DSPC, DODAP, DOTAP y C8-PEG-2000. En ciertas realizaciones, tales composiciones farmacéuticas y composiciones liposomales se cargan con o encapsulan de otro modo materiales como, por ejemplo, uno o más polinucleótidos biológicamente activos.

En ciertas realizaciones, una o más de las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) comprenden uno o más de los compuestos divulgados en la presente y uno o más lípidos adicionales. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden o están enriquecidas de otra manera con uno o más de los compuestos divulgados en la presente pueden comprender además uno o más de DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano), DLinDMA, DLin-KC2-DMA, C12-200 e ICE. En una realización, la composición farmacéutica comprende una nanopartícula lipídica que comprende HGT5000, DOPE, colesterol y/o DMG-PEG2000. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una nanopartícula lipídica que comprende HGT5001, DOPE, colesterol y/o DMG-PEG2000. En otra realización más, la composición farmacéutica comprende una nanopartícula lipídica que comprende HGT5002, DOPE, colesterol y/o DMG-PEG2000.

En ciertas realizaciones, una o más de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden comprender uno o más lípidos modificados con PEG. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden o están enriquecidas con uno o más de los compuestos divulgados en la presente pueden comprender además uno o más lípidos modificados con PEG que comprenden una cadena de poli(etilenglicol) de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido que comprende uno o más alquilos C₆-C₂₀.

De manera similar, las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) pueden comprender o pueden enriquecerse de otro modo con uno o más de los compuestos divulgados en la presente y pueden comprender además uno o más de los lípidos auxiliares que se seleccionan del grupo que consiste de DSPC (1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina), DPPC (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina), DOPE (1,2-dioleil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPE (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DMPE (1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DOPG (2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol)), DOPE (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DSPE (1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DLPE (1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPS (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina), ceramidas, esfingomielinas y colesterol.

En ciertas realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposomales que comprenden tales compuestos (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) comprenden uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ADN o ARN encapsulado). En otras realizaciones, el uno o más polinucleótidos comprenden por lo menos un ácido nucleico bloqueado (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, doce, quince, dieciséis, dieciocho, veinte o más residuos o monómeros de ácidos nucleicos bloqueados). Cuando el uno o más polinucleótidos encapsulados comprenden ARN, dicho ARN puede incluir, por ejemplo, ARNm, ARNip, ARNsno, microARN y combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados en las composiciones farmacéuticas y liposomales de la presente comprenden ARNm que codifica, por ejemplo, un polipéptido, proteína o enzima funcional, y tras ser expresado (es decir, traducido) por una o más células objetivo se produce un producto de expresión funcional (por ejemplo, un polipéptido, proteína o enzima) y, en algunos casos, es secretado por la célula objetivo en la circulación periférica (por ejemplo, plasma) de un sujeto. En ciertas realizaciones, el uno o más de los polinucleótidos que comprenden (o se cargan o encapsulan de otro modo en) los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente codifican un ácido nucleico (por ejemplo, un polipéptido) que se está expresando de manera aberrante por el sujeto. En ciertas realizaciones, el uno o más de los polinucleótidos encapsulados que comprenden tales compuestos y composiciones liposomales o farmacéuticas (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) codifican una proteína o enzima funcional. Por ejemplo, el polinucleótido (por ejemplo, ARNm) puede codificar una proteína o enzima seleccionada del grupo que consiste de eritropoyetina, hormona de crecimiento humano, regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), alfa-glucosidasa, arilsulfatasa A, alfa-galactosidasa A, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, iduronato-sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparan sulfamidasa, heparina-N-sulfatasa, lipasa de ácido lisosomal, hialuronidasa, galactocerebrosidasa, ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamoilfosfato sintetasa 1 (CPS1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL) y arginasa 1 (ARG1).

En ciertas realizaciones, el polinucleótido encapsulado codifica una enzima, dicha enzima puede ser una enzima del ciclo de la urea (por ejemplo, ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL) o arginasa 1 (ARG1)). En ciertas realizaciones, el uno o más de los polinucleótidos encapsulados comprenden ARNm que codifica una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, el polinucleótido encapsulado es ARNm que codifica una o más de las enzimas α -galactosidasa A, iduronato-2-sulfatasa, iduronato sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, beta-glucosidasa y galactocerebrosidasa).

También se contemplan en la presente composiciones farmacéuticas y liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) que comprenden uno o más de los compuestos divulgados en la presente y uno o más polinucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido), y en particular polinucleótidos que comprenden una o más modificaciones químicas. Las modificaciones de polinucleótidos contempladas pueden incluir, por ejemplo, modificaciones o sustituciones de azúcar (por ejemplo, una o más de una modificación de 2'-O-alquilo, un polinucleótido bloqueado (LNA) o un polinucleótido peptídico (PNA)). En realizaciones en las que la modificación del azúcar es una modificación 2'-O-alquilo, dicha modificación puede incluir, pero no está limitada a, una modificación 2'-desoxi-2'-fluoro, una modificación 2'-O-metilo, una modificación 2'-O-metoxietilo y una modificación 2'-desoxi. En ciertas realizaciones en las que la modificación es una modificación de nucleobase, dicha modificación puede seleccionarse del grupo que consiste de una 5-metilcitidina, pseudouridina, 2-tiouridina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina citosina, y combinaciones de las mismas.

En aquellas realizaciones en las que el polinucleótido es ARNm, tales modificaciones químicas preferiblemente hacen que el ARNm sea más estable (por ejemplo, más resistente a la degradación de la nucleasa) y pueden comprender, por ejemplo, una modificación de bloqueo final de una región no traducida 5' o 3' del ARNm. En ciertas realizaciones, la modificación química comprende la inclusión de una secuencia parcial de un gen CMV inmediato-temprano 1 (IE1) en la región 5' no traducida del ARNm. En otras realizaciones, la modificación química comprende la inclusión de una cola poli A en la región 3' no traducida del ARNm. También se contemplan modificaciones químicas que comprenden la inclusión de una estructura Cap1 en la región 5' no traducida del ARNm. En otras realizaciones más, la modificación química comprende la inclusión de una secuencia que codifica la hormona de crecimiento humano (hGH) a la región no traducida 3' del ARNm.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente pueden formularse para dirigirse y/o transfectar específicamente una o más células, tejidos y órganos objetivo. En ciertas realizaciones, tales compuestos y composiciones farmacéuticas facilitan la transfección de dichas células objetivo por uno o más mecanismos (por ejemplo, liberación basada en fusógenos y/o disrupción mediada por esponja protónica de la membrana de la bicapa lipídica de las células objetivo). Las células objetivo contempladas incluyen, por ejemplo, una o más células seleccionadas del grupo que consiste de hepatocitos, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células pulmonares, células óseas, células madre, células mesenquimales, células neurales, células cardíacas, adipocitos, células del músculo liso vasculares, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células beta, células pituitarias, células de revestimiento sinovial, células de ovario, células de testículo, fibroblastos, células B, células T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos y células tumorales.

También se divulgan métodos para tratar enfermedades (por ejemplo, una enfermedad asociada con la expresión aberrante de un gen o ácido nucleico) en un sujeto, en donde el método comprende administrar uno o más de los compuestos y/o composiciones farmacéuticas descritos en la presente al sujeto. También se contemplan métodos para transfectar una o más células objetivo con uno o más polinucleótidos, en donde el método comprende

poner en contacto la una o más células objetivo con los compuestos o la composición farmacéutica descritos en la presente de tal manera que la una o más células objetivo se transfecten con el uno o más polinucleótidos encapsulados en los mismos.

5 Las características analizadas anteriormente y muchas otras ventajas adicionales de la presente invención se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención cuando se toma junto con los ejemplos acompañantes. Las varias realizaciones descritas en la presente son complementarias y pueden combinarse o usarse juntas de una manera entendida por la persona experta a la vista de las enseñanzas contenidas en la presente.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 **Figura 1.** ilustra la concentración de proteína alfa-galactosidasa (GLA) humana detectada en el suero de ratones de tipo salvaje (WT) a los que se les administraron dos dosis intravenosas individuales de 90 µg, 60 µg, 30 µg, 20 µg o 10 µg de ARNm de GLA encapsulado en una nanopartícula lipídica a base de HGT5000 durante un período de una semana, en el día uno y nuevamente en el día cinco. Las concentraciones séricas de proteína GLA se determinaron a las seis horas, veinticuatro horas, cuarenta y ocho horas y setenta y dos horas después de la administración de la segunda dosis intravenosa. Los ratones se sacrificaron setenta y dos horas después de la administración de la segunda dosis intravenosa el día ocho. Como se muestra en la FIG. 1, después de la inyección intravenosa de la segunda dosis de ARNm de GLA encapsulado en las nanopartículas lipídicas a base de HGT5000, se pudo detectar un nivel sustancial de proteína GLA humana en suero de ratón en el plazo de seis horas y la proteína GLA fue detectable además cuarenta y ocho horas después de la administración.

25 **Figura 2.** representa la concentración de proteína alfa-galactosidasa (GLA) humana detectada en el hígado, riñón y bazo de ratones de tipo salvaje (WT) a los que se les administraron dos dosis individuales de 90 µg, 60 µg, 30 µg, 20 µg o 10 µg de ARNm de GLA encapsulado en una nanopartícula lipídica a base de HGT5000 durante un período de una semana, en el día uno y nuevamente en el día cinco. Los ratones se sacrificaron setenta y dos horas después de la administración de la segunda dosis intravenosa el día ocho y se determinó la concentración de proteína GLA en el hígado, los riñones y el bazo de los ratones de tipo salvaje (WT). Como se ilustra en la FIG. 2, las concentraciones en nanogramos de proteína GLA humana fueron detectables en el hígado, riñón y bazo después de la administración del ARNm de GLA.

35 **Figura 3.** ilustra la concentración de proteína alfa-galactosidasa (GLA) humana detectada en el suero de un modelo murino de enfermedad de Fabry durante un período de setenta y dos horas después de la administración intravenosa de una dosis intravenosa individual de 90 µg de ARNm de GLA encapsulado en una nanopartícula lipídica a base de HGT5000. Se detectaron concentraciones suprafisiológicas de proteína GLA en el suero de los ratones Fabry veinticuatro horas después de la administración de una dosis individual de 90 µg del ARNm de GLA encapsulado en una nanopartícula lipídica a base de HGT5000.

40 **Figura 4.** representa la concentración de proteína alfa-galactosidasa (GLA) humana detectada en el hígado, riñón, bazo y corazón de un modelo murino de enfermedad de Fabry a las veinticuatro y setenta y dos horas después de la administración intravenosa de una dosis individual de GLA encapsulada en una nanopartícula lipídica a base de HGT5000. La proteína GLA fue detectable en los órganos evaluados del ratón Fabry a las veinticuatro y setenta y dos horas después de la administración del ARNm de GLA, como se muestra en la FIG. 4.

45 **Figura 5.** ilustra las concentraciones de proteína alfa-galactosidasa (GLA) humana detectadas en suero de ratón de tipo salvaje (WT) durante un período de veinticuatro horas después de la inyección intravenosa de una dosis de 30 µg de ARNm de GLA encapsulado en una nanopartícula lipídica a base de HGT5001. Como se muestra en la FIG. 5, en el plazo de seis horas de la administración del ARNm de GLA, se detectó la proteína GLA humana en suero a concentraciones que superaban los niveles fisiológicos normales en 100 veces. De manera similar, en el plazo de veinticuatro horas tras la administración del ARNm de GLA, se detectó la proteína GLA humana en suero a concentraciones que excedían 30 veces los niveles fisiológicos normales.

55 **Figura 6.** ilustra las concentraciones de proteína alfa-galactosidasa (GLA) humana detectadas en el hígado, riñón y bazo de ratones de tipo salvaje (WT) durante un período de veinticuatro horas después de la inyección intravenosa de ARNm de GLA encapsulado en una nanopartícula lipídica a base de HGT5001. Como se muestra en la FIG. 6, se pudieron detectar niveles sustanciales de proteína GLA humana en el hígado, riñón y bazo de los ratones WT veinticuatro horas después de la administración intravenosa de ARNm de GLA encapsulado en una nanopartícula lipídica a base de HGT5001.

60 **Figura 7.** compara las concentraciones en suero de la proteína eritropoyetina (EPO) humana detectada en ratas Sprague-Dawley después de la administración intravenosa de una dosis individual de ARNm de EPO

65

encapsulado en una nanopartícula lipídica a base de HGT5000 o HGT5001 durante un período de veinticuatro horas. Como se ilustra en la FIG. 7, se detectaron concentraciones significativas de proteína EPO a las seis, doce, dieciocho y veinticuatro horas después de la administración intravenosa del ARNm de EPO en las nanopartículas lipídicas a base de tanto HGT5000 como HGT5001.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se divulgan nuevos compuestos que son útiles, por ejemplo, como vehículos de administración liposomal o como componentes de vehículos de administración liposomal. En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en la presente pueden usarse como una composición liposomal o, alternativamente, como componentes de una composición liposomal (por ejemplo, como una nanopartícula lipídica). También se divulgan composiciones farmacéuticas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) y métodos de uso relacionados con tales composiciones farmacéuticas. En ciertas realizaciones, tales compuestos y composiciones facilitan la administración de, por ejemplo, materiales encapsulados (por ejemplo, polinucleótidos) a una o más células, tejidos y órganos objetivo.

15

Los compuestos catiónicos y/o ionizables divulgados en la presente comprenden generalmente tanto un grupo de cabeza o fracción polar (hidrófilo) como un grupo o fracción de cola no polar (hidrófobo o lipófilo). En ciertas realizaciones, dichos grupo de cabeza polar y grupo de cola no polar están generalmente unidos (por ejemplo, unidos por uno o más enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas y enlaces covalentes) entre sí (por ejemplo, un grupo de cabeza y un grupo de cola unidos covalentemente entre sí por un alquilo o alquenilo C₁-C₁₀ opcionalmente sustituido variablemente insaturado). En ciertas realizaciones, el grupo de cabeza o fracción es hidrófilo (por ejemplo, un grupo de cabeza hidrófilo que comprende un alquilamino opcionalmente sustituido). Como se usa en la presente, el término "hidrófilo" se usa para indicar en términos cualitativos que un grupo funcional prefiere el agua, y típicamente tales grupos son solubles en agua. Por ejemplo, en la presente se divulgan compuestos que comprenden un grupo funcional alquilo variablemente insaturado unido a uno o más grupos hidrófilos (por ejemplo, un grupo de cabeza hidrófilo), en donde tales grupos hidrófilos comprenden un grupo amino o un grupo alquilamino opcionalmente sustituido.

20

25

En ciertas realizaciones, el grupo funcional o fracción hidrófilo seleccionado puede alterar o impartir de otra manera propiedades al compuesto o a la composición liposomal de la que dicho compuesto es un componente (por ejemplo, mejorando las eficiencias de transfección de una nanopartícula lipídica de la que el compuesto es un componente). Por ejemplo, la incorporación de un grupo amino como un grupo de cabeza hidrófilo en los compuestos divulgados en la presente puede promover la fusogenicidad de dicho compuesto (o de la composición liposomal de la que dicho compuesto es un componente) con la membrana celular de una o más células objetivo, mejorando de este modo, por ejemplo, las eficiencias de transfección de dicho compuesto. De manera similar, la incorporación de uno o más grupos o fracciones alquilamino en los compuestos divulgados (por ejemplo, como grupo de cabeza) puede promover adicionalmente la alteración de la membrana endosómica/lisosómica al explotar la fusogenicidad de tales grupos amino. Esto se basa no solo en el pKa del grupo amino de la composición, sino también en la capacidad del grupo amino de experimentar una transición de fase hexagonal y fusionarse con la membrana de la vesícula. (Koltover et al. Science (1998) 281:78-81.) Se cree que el resultado promueve la alteración de la membrana vesicular y la liberación del contenido de nanopartículas lipídicas.

30

35

40

De manera similar, en ciertas realizaciones, la incorporación de, por ejemplo, un grupo de cabeza hidrófilo ionizado o cargado positivamente en los compuestos divulgados en la presente puede servir para promover la liberación endosómica o lisosómica de, por ejemplo, contenidos que están encapsulados en una composición liposomal (por ejemplo, nanopartícula lipídica) de la invención. Tal liberación mejorada puede lograrse mediante uno o ambos mecanismos de disrupción mediados por esponja de protones y/o un mecanismo de fusogenicidad mejorado. El mecanismo de esponja de protones se basa en la capacidad de un compuesto, y en particular una fracción funcional o grupo del compuesto, para amortiguar la acidificación del endosoma. Esto puede manipularse o controlarse de otra manera por el pKa del compuesto o de uno o más de los grupos funcionales que comprenden dicho compuesto (por ejemplo, amino). Tales propiedades de disrupción endosómica promueven a su vez la hinchazón osmótica y la disrupción de la membrana liposomal, seguido de la transfección o liberación intracelular de los materiales del polinucleótido cargados o encapsulados en los mismos en la célula objetivo.

45

50

55

Los compuestos lipídicos divulgados en la presente pueden comprender generalmente uno o más grupos de cabeza funcionales catiónicos y/o ionizables, como un grupo funcional amina que tiene uno o más sustituyentes alquilo o arilo. En ciertas realizaciones, los compuestos lipídicos divulgados en la presente puede comprender un grupo de cabeza funcional amino ionizable catiónico al que está unido (por ejemplo, unido covalentemente) un grupo hidrófobo funcional, sustituyentes o fracciones (por ejemplo, un grupo R₁ y un grupo R₂, en donde tanto R₁ como R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y alquilos C₁-C₁₀). En ciertas realizaciones, dichos grupos funcionales hidrófilos e hidrófobos están unidos (por ejemplo, unidos covalentemente) entre sí por medio de un grupo intermediario (por ejemplo, un alquilo o un alquenilo variablemente insaturado).

60

Los compuestos descritos en la presente (por ejemplo, HGT5000, HGT5001 y HGT5002) también se

65

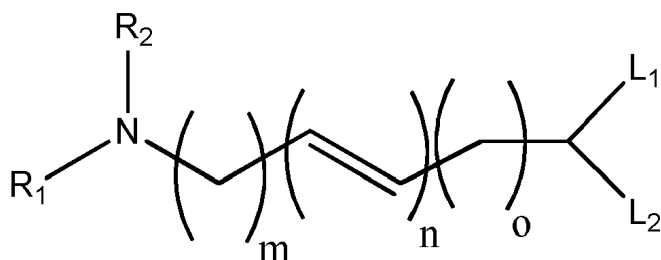
caracterizan por su toxicidad reducida, en particular en relación con los lípidos tradicionales y los lípidos catiónicos como C12-200. Por consiguiente, uno o más de los compuestos divulgados en la presente pueden usarse en lugar de uno o más lípidos tradicionales que se caracterizan por ser tóxicos en las cantidades necesarias para administrar una cantidad eficaz de uno o más agentes para dirigirse a células y tejidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposomales pueden prepararse de tal manera que comprendan uno o más de los compuestos lipídicos catiónicos ionizables divulgados en la presente (por ejemplo, HGT5000, HGT5001 y/o HGT5002) como un medio para reducir o eliminar de otro modo la toxicidad asociada con la composición liposomal. Los compuestos o lípidos ionizables catiónicos (por ejemplo, HGT5000, HGT5001 y/o HGT5002) pueden usarse como el único lípido catiónico en una o más de las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas), o alternativamente pueden combinarse con lípidos catiónicos tradicionales (por ejemplo, LIPOFECTINA o LIPOFECTAMINA), lípidos no catiónicos, lípidos modificados con PEG y/o lípidos auxiliares. En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en la presente, o alternativamente el componente lipídico catiónico total de las composiciones farmacéuticas y liposomales pueden comprender una relación molar de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 90%, de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 50%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 40% del lípido total presente en dicha composición farmacéutica o liposomal (por ejemplo, una nanopartícula lipídica), o preferiblemente de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 70% del lípido total presente en dicha composición farmacéutica o liposomal (por ejemplo, una nanopartícula lipídica). Adicionalmente, combinar o enriquecer vehículos liposomales con los compuestos lipídicos ionizables catiónicos divulgados en la presente permite una reducción correspondiente en la concentración de los otros componentes lipídicos del vehículo liposomal, proporcionando de este modo un medio para reducir o mitigar de otra manera la toxicidad asociada con otros lípidos catiónicos (por ejemplo, C12-200) que también pueden estar presentes en el vehículo liposomal.

En ciertas realizaciones, por lo menos uno de los grupos funcionales de fracciones que comprenden los compuestos divulgados en la presente es de naturaleza hidrófoba (por ejemplo, un grupo de cola hidrófoba que comprende un lípido de origen natural como el colesterol). Como se usa en la presente, el término "hidrófobo" se usa para indicar en términos cualitativos que un grupo funcional evita el agua, y típicamente tales grupos no son solubles en agua. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el grupo de cola hidrófobo o lipófilo (por ejemplo, uno o más de un grupo L₁ y un grupo L₂) de los compuestos divulgados en la presente puede comprender una o más grupos no polares como el colesterol o un alquilo o alquenido opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado (por ejemplo, un octadeca-9,12-dieno opcionalmente sustituido).

En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en la presente comprenden, por ejemplo, por lo menos un grupo de cabeza hidrófilo y por lo menos un grupo de cola hidrófobo, cada uno unido entre sí por, por ejemplo, un alquilo o alquenido opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado, convirtiendo de este modo tales compuestos en anfifílicos. Como se usa en la presente para describir un compuesto o composición, el término "anfifílico" significa la capacidad de disolverse tanto en entornos polares (por ejemplo, agua) como no polares (por ejemplo, lípidos). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en la presente comprenden por lo menos un grupo de cola lipófilo (por ejemplo, colesterol o un alquilo o alquenido C₆-C₂₀) y por lo menos un grupo de cabeza hidrófilo (por ejemplo, un alquil amino), cada uno unido a un grupo alquilo o alquenido C₁-C₂₀ intermediario (por ejemplo, hexano o hexeno).

Cabe destacar que los términos "grupo de cabeza" y "grupo de cola" como se usan describen los compuestos de la presente invención, y en particular los grupos funcionales que comprenden tales compuestos, se usan para facilitar la referencia para describir la orientación de uno o más grupos funcionales con respecto a otros grupos funcionales. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un grupo de cabeza hidrófilo (por ejemplo, amino) está unido (por ejemplo, por uno o más de enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas y enlaces covalentes) a un grupo funcional alquilo o alquenido (por ejemplo, hex-1-eno), que a su vez está unido a un grupo de cola hidrófobo (por ejemplo, colesterol o un alquenido C₆-C₂₀ variablemente insaturado).

También se divulgan en la presente compuestos que tienen la estructura de fórmula (I):



(I)

en la que R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, un alquilo o

alqueno C_1-C_{20} opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6-C_{20} opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado; en donde L_1 y L_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, un alquilo C_1-C_{30} opcionalmente sustituido, un alqueno C_1-C_{30} opcionalmente sustituido variablemente insaturado y un alqueno C_1-C_{30} opcionalmente sustituido; en donde m y 0 se seleccionan del grupo que consiste de cero y cualquier número entero positivo (por ejemplo, donde m es tres); y en donde n es cero o cualquier número entero positivo (por ejemplo, donde n es uno).

En ciertas realizaciones, el compuesto tiene la estructura de fórmula (I), en la que R_1 y R_2 son cada uno metilo. En tal realización, el grupo de cabeza catiónico polar del compuesto comprende un grupo dimetil amino ionizable.

En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura de fórmula (I), en la que L_1 y L_2 son cada uno un alqueno C_6-C_{20} opcionalmente sustituido poliinsaturado. Por ejemplo, se contemplan los compuestos en los que L_1 y L_2 son cada uno un alqueno C_{18} opcionalmente sustituido poliinsaturado. En otras realizaciones, L_1 y L_2 son cada uno un alqueno C_{18} no sustituido poliinsaturado. En otras realizaciones más, L_1 y L_2 son cada uno un octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno) opcionalmente sustituido. En otras realizaciones más, L_1 es hidrógeno y L_2 es colesterol. En ciertas realizaciones cada uno de L_1 y L_2 son (9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dieno. En ciertas realizaciones, cada uno de L_1 y L_2 son octadec-6, 9-dieno.

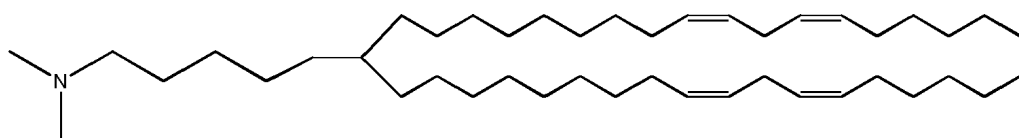
En ciertas realizaciones divulgadas en la presente, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde 0 es cero. Alternativamente, en otras realizaciones, 0 es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más).

En ciertas realizaciones divulgadas en la presente, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde m es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En algunas realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I) en donde m es cuatro. En algunas realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde m es tres.

También se divulgan en la presente compuestos que tienen la estructura de fórmula (I), en donde n es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En otras realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde n es cero.

En ciertas realizaciones, m y 0 se seleccionan independientemente del grupo que consiste de cero, uno (de tal manera que el alquilo es etilo), dos (de tal manera que el alquilo es metilo), tres (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, propilo o iso-propilo), cuatro (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, butilo, iso-butilo, sec-butilo o terc-butilo), cinco (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, pentano), seis (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, hexano), siete (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, heptano), ocho (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, octano), nueve (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, nonano) o diez (de tal manera que el alquilo es, por ejemplo, decano).

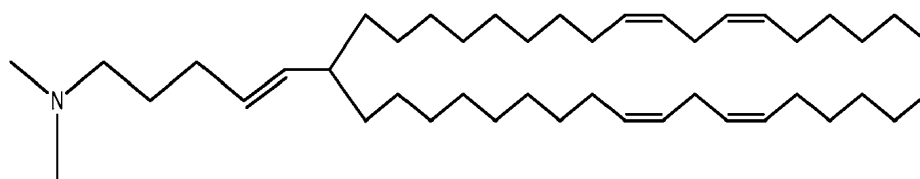
En algunas realizaciones particulares, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde R_1 y R_2 son cada uno metilo; en donde L_1 y L_2 son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); en donde m es cuatro; en donde n es cero; y en donde 0 es uno. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al compuesto (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-15,18-dien-1-amina, que tiene la estructura de fórmula (II) (referida en la presente "HGT5000").



(II).

En algunas realizaciones particulares, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (I), en donde R_1 y R_2 son cada uno metilo; en donde L_1 y L_2 son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); en donde m es 3; en donde n es uno; y en donde 0 es cero. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al compuesto (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-4,15,18-trien-1-amina, que tiene la estructura de fórmula (III) (referida en la presente "HGT5001").

5

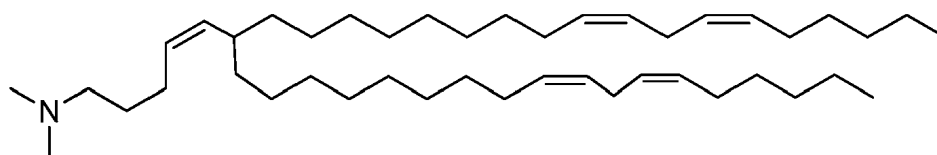


(III).

10

Debe entenderse que en aquellas realizaciones divulgadas en la presente en las que n es uno, tales compuestos pueden ser un isómero cis, un isómero trans o, alternativamente, una mezcla racémica de los mismos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones donde n es uno, n es un isómero cis, como se representa por un compuesto que tiene la estructura de fórmula (IV):

15

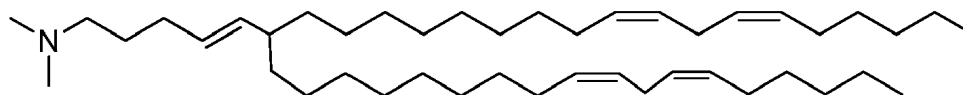


(IV).

20

Alternativamente, en otras realizaciones en las que n es uno, n es un isómero trans, como se representa por un compuesto que tiene la estructura de fórmula (V):

25

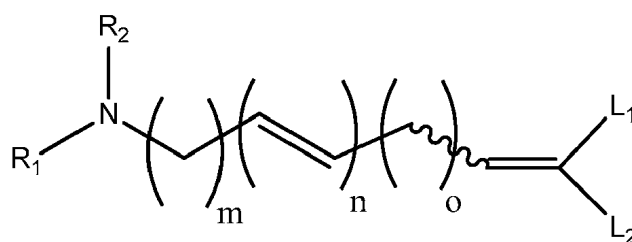


(V).

30

También se describen compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI):

35



(VI)

40

en donde R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, un alquilo o alquenilo C_1-C_{20} opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6-C_{20} opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado; en donde L_1 y L_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, un alquilo C_1-C_{30} opcionalmente sustituido, un alquenilo C_1-C_{30} opcionalmente sustituido variablemente insaturado y un alquínulo C_1-C_{30} opcionalmente sustituido; y en donde m, n y 0 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de cero y cualquier número entero positivo.

45

50

En algunas realizaciones particulares, la presente divulgación está dirigida a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en la que R_1 y R_2 son cada uno metilo. En otras realizaciones, las presentes divulgaciones están dirigidas a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en la que R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y metilo.

55

También se contemplan compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde L_1 y L_2 son cada uno un alquenilo C_6-C_{20} opcionalmente sustituido poliinsaturado (por ejemplo, donde L_1 y L_2 son cada uno un alquenilo C_{18} opcionalmente sustituido poliinsaturado o donde L_1 y L_2 son cada uno un alquenilo C_{18} no sustituido poliinsaturado). En ciertas realizaciones, divulgadas en la presente, L_1 y L_2 son cada uno un octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno) opcionalmente sustituido. En otras realizaciones L_1 es hidrógeno y L_2 es colesterol.

60

En ciertas realizaciones divulgadas en la presente, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde m es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En algunas realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde m es cuatro. En ciertas realizaciones, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde m es por lo menos cinco (por ejemplo, donde m es cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho,

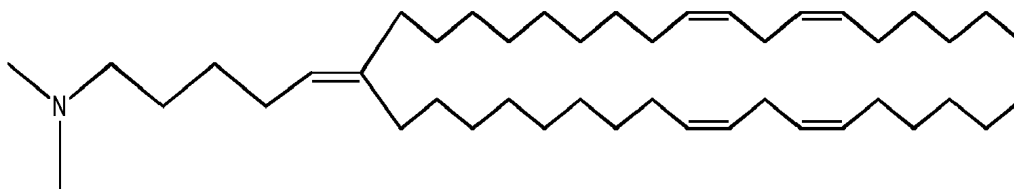
65

diecinueve, veinte o más).

En la presente también se divulgan compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde n es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En otras realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde n es cero.

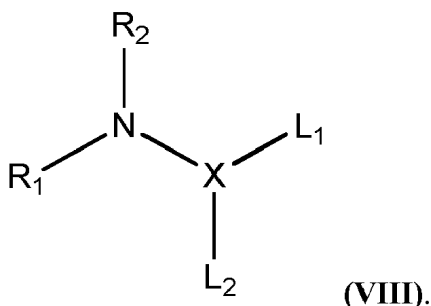
En ciertas realizaciones divulgadas en la presente, las presentes divulgaciones están dirigidas a compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde o es un número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En ciertas realizaciones, las presentes divulgaciones se refieren a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VI), en donde o es por lo menos cinco (por ejemplo, en donde o es cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). Alternativamente, en otras realizaciones particulares, las presentes divulgaciones se refieren a compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde o es cero.

También se contemplan compuestos que tienen la estructura de fórmula (VI), en donde R₁ y R₂ son cada uno metilo; en donde L₁ y L₂ son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); en donde m es 4; y en donde tanto n como 0 son cero. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere al compuesto (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-5,15,18-trien-1-amina. que tiene la estructura de fórmula (VII), (referido en la presente como "HGT5002"):



(VII).

También se divulgan en la presente compuestos que tienen la estructura de fórmula (VIII):



(VIII).

en donde R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo o alquenilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado y un acilo C₆-C₂₀ opcionalmente sustituido variablemente saturado o insaturado; en donde L₁ y L₂ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C₁-C₃₀ opcionalmente sustituido, un alquenilo C₁-C₃₀ opcionalmente sustituido variablemente insaturado y un alquinilo C₁-C₃₀ opcionalmente sustituido; y en donde x se selecciona del grupo que consiste de un alquilo C₁-C₂₀ y un alquenilo C₁-C₂₀ variablemente insaturado.

En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde R₁ y R₂ son cada uno metilo. En otras realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de hidrógeno y un alquilo C₁-C₆.

En otras realizaciones, la presente divulgación se refiere a compuestos que tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde L₁ y L₂ son cada uno un alquenilo C₁₈ no sustituido poliinsaturado. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, L₁ y L₂ son cada uno un octadeca-9,12-dieno opcionalmente sustituido (por ejemplo, L₁ y L₂ son cada uno un octadeca-9,12-dieno u octadec-6, 9-dieno no sustituido). En ciertas otras realizaciones, L₁ es hidrógeno y L₂ es el colesterol.

En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x es un alquenilo C₆. En otras realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x es hexano. En otras realizaciones más, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x es hex-1-eno. En otras realizaciones más, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x

es hex-2-eno. En ciertas realizaciones, x no es hexano. En otras realizaciones, los compuestos divulgados tienen la estructura de fórmula (VIII), en donde x es un alquenilo C₆₋₁₀ o un alquilo C₆₋₁₀.

5 En una realización particular, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VIII), en donde R₁ y R₂ son cada uno metilo; en donde L₁ y L₂ son cada uno octadeca-9,12-dieno; y en donde x es hexano. En otra realización particular, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VIII), en donde R₁ y R₂ son cada uno metilo; en donde L₁ y L₂ son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); y en donde x es hex-1-eno. En otra realización particular más, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura de fórmula (VIII), en donde R₁ y R₂ son cada uno metilo; en donde L₁ y L₂ son cada uno octadeca-9,12-dieno (u octadec-6, 9-dieno); y en donde x es hex-2-eno.

15 Como se usa en la presente, el término "alquilo" se refiere a hidrocarburos C₁-C₄₀ de cadena lineal y ramificada (por ejemplo, hidrocarburos C₆-C₂₀), e incluye tanto hidrocarburos saturados como insaturados. En ciertas realizaciones, el alquilo puede comprender uno o más alquilos cíclicos y/o uno o más heteroátomos como oxígeno, nitrógeno o azufre y puede estar opcionalmente sustituido con sustituyentes (por ejemplo, uno o más de alquilo, halo, alcoxilo, hidroxilo, amino, arilo, éter, éster o amida). En ciertas realizaciones, un grupo de cola hidrófobo alquilo contemplado comprende (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieno. En ciertas realizaciones, un grupo de cola hidrófobo alquilo contemplado comprende (u octadec-6,9-dieno). Se pretende que el uso de designaciones como, por ejemplo, "C₆-C₂₀" se refiera a un alquilo (por ejemplo, de cadena lineal o ramificada e incluye alquenos y alquilos) que tiene los átomos de carbono del intervalo indicado.

20 Como se usa en la presente, el término "arilo" se refiere a grupos aromáticos (por ejemplo, estructuras monocíclicas, bicíclicas y tricíclicas) que contienen de seis a diez carbonos en la porción del anillo. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos a través de átomos de carbono disponibles y en ciertas realizaciones pueden incluir uno o más heteroátomos como oxígeno, nitrógeno o azufre.

25 Debe entenderse que en aquellas realizaciones descritas en la presente en las que los compuestos tienen una o más moléculas asimétricas o quirales (por ejemplo, uno o más enlaces dobles carbono-carbono insaturados), los isómeros cis (Z) y trans (E) están dentro de los alcances de esta invención.

30 Los compuestos descritos en la presente pueden usarse para construir composiciones liposomales que faciliten o mejoren la administración y liberación de materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos terapéuticos) a una o más células objetivo (por ejemplo, permeando o fusionándose con las membranas lipídicas de tales células objetivo). Por ejemplo, cuando una composición liposomal (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) comprende o está enriquecida de otra manera con uno o más de los compuestos divulgados en la presente, la transición de fase en la bicapa lipídica de la una o más células objetivo puede facilitar la administración de los materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos terapéuticos encapsulados en una nanopartícula lipídica) en una o más células objetivo. De manera similar, en ciertas realizaciones los compuestos divulgados en la presente pueden usarse para preparar vehículos liposomales que se caracterizan por su toxicidad reducida *in vivo*. En ciertas realizaciones, la toxicidad reducida es una función de las altas eficiencias de transfección asociadas con las composiciones divulgadas en la presente, de tal manera que se puede administrar una cantidad reducida de dicha composición al sujeto para lograr una respuesta o resultado terapéutico deseado.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en la presente se caracterizan por tener una o más propiedades que proporcionan tales ventajas de compuestos con respecto a otros lípidos clasificados de manera similar. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en la presente permiten el control y la adaptación de las propiedades de las composiciones liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) de las que son un componente. En particular, los compuestos divulgados en la presente pueden caracterizarse por eficiencias de transfección mejoradas y su capacidad para provocar resultados biológicos específicos. Tales resultados pueden incluir, por ejemplo, una captación celular mejorada, capacidades de disrupción endosómica/lisosómica y/o promover la liberación de materiales encapsulados (por ejemplo, polinucleótidos) intracelularmente.

40 En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en la presente (y las composiciones farmacéuticas y liposomales que comprenden tales compuestos) emplean una estrategia multifuncional para facilitar la administración de materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos) a, y la posterior transfección de, una o más células objetivo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos descritos en la presente (y las composiciones farmacéuticas y liposomales que comprenden tales compuestos) se caracterizan por tener una o más de endocitosis mediada por receptor, endocitosis, fagocitosis y macropinocitosis, mediada por clatrina y mediada por caveolae, fusogenicidad, disrupción endosomal o lisosómica y/o propiedades liberables que proporcionan tales ventajas de compuestos con respecto a otros lípidos clasificados de manera similar.

45 En ciertas realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposomales de las cuales son un componente tales compuestos (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) muestran una capacidad mejorada (por ejemplo, aumentada) para transfectar una o más células objetivo. Por consiguiente, también se proporcionan en la presente métodos para transfectar una o más células objetivo. Tales métodos generalmente comprenden el paso de

poner en contacto la una o más células objetivo con los compuestos y/o composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente (por ejemplo, una nanopartícula lipídica a base de HGT5000-, HGT5001- y/o HGT5002 que encapsula uno o más polinucleótidos) de tal manera que la una o más células objetivo se transfectan con los materiales encapsulados en las mismas (por ejemplo, uno o más polinucleótidos). Como se usan en la presente, los términos "transfectar" o "transfección" se refieren a la introducción intracelular de uno o más materiales encapsulados (por ejemplo, ácidos nucleicos y/o polinucleótidos) en una célula, o preferiblemente en una célula objetivo. El polinucleótido introducido puede mantenerse estable o transitoriamente en la célula objetivo. El término "eficiencia de transfección" se refiere a la cantidad relativa de dicho material encapsulado (por ejemplo, polinucleótidos) absorbido, introducido y/o expresado por la célula objetivo que se somete a transfección. En la práctica, la eficiencia de la transfección puede estimarse por la cantidad de un producto de polinucleótidos informador producido por las células objetivo después de la transfección. En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente demuestran altas eficiencias de transfección mejorando de este modo la probabilidad de que se administren dosificaciones apropiadas de los materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos) al sitio de la patología y de que se expresen posteriormente, mientras que al mismo tiempo minimizan efectos adversos sistémicos potenciales o toxicidad asociados con el compuesto o sus contenido encapsulados.

Se puede administrar una amplia gama de materiales que pueden ejercer efectos farmacéuticos o terapéuticos a las células objetivo usando los compuestos y composiciones de la presente invención. Por consiguiente, los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente pueden usarse para encapsular cualquier material adecuado para la administración intracelular. En ciertas realizaciones, tales materiales encapsulados son capaces de conferir un beneficio terapéutico o diagnóstico a las células en las que se administran tales materiales, y pueden incluir cualquier fármaco, productos biológicos y/o de diagnóstico. Los materiales pueden ser orgánicos o inorgánicos. Las moléculas orgánicas pueden ser péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, esteroides, ácidos nucleicos (incluidos los ácidos nucleicos peptídicos) o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente pueden comprender o encapsular de otro modo más de un tipo de material, por ejemplo, dos o más secuencias de polinucleótidos diferentes que codifican una proteína, una enzima y/o un esteroide. En ciertas realizaciones, los materiales encapsulados son uno o más polinucleótidos y ácidos nucleicos.

Como se usa en la presente, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan de manera intercambiable para referirse a material genético (por ejemplo, ADN o ARN), y cuando tales términos se usan con respecto a los compuestos y composiciones descritos en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) se refieren generalmente al material genético encapsulado por tales compuestos y composiciones (por ejemplo, nanopartículas lipídicas). En algunas realizaciones, el polinucleótido es ARN. El ARN adecuado incluye ARNm, ARNip, ARNmi, ARNnp y ARNsno. Los polinucleótidos contemplados también incluyen un ARN no codificante intergénico grande (ARNlinc), que generalmente no codifica proteínas, sino que funciona, por ejemplo, en la señalización inmune, la biología de las células madre y el desarrollo de enfermedades. (Ver, por ejemplo, Guttman, et al., 458: 223-227 (2009); y Ng, et al., Nature Genetics 42: 1035-1036 (2010)). En ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales de la invención incluyen ARN o ARN estabilizado que codifica una proteína o enzima (por ejemplo, ARNm que codifica α -galactosidasa A o arilsulfatasa A). La presente invención contempla el uso de tales polinucleótidos (y en particular ARN o ARN estabilizado) como un agente terapéutico que puede ser expresado por las células objetivo para facilitar de ese modo la producción (y en ciertos casos la excreción) de una enzima o proteína funcional por tales células objetivo como se divulgan, por ejemplo, en la Solicitud Internacional N° PCT/US2010/058457 y en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 61/494.881 (N° de Expediente de Representante SHIR-025-001), presentada el 8 de junio de 2011. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, tras la expresión de uno o más polinucleótidos por las células objetivo, la producción de una enzima o proteína funcional en la que un sujeto es deficiente (por ejemplo, se puede observar una enzima del ciclo de la urea o una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosómico). El término "funcional", como se usa en la presente para calificar una proteína o enzima, significa que la proteína o enzima tiene actividad biológica, o alternativamente es capaz de realizar la misma función o una función similar a la proteína o enzima nativa o que funciona normalmente.

En ciertas realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente se formulan como una formulación o composición mezclada. Por ejemplo, en una realización, una composición farmacéutica comprende una formulación combinada que comprende una proporción de 3:1 de una primera nanopartícula lipídica que comprende HGT5000 y una segunda nanopartícula lipídica que comprende HGT5001. Por consiguiente, también se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas mezcladas y métodos relacionados para modular la expresión de un polinucleótido en una o más células y tejidos objetivo, como se divulga, por ejemplo, en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/494.714 (N° de Expediente de Representante SHIR-021-001), presentada el 8 de junio de 2011. También se contemplan métodos para modular (por ejemplo, aumentar o aumentar sinérgicamente) la producción y/o secreción de, por ejemplo, uno o más polipéptidos, proteínas o enzimas funcionales que están codificadas por uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) encapsulados en tales composiciones farmacéuticas mezcladas por una o más células objetivo.

En el contexto de la presente invención, el término "expresión" se usa en su sentido más amplio para referirse o a la transcripción de un gen o polinucleótido específico en por lo menos un transcrito de ARNm, o la traducción de por lo menos un ARNm o polinucleótido a una proteína o enzima. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas o liposomales descritas en la presente comprenden un polinucleótido (por ejemplo, ARNm) que codifica una proteína o enzima funcional. En el contexto de tales polinucleótidos de ARNm, el término expresión se refiere a la traducción de dicho ARNm (por ejemplo, por las células objetivo) para producir el polipéptido o la proteína codificada por el mismo.

En ciertas realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas proporcionados en la presente son capaces de modular la expresión de ácidos nucleicos y polinucleótidos expresados aberrantemente en una o más células y tejidos objetivo. Por consiguiente, también se proporcionan en la presente métodos para tratar una enfermedad en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas o liposomales descritas en la presente al sujeto. En ciertas realizaciones, tales métodos pueden mejorar (por ejemplo, aumentar) la expresión de un polinucleótido y/o aumentar la producción y secreción de un producto de polipéptido funcional en una o más células y tejidos objetivo (por ejemplo, hepatocitos). En algunas realizaciones, las células o tejidos objetivo expresan aberrantemente el polinucleótido encapsulado por el uno o más de los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) descritas en la presente. También se proporcionan en la presente métodos para aumentar la expresión de uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) en una o más células, tejidos y órganos objetivo (por ejemplo, pulmones, corazón, bazo, hígado y/o riñones). Generalmente, tales métodos comprenden poner en contacto las células objetivo con uno o más compuestos y/o composiciones farmacéuticas o liposomales que comprenden o encapsulan de otra manera uno o más polinucleótidos.

En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en la presente pueden usarse como un liposoma o como un componente de un liposoma. Específicamente, en ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en la presente pueden usarse como un componente lipídico (por ejemplo, lípido catiónico) de una composición liposomal (por ejemplo, una nanopartícula lipídica). Tales liposomas pueden usarse para encapsular materiales y facilitar la administración de tales materiales a una o más células, tejidos y órganos objetivo. Como se usa en la presente, el término "liposoma" se refiere generalmente a una vesícula compuesta de lípidos (por ejemplo, lípidos anfifílicos) dispuestos en una o más bicapas esféricas. En ciertas realizaciones, el liposoma es una nanopartícula lipídica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica que comprende uno o más de los compuestos lipídicos catiónicos divulgados en la presente). Tales liposomas pueden ser vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada de un material lipofílico y un interior acuoso que contiene los materiales encapsulados (por ejemplo, polinucleótidos) para ser administrados a una o más células, tejidos y órganos objetivo. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente comprenden una o más nanopartículas lipídicas. Los liposomas contemplados incluyen nanopartículas lipídicas. Los ejemplos de lípidos adecuados (por ejemplo, lípidos catiónicos) que pueden usarse para formar los liposomas y las nanopartículas lipídicas contempladas por la presente incluyen uno o más de los compuestos divulgados en la presente (por ejemplo, HGT5000, HGT5001 y/o HGT5002). Tales liposomas y nanopartículas lipídicas también pueden comprender lípidos catiónicos adicionales como C12-200, DLin-KC2-DMA, DOPE, DMG-PEG-2000, lípidos no catiónicos, lípidos a base de colesterol, lípidos auxiliares, lípidos modificados con PEG, así como los compuestos de fosfatidilo (por ejemplo, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos) y combinaciones de los mismos.

Se han descrito varios lípidos catiónicos en la bibliografía, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. En ciertas realizaciones, tales lípidos catiónicos se incluyen en las composiciones farmacéuticas o liposomales descritas en la presente además de uno o más de los compuestos o lípidos divulgados en la presente (por ejemplo, HGT5000). En algunas realizaciones, se usa el lípido catiónico cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio o "DOTMA". (Felgner et al. (Proc. Nat'l Acad. Sci. 84, 7413 (1987); Patente de Estados Unidos Nº 4.897.355). El DOTMA puede formularse solo o puede combinarse con dioleoilfosfatidiletanolamina o "DOPE" u otros lípidos catiónicos o no catiónicos en una nanopartícula lipídica. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, C12-200, 5-carboxiespermidilgliciniocetadecilamida o "DOGS", 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio o "DOSPA" (Behr et al. Proc. Nat. II Acad. Sci. 86, 6982 (1989); Patente de Estados Unidos Nº 5.171.678; Patente de Estados Unidos Nº 5.334.761), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano o "DODAP", 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano o "DOTAP". Los lípidos catiónicos contemplados también incluyen 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DSDMA", 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DODMA", 1,2-dilinoileloxi -N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLinDMA", cloruro de N-dioleil-N,N-dimetilamonio o "DODAC", Bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio o "DDAB", bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio o "DMRIE", 3-dimetilamino-2-(cholest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano o "CLinDMA", 2-[5'-(cholest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil 1-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxi)propano o "CpLinDMA", N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina o "DMOBA", 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DOcarbDAP", 2,3-dilinoileiloxi-N,N-dimetilpropilamina o "DLinDAP", 1,2-N,N'-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLincarbDAP", 1,2-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano o "DLinCDAP", 2,2-dilinoileol-4-dimetolaminometil-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-DMA", 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano o "DLin-K-XTC2-DMA", o mezclas de los mismos. (Heyes, J.,

et al., J Controlled Release 107: 276-287 (2005); Morrissey, DV., et al., Nat. Biotechnology 23(8): 1003-1007 (2005); Publicación de PCT WO2005/121348A1). La presente invención también contempla el uso de lípidos catiónicos a base de colesterol para formular las composiciones (por ejemplo, nanopartículas lipídicas). Tales lípidos catiónicos a base de colesterol pueden usarse, solos o en combinación con otros lípidos catiónicos o no catiónicos. Los lípidos catiónicos a base de colesterol adecuados incluyen, por ejemplo, DC-Chol (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis(3-N-oleilamino-propil)piperazina (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al., BioTechniques 23, 139 (1997); Patente de Estados Unidos N° 5.744.335)

Además, varios reactivos están disponibles comercialmente para mejorar la eficacia de la transfección. Los ejemplos adecuados incluyen LIPOFECTINA (DOTMA:DOPE) (Invitrogen, Carlsbad, California), LIPOFECTAMINA (DOSPA: DOPE) (Invitrogen), LIPOFECTAMINA2000. (Invitrogen), FUGENE, TRANSFECTAM (DOGS) y EFFECTENE. También se contemplan lípidos catiónicos como los lípidos a base de dialquilamino, a base de imidazol y a base de guanidinio. Por ejemplo, también se contempla el uso del lípido catiónico (3S, 10R, 13R, 17R)-10, 13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il 3-(1H-imidazol-4-il)propanoato o "ICE", como se divulga en la Solicitud Internacional N° PCT/US2010/058457.

También se contempla el uso e inclusión de fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG) y lípidos derivados como ceramidas derivadas (PEG-CER), incluyendo N-octanoil-esfingosina-1-[succinil(Metoxi Polietilenglicol)-2000](C8 PEG-2000 ceramida) en las composiciones liposomales y farmacéuticas descritas en la presente, preferiblemente en combinación con uno o más de los compuestos y lípidos divulgados en la presente. Los lípidos modificados con PEG contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unido covalentemente a un lípido con cadenas de alquilo de C₆-C₂₀ de longitud. La adición de tales componentes puede prevenir la agregación compleja y también puede proporcionar un medio para aumentar la vida útil de la circulación y aumentar la administración de la composición de lípido-polinucleótido a los tejidos objetivo (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), o pueden seleccionarse para intercambiar rápidamente la formulación *in vivo* (ver Patente de Estados Unidos N° 5.885.613). Los lípidos intercambiables particularmente útiles son las PEG-ceramidas que tienen cadenas de acilo más cortas (por ejemplo, C14 o C18). El fosfolípido modificado con PEG y los lípidos derivados de la presente invención pueden comprender una relación molar de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 20%, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 15%, de aproximadamente el 4% a aproximadamente el 10%, o de aproximadamente el 2% del lípido total presente en una nanopartícula de lípidos liposomal.

La presente invención también contempla el uso de lípidos no catiónicos en una o más de las composiciones farmacéuticas o liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas). Tales lípidos no catiónicos se usan preferiblemente en combinación con uno o más de los compuestos y lípidos divulgados en la presente. Como se usa en la presente, la frase "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido neutro, zwitteriónico o aniónico. Como se usa en la presente, la frase "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que llevan una carga negativa neta a un pH seleccionado, como el pH fisiológico. Los lípidos no catiónicos incluyen, pero no están limitados a, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), dioleoil-fosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfenoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), DLPE (1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DPPS (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), ceramidas, esfingomielinas, colesterol o una mezcla de los mismos. Tales lípidos no catiónicos pueden usarse solos, pero se usan preferiblemente en combinación con otros excipientes, por ejemplo, uno o más de los compuestos de lípidos catiónicos divulgados en la presente (por ejemplo, HGT5000, HGT5001 y/o HGT5002). Cuando se usa en combinación con un lípido catiónico, el lípido no catiónico puede comprender una relación molar del 5% a aproximadamente el 90%, o preferiblemente de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 70% del lípido total presente en la nanopartícula lipídica.

También se contempla la inclusión de polímeros en las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas o liposomales descritas en la presente. Los polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliácridatos, polialquiliacrilatos, polilactida, copolímeros de polilactida-poliglicólido, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas y polietilimina. Tales polímeros pueden usarse solos, pero preferiblemente se usan en combinación con otros excipientes, por ejemplo, uno o más de los compuestos de lípidos catiónicos divulgados en la presente (por ejemplo, HGT5000, HGT5001 y/o HGT5002).

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) se formulan basándose en parte en su capacidad para facilitar la transfección (por ejemplo, de un polinucleótido) de una célula objetivo. En otra realización, las composiciones farmacéuticas y liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) pueden seleccionarse y/o prepararse para optimizar la administración de polinucleótidos a una célula, tejido u órgano objetivo. Por ejemplo, si la célula objetivo es un hepatocito, las propiedades de las composiciones farmacéuticas y/o liposomales (por ejemplo, tamaño, carga y/o pH) pueden

optimizarse para administrar eficazmente dicha composición (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) a la célula u órgano objetivo, reducir la depuración inmune y/o promover la retención en ese órgano objetivo. Alternativamente, si el tejido objetivo es el sistema nervioso central, la selección y preparación de las composiciones farmacéuticas y liposomales debe considerar la penetración de, y la retención dentro de la barrera hematoencefálica y/o el uso de medios alternativos para administrar directamente tales composiciones (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) a dicho tejido objetivo (por ejemplo, a través de administración intracerebrovascular). En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas o liposomales o sus nanopartículas lipídicas constituyentes pueden combinarse con agentes que facilitan la transferencia de materiales encapsulados (por ejemplo, agentes que alteran o mejoran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y mejoran de este modo la transferencia de dichos polinucleótidos encapsulados a las células objetivo). Mientras que las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) pueden facilitar la introducción de materiales encapsulados como uno o más polinucleótidos en las células objetivo, la adición de policationes (por ejemplo, L-lisina y protamina) a, por ejemplo, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas como un copolímero también pueden facilitar, y en algunos casos mejorar marcadamente la eficiencia de transfección de varios tipos de liposomas catiónicos en 2-28 veces en una serie de líneas celulares tanto *in vitro* como *in vivo*. (Ver, N.J. Caplen, et al., Gene Ther. 1995; 2: 603; S. Li, et al., Gene Ther. 1997; 4, 891.)

En ciertas realizaciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas y liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) se preparan para encapsular uno o más materiales o agentes terapéuticos (por ejemplo, polinucleótidos). El proceso de incorporación de un agente terapéutico deseado (por ejemplo, ARNm) en un liposoma o una nanopartícula lipídica es referido en la presente como "carga" o "encapsulación" (Lasic, et al., FEBS Lett., 312: 255-258, 1992). Los materiales cargados o encapsulados en nanopartículas lipídicas (por ejemplo, Polinucleótidos) pueden estar total o parcialmente localizados en el espacio interior de la nanopartícula lipídica, dentro de la membrana bicapa de la nanopartícula lipídica, o asociados con la superficie exterior de la nanopartícula lipídica.

Cargar o encapsular, por ejemplo, un polinucleótido en una nanopartícula lipídica puede servir para proteger el polinucleótido de un entorno que puede contener enzimas o productos químicos (por ejemplo, suero) que degradan tales polinucleótidos y/o sistemas o receptores que provocan la excreción rápida de tales polinucleótidos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente son capaces de mejorar la estabilidad del polinucleótido(s) encapsulado de este modo, particularmente con respecto a los entornos en los que estarán expuestos tales polinucleótidos. Los materiales encapsulantes, como por ejemplo polinucleótidos en una o más de las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) también facilitan la administración de tales polinucleótidos a las células y tejidos objetivo. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden uno o más de los compuestos lipídicos descritos en la presente pueden permitir que el polinucleótido encapsulado alcance la célula objetivo o puede permitir preferentemente que el polinucleótido encapsulado llegue a las células u órganos objetivo en una forma discriminatoria (por ejemplo, las nanopartículas lipídicas pueden concentrarse en el hígado o bazo de un sujeto al que se administran tales nanopartículas lipídicas). Alternativamente, las nanopartículas lipídicas pueden limitar la administración de polinucleótidos encapsulados a otras células u órganos no objetivo donde la presencia de los polinucleótidos encapsulados puede ser indeseable o de utilidad limitada.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) se preparan combinando múltiples componentes lipídicos (por ejemplo, uno o más de los compuestos divulgados en la presente) con uno o más componentes poliméricos. Por ejemplo, una nanopartícula lipídica puede prepararse usando HGT5000, DOPE, CHOL y DMG-PEG2000. Una nanopartícula lipídica puede estar compuesta de combinaciones de lípidos adicionales a varias proporciones incluyendo, por ejemplo, HGT5001, DOPE y DMG-PEG2000. La selección de lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos y/o lípidos modificados con PEG que comprenden las nanopartículas lipídicas, así como la relación molar relativa de dichos lípidos entre sí, se basa en las características de los lípidos seleccionados. La naturaleza de las células o tejidos objetivo pretendidos y las características de los materiales o polinucleótidos a ser administrados por la nanopartícula lipídica. Consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena alquílica, así como el tamaño, carga, pH, pKa, fusogénesis y toxicidad de los lípidos seleccionados.

La composición farmacéutica y liposomal (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) para su uso en la presente invención puede prepararse mediante varias técnicas que se conocen actualmente en la técnica. Las vesículas multilamelares (MLV) pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, depositando un lípido seleccionado en la pared interior de un recipiente o envase adecuado disolviendo el lípido en un solvente apropiado y luego evaporando el solvente para dejar una película delgada en el interior del recipiente o por secado por pulverización. Luego se puede añadir una fase acuosa al recipiente con un movimiento de vórtice que da como resultado la formación de MLV. Las vesículas unilamelares (ULV) pueden formarse por homogeneización, sonicación o extrusión de las vesículas multilamelares. Además, las vesículas unilamelares pueden formarse mediante técnicas de eliminación de detergentes.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposomales de la presente invención

comprenden una nanopartícula lipídica en la que el polinucleótido encapsulado (por ejemplo, ARNm) está asociado tanto en la superficie de la nanopartícula lipídica como encapsulado dentro de la misma nanopartícula lipídica. Por ejemplo, durante la preparación de las composiciones de la presente invención, uno o más de los compuestos lipídicos catiónicos descritos en la presente y que comprenden las nanopartículas lipídicas pueden asociarse con los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) a través de interacciones electrostáticas con dichos polinucleótidos.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposomales de la presente invención pueden cargarse con radionúclidos de diagnóstico, materiales fluorescentes u otros materiales que son detectables tanto en aplicaciones *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los materiales de diagnóstico adecuados para su uso en la presente invención pueden incluir Rodamina-dioleoilfosfatidiletanolamina (Rh-PE), ARNm de proteína fluorescente verde, ARNm de luciferasa de *Renilla* y ARNm de luciferasa de luciérnaga.

Durante la preparación de las composiciones liposomales descritas en la presente, los agentes portadores solubles en agua también pueden encapsularse en el interior acuoso incluyéndolos en la solución hidratante, y pueden incorporarse moléculas lipofílicas en la bicapa lipídica mediante inclusión en la formulación lipídica. En el caso de ciertas moléculas (por ejemplo, polinucleótidos lipófilos catiónicos o aniónicos), la carga del polinucleótido en nanopartículas lipídicas o liposomas preformados puede realizarse, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.946.683. Después de la encapsulación del polinucleótido, las nanopartículas lipídicas pueden procesarse para eliminar el ARNm no encapsulado a través de procesos como cromatografía en gel, diafiltración o ultrafiltración. Por ejemplo, si es deseable eliminar el polinucleótido unido externamente de la superficie de las composiciones liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) descritas en la presente, tales nanopartículas lipídicas pueden someterse a una columna de dietilaminoetil SEPHACEL.

Además de los materiales encapsulados (por ejemplo, polinucleótidos o uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico) pueden incluirse o encapsularse en la nanopartícula lipídica. Por ejemplo, tales agentes terapéuticos adicionales pueden estar asociados con la superficie de la nanopartícula lipídica, pueden incorporarse en la bicapa lipídica de la nanopartícula lipídica mediante la inclusión en la formulación lipídica o la carga en nanopartículas lipídicas preformadas (Ver, Patente de Estados Unidos N° 5.194.654 y 5.223.263).

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

Están disponibles una variedad de métodos alternativos conocidos en la técnica para dimensionar una población de nanopartículas lipídicas. Uno de estos métodos de dimensionamiento se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.737.323. La sonicación de una suspensión liposomas o de nanopartículas lipídicas, ya sea por baño o sonicación con sonda, produce una reducción progresiva del tamaño hasta ULV pequeño de menos de aproximadamente 0,05 micras de diámetro. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de cizallamiento para fragmentar los liposomas grandes en unos más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, los MLV se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micras. El tamaño de las nanopartículas lipídicas puede determinarse por dispersión de luz cuasi-eléctrica (QELS) como se describe en Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10: 421-450 (1981). El diámetro medio de las nanopartículas lipídicas puede reducirse mediante sonicación de las nanopartículas lipídicas formadas. Los ciclos de sonicación intermitente pueden alternarse con la evaluación QELS para guiar la síntesis de liposomas eficiente.

La selección del tamaño apropiado de las composiciones liposomales descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) debe tener en consideración el sitio de la célula o tejido objetivo y, en cierta medida, la aplicación para la que se está elaborando la nanopartícula lipídica. Como se usa en la presente, la frase "célula objetivo" se refiere a células a las que están dirigidas o son objetivo de una o más de las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente. En algunas realizaciones, las células objetivo comprenden un tejido u órgano particular. En algunas realizaciones, las células objetivo son deficientes en una proteína o enzima de interés. Por ejemplo, cuando se desea administrar un polinucleótido a un hepatocito, el hepatocito representa la célula objetivo. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas o liposomales (y, por ejemplo, los materiales de polinucleótidos encapsulados en las mismas) de la presente invención transfectan las células objetivo de forma discriminatoria (es decir, no transfectan células no objetivo). Las composiciones de la presente invención pueden prepararse para dirigirse preferentemente a una variedad de células objetivo que incluyen, pero no están limitadas a, hepatocitos, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células pulmonares,

células alveolares, células óseas, células madre, células mesenquimales, células neuronales (por ejemplo, meninges, astrocitos, neuronas motoras, células de los ganglios de la raíz dorsal y neuronas motoras del asta anterior), células fotorreceptoras (por ejemplo, bastones y conos), células epiteliales pigmentadas retinales, células secretoras, células cardíacas, adipocitos, células del músculo liso vascular, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, células beta, células pituitarias, células del revestimiento sinovial, células ováricas, células testiculares, fibroblastos, células B, células T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos y células tumorales.

Después de la transfección de una o más células objetivo por, por ejemplo, los polinucleótidos encapsulados en la una o más nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas o liposomales divulgadas en la presente, la producción del producto (por ejemplo, un polipéptido o proteína) codificado por dicho polinucleótido puede estimularse preferiblemente y mejorarse la capacidad de tales células objetivo para expresar el polinucleótido y producir, por ejemplo, un polipéptido o proteína de interés. Por ejemplo, la transfección de una célula objetivo por uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas que encapsulan ARNm mejorará (es decir, aumentará) la producción de la proteína o enzima codificada por dicho ARNm.

En algunas realizaciones, puede ser deseable limitar la transfección de los polinucleótidos a ciertas células o tejidos. Por ejemplo, el hígado representa un órgano objetivo importante para las composiciones de la presente invención, en parte debido a su papel central en el metabolismo y la producción de proteínas y, por consiguiente, las enfermedades que son provocadas por defectos en productos génicos específicos del hígado (por ejemplo, trastornos del ciclo de la urea) pueden beneficiarse del direccionamiento específico de las células (por ejemplo, hepatocitos). Por consiguiente, en ciertas realizaciones de la presente invención, las características estructurales del tejido objetivo pueden explotarse para dirigir la distribución de las composiciones farmacéuticas y liposomales de la presente invención (por ejemplo, una nanopartícula lipídica a base de HGT5001) a dichos tejidos objetivo. Por ejemplo, para dirigir a hepatocitos una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas o liposomales descritas en la presente pueden dimensionarse de tal manera que sus dimensiones sean más pequeñas que las fenestraciones del revestimiento de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos en el hígado; por consiguiente la una o más de tales nanopartículas lipídicas pueden penetrar fácilmente tales fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos objetivo. Alternativamente, una nanopartícula lipídica puede dimensionarse de tal manera que las dimensiones del liposoma sean de un diámetro suficiente para limitar o evitar expresamente la distribución en ciertas células o tejidos. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente pueden dimensionarse de tal manera que sus dimensiones sean mayores que las fenestraciones de la capa endotelial que recubren los sinusoides hepáticos para limitar de este modo la distribución de la nanopartícula lipídica liposomal a los hepatocitos. En dicha realización, las composiciones liposomales (por ejemplo, las nanopartículas lipídicas) grandes no penetrarán fácilmente en las fenestraciones endoteliales y, en cambio, serían depuradas por las células Kupffer de macrófagos que recubren los sinusoides hepáticos. El dimensionamiento de, por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica puede proporcionar por lo tanto una oportunidad para manipular aún más y controlar con mayor precisión el grado en que la expresión de los polinucleótidos encapsulados puede mejorarse en una o más células objetivo. Generalmente, el tamaño de por lo menos una de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas y liposomales de la presente invención está dentro del intervalo de aproximadamente 25 a 250 nm, preferiblemente menos de aproximadamente 250 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o 10 nm.

De manera similar, las composiciones de la presente invención pueden prepararse para distribuirse preferencialmente a otros tejidos, células u órganos objetivo como el corazón, pulmones, riñones, bazo. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas de la presente invención pueden prepararse para lograr un administración mejorada a las células y tejidos objetivo. Por consiguiente, las composiciones de la presente invención pueden enriquecerse con lípidos catiónicos, no catiónicos y modificados con PEG adicionales para tejidos o células objetivo adicionales.

En algunas realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas a base de HGT5002) se distribuyen a las células y tejidos del hígado para mejorar la administración, la transfección y la posterior expresión de los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) encapsulado en los mismos por las células y tejidos del hígado (por ejemplo, hepatocitos) y la producción correspondiente del polipéptido o proteína codificada por dicho polinucleótido. Aunque tales composiciones pueden distribuirse preferencialmente en las células y tejidos del hígado, los efectos terapéuticos de los polinucleótidos expresados y la posterior producción de una proteína codificada de este modo no necesitan limitarse a las células y tejidos objetivo. Por ejemplo, las células objetivo (por ejemplo, hepatocitos) pueden funcionar como un "reservorio" o "depósito" capaz de expresar o producir, y excretar sistémica o periféricamente una proteína o enzima funcional, como se divulga, por ejemplo, en la Solicitud Internacional N° PCT/US2010/058457 (Docket del Abogado No. SHIR-004-WO1) y en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/494.881 (N° de Expediente de Representante SHIR-025-001). Por consiguiente, en ciertas realizaciones de la presente invención, la una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas a base de HGT5000) pueden dirigirse a los hepatocitos y/o distribuirse preferencialmente a las células y tejidos del hígado tras la administración. Después de la transfección de los hepatocitos objetivo por el polinucleótido encapsulado en una o más de tales nanopartículas lipídicas, tales

polinucleótidos se expresan (por ejemplo, traducen) y se excreta y distribuye sistémicamente un producto funcional (por ejemplo, un polipéptido o proteína), donde tal funcionalidad del producto puede ejercer un efecto terapéutico deseado.

5 Los polinucleótidos encapsulados en uno o más de los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente pueden administrarse y/o transfectar células o tejidos objetivo. En algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados son capaces de ser expresados y los productos de polipéptidos funcionales producidos (y en algunos casos excretados) por la célula objetivo, confiriendo de este modo una propiedad beneficiosa a, por ejemplo, las células o tejidos objetivo. Tales polinucleótidos encapsulados pueden
10 codificar, por ejemplo, una hormona, enzima, receptor, polipéptido, péptido u otra proteína de interés. En ciertas realizaciones, tales polinucleótidos encapsulados también pueden codificar un pequeño ARN interferente pequeño (ARNip) o ARN antisentido con el propósito de modular o disminuir o eliminar de otra manera la expresión de un ácido nucleico o gen endógeno. En ciertas realizaciones tales polinucleótidos encapsulados pueden ser de naturaleza natural o recombinante y pueden ejercer su actividad terapéutica usando mecanismos de sentido o
15 antisentido de acción (por ejemplo, modulando la expresión de un gen o ácido nucleico objetivo).

La presente invención también contempla la administración conjunta de uno o más polinucleótidos únicos a las células objetivo por los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente, por ejemplo, combinando dos agentes terapéuticos o polinucleótidos únicos en una sola nanopartícula lipídica. También se contempla la administración de uno o más polinucleótidos encapsulados a una o más células objetivo para tratar un único trastorno o deficiencia, en donde cada uno de dichos polinucleótidos funciona mediante un mecanismo de acción diferente. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas o liposomales de la presente invención pueden comprender un primer polinucleótido que, por ejemplo, está encapsulado en una nanopartícula lipídica y está destinado a corregir una deficiencia de proteínas o enzimas endógena, y un segundo polinucleótido destinado a desactivar o "derribar" un polinucleótido endógeno defectuoso y su producto proteico o enzimático. Tales polinucleótidos encapsulados pueden codificar, por ejemplo, ARNm y ARNip.

Aunque los polinucleótidos transcritos *in vitro* (por ejemplo, ARNm) pueden transfectarse en células objetivo, tales polinucleótidos pueden degradarse fácil y eficientemente por la célula *in vivo*, haciendo que dichos polinucleótidos sean ineficaces. Además, algunos polinucleótidos son inestables en los fluidos corporales (particularmente el suero humano) y pueden degradarse o digerirse incluso antes de alcanzar una célula objetivo. Además, dentro de una célula, un ARNm natural puede descomponerse con una vida media de entre 30 minutos y varios días. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados proporcionados en la presente, y en particular los polinucleótidos de ARNm proporcionados en la presente, retienen preferiblemente por lo
35 menos alguna capacidad de expresarse o traducirse, para producir de este modo una proteína o enzima funcional dentro de una o más células objetivo.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposomales comprenden uno o más de los compuestos lipídicos divulgados en la presente y una o más nanopartículas lipídicas que incluyen o encapsulan uno o más polinucleótidos estabilizados (por ejemplo, ARNm que se ha estabilizado contra la digestión o degradación de nucleasas *in vivo*) que modulan la expresión de un gen o que pueden expresarse o traducirse para producir un polipéptido o proteína funcional dentro de una o más células objetivo. En ciertas realizaciones, la actividad de tales polinucleótidos encapsulados (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína o enzima funcional) se prolonga durante un período prolongado de tiempo. Por ejemplo, la actividad de los polinucleótidos puede prolongarse de tal manera que las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a un sujeto de forma semanal o bimensual, o más preferiblemente de forma mensual, bimensual, trimestral o anual. La actividad extendida o prolongada de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, y en particular del ARNm encapsulado, está directamente relacionada con la cantidad de proteína funcional o enzima traducida de dicho ARNm. De manera similar, la actividad de las composiciones de la presente invención puede extenderse o prolongarse adicionalmente mediante modificaciones químicas realizadas para mejorar o potenciar aún más la traducción de los polinucleótidos de ARNm. Por ejemplo, la secuencia de consenso de Kozac desempeña un papel en el inicio de la traducción de proteínas, y la inclusión de dicha secuencia de consenso de Kozac en los polinucleótidos de ARNm encapsulados puede extender o prolongar aún más la actividad de los polinucleótidos de ARNm. Además, la cantidad de proteína funcional o enzima producida por la célula objetivo es una función de la cantidad de polinucleótido (por ejemplo, ARNm) administrado a las células objetivo y la estabilidad de dicho polinucleótido. En la medida en que la estabilidad de los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o composiciones de la presente invención puede mejorarse o potenciarse, puede extenderse adicionalmente la vida media, la actividad de la proteína o enzima traducida y la frecuencia de dosificación de la composición

En ciertas realizaciones, los polinucleótidos pueden modificarse químicamente, por ejemplo, para conferir estabilidad (por ejemplo, estabilidad con respecto a la versión de tipo salvaje o de origen natural del ARNm y/o la versión del ARNm natural endógena a las células objetivo). Por consiguiente, en algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados proporcionados en la presente comprenden por lo menos una modificación química que confiere una estabilidad aumentada o mejorada al polinucleótido incluyendo, por ejemplo, una resistencia mejorada a la digestión de nucleasas *in vivo*. Los términos "estable" y "estabilidad" en la medida que tales términos

se refieren a los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales de la presente invención, y particularmente con respecto al ARNm, se refieren a resistencia aumentada o mejorada a la degradación por, por ejemplo nucleasas (es decir, endonucleasas o exonucleasas) que normalmente son capaces de degradar dicho ARN. La estabilidad aumentada puede incluir, por ejemplo, menos sensibilidad a la hidrólisis u otra destrucción por enzimas endógenas (por ejemplo, endonucleasas o exonucleasas) o condiciones dentro de la célula o tejido objetivo, aumentando o mejorando de este modo la residencia de dichos polinucleótidos en la célula, tejido, sujeto y/o citoplasma objetivo. Las moléculas de polinucleótidos estabilizadas proporcionadas en la presente demuestran vidas medias más largas con respecto a sus contrapartidas no modificadas de origen natural (por ejemplo, la versión de tipo salvaje del polinucleótido).

En ciertas realizaciones, un polinucleótido puede modificarse mediante la incorporación de secuencias no traducidas (UTR) 3' y/o 5' que no se encuentran de manera natural en el polinucleótido de tipo salvaje. También se contemplan por las frases "modificación química" y "modificado químicamente" en la medida que tales términos se refieren a los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales de la presente invención son las alteraciones que mejoran o potencian la traducción de polinucleótidos de ARNm, incluyendo, por ejemplo, la inclusión de secuencias que funcionan en el inicio de la traducción de proteínas (por ejemplo, la secuencia de consenso de Kozac). (Kozak, M., *Nucleic Acids Res* 15 (20):8125-48 (1987)). Las modificaciones químicas también incluyen modificaciones que introducen químicas que difieren de las observadas en polinucleótidos de origen natural, por ejemplo, modificaciones covalentes como la introducción de nucleótidos modificados (por ejemplo, análogos de nucleótidos o la inclusión de grupos colgantes que no se encuentran de manera natural en tales moléculas de polinucleótidos). En algunas realizaciones, los polinucleótidos se han sometido a una modificación química o biológica para hacerlos más estables antes de la encapsulación en una o más nanopartículas lipídicas. En ciertas realizaciones, las modificaciones químicas ejemplares que pueden introducirse en el polinucleótido incluyen pseudouridina, 2-tiouracilo, 5-metilcitidina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina citosina. Las modificaciones químicas ejemplares de un polinucleótido incluyen el agotamiento de una base (por ejemplo, por delección o por la sustitución de un nucleótido por otro) o la modificación química de una base.

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

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

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

Se cree que la cola de poli A estabiliza los mensajeros naturales y el ARN de sentido sintético. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, se puede añadir una cola de poli A larga a una molécula de ARNm, haciendo por tanto que

5 el ARN sea más estable. Las colas de poli A pueden añadirse usando una variedad de técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden añadirse colas de poli A largas al ARN transcrito sintético o *in vitro* usando la polimerasa de poli A (Yokoe, et al. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1252-1256). Un vector de transcripción también puede codificar colas de poli A largas. Además, se pueden añadir colas de poli A por transcripción directamente de
10 productos de PCR. El poli A también puede ligarse al extremo 3' de un ARN de sentido con ARN ligasa (ver, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: edición de 1991)). En ciertas realizaciones, la longitud de la cola de poli A es por lo menos de aproximadamente 90, 200, 300, 400 o por lo menos 500 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la longitud de la cola de poli A se ajusta para controlar la estabilidad de una molécula de ARNm de sentido modificada de la invención y, por lo tanto, la transcripción de proteína. Por ejemplo, como la longitud de la cola de poli A puede influir en la vida media de una molécula de ARNm de detección, la longitud de la cola de poli A puede ajustarse para modificar el nivel de resistencia del ARNm a las nucleasas y controlar de este modo el curso temporal de la expresión de polinucleótidos y la producción de proteínas en una célula objetivo. En ciertas realizaciones, las moléculas de polinucleótidos estabilizadas son suficientemente resistentes a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por
15 nucleasas), de tal manera que pueden administrarse a la célula objetivo sin una nanopartícula lipídica.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados (por ejemplo, ARNm que codifica una proteína deficiente) pueden incluir opcionalmente modificaciones químicas o biológicas que, por ejemplo, mejoran la estabilidad y/o la vida media de dicho polinucleótido o que mejoran o facilitan de otra manera la traducción de dicho polinucleótido.
20

En ciertas realizaciones, las modificaciones químicas son modificaciones de bloqueo final del uno o más polinucleótidos que comprenden las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, tales polinucleótidos pueden modificarse mediante la incorporación de secuencias no traducidas (UTR) 3' y/o 5' que no se encuentran de manera natural en el polinucleótido de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, la secuencia flanqueante 3' y/o 5' que flanquea de manera natural un ARNm y codifica una segunda proteína no relacionada puede incorporarse en la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm que codifica una proteína funcional para modificarla. Por ejemplo, las secuencias 3' o 5' de las moléculas de ARNm que son estables (por ejemplo, globina, actina, GAPDH, tubulina, histona o enzimas del ciclo del ácido cítrico) pueden incorporarse en la región 3' y/o 5' de una molécula de polinucleótidos de ARNm de sentido para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm de sentido.
25
30

También se contemplan por la presente invención modificaciones en las secuencias de polinucleótidos realizadas en uno o ambos extremos 3' y 5' del polinucleótido. Por ejemplo, la presente invención contempla modificaciones en el extremo 5' de los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) para incluir una secuencia parcial de un gen de CMV inmediato-temprano 1 (IE1), o un fragmento del mismo para mejorar la resistencia a la nucleasa y/o Mejorar la vida media del polinucleótido. Además de aumentar la estabilidad de la secuencia de polinucleótidos de ARNm, se ha descubierto sorprendentemente que la inclusión de una secuencia parcial de un gen de CMV inmediato-temprano 1 (IE1) (por ejemplo, en una o más de la región no traducida 5' y región no traducida 3' del ARNm) mejora aún más la traducción del ARNm. También se contempla la inclusión de una secuencia que codifica la hormona del crecimiento humano (hGH), o un fragmento de la misma en uno o ambos extremos 3' y 5' del polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para estabilizar aún más el polinucleótido. En general, las modificaciones químicas contempladas mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, la vida media) del polinucleótido con respecto a sus contrapartidas no modificadas, e incluyen, por ejemplo, modificaciones realizadas para mejorar la resistencia de tales polinucleótidos a la digestión *in vivo* de nucleasas.
35
40
45

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica, las dos o más nanopartículas lipídicas comprendidas en ellas o los polinucleótidos encapsulados por tales nanopartículas lipídicas pueden comprender un reactivo estabilizante. Las composiciones pueden incluir uno o más reactivos de formulación que se unen directa o indirectamente y estabilizan el polinucleótido, mejorando de este modo el tiempo de residencia en el citoplasma de una célula objetivo. Tales reactivos llevan preferiblemente a una vida media mejorada de un polinucleótido en las células objetivo. Por ejemplo, la estabilidad de un ARNm y la eficiencia de la traducción pueden aumentarse mediante la incorporación de "reactivos estabilizadores" que forman complejos con los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) que se producen de manera natural dentro de una célula (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.677.124). La incorporación de un reactivo de estabilización puede lograrse, por ejemplo, combinando el poli A y una proteína con el ARNm que se estabilizará *in vitro* antes de cargar o encapsular el ARNm dentro de una o más nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica. Los reactivos de estabilización ejemplares incluyen una o más proteínas, péptidos, aptámeros, proteína accesoria de traducción, proteínas de unión a ARNm y/o factores de iniciación de la traducción.
50
55

La estabilización de las composiciones farmacéuticas y liposomales descritas en la presente (por ejemplo, Nanopartículas lipídicas) también puede mejorarse mediante el uso de fracciones inhibidores de la opsonización, que son típicamente polímeros hidrófilos grandes que están unidos química o físicamente o incorporados de otra manera en la nanopartícula lipídica (por ejemplo, mediante la intercalación de un anclaje liposoluble en la misma membrana, o uniéndose directamente a grupos activos de lípidos de la membrana). Estos polímeros hidrófilos que inhiben la opsonización forman una capa superficial protectora que disminuye significativamente la captación de los
60
65

liposomas por el sistema de monocitos y macrófagos y el sistema retículo endotelial (por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.920.016) Por ejemplo, los retrasos en la captación de las nanopartículas lipídicas por el sistema reticuloendotelial pueden facilitarse mediante la adición de un recubrimiento superficial de polímero hidrófilo sobre o dentro de las nanopartículas lipídicas para enmascarar el reconocimiento y la captación de las nanopartículas lipídicas a base de liposomas por el sistema reticuloendotelial. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente comprenden un polímero de polietilenglicol (PEG) o un lípido modificado con PEG para mejorar aún más la administración de tales nanopartículas lipídicas a la célula y tejidos objetivo.

Cuando el ARN se hibrida con una molécula de polinucleótidos complementaria (por ejemplo, ADN o ARN), puede protegerse de las nucleasas. (Krieg, et al. Melton. Methods in Enzymology. 1987; 155, 397-415). La estabilidad del ARNm hibridado se deba probablemente a la especificidad inherente de la cadena sencilla de la mayoría de las RNAsas. En algunas realizaciones, el reactivo de estabilización seleccionado para complejar un polinucleótido es una proteína eucariota (por ejemplo, una proteína de mamífero). En otra realización más, el polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para su uso en terapia sensorial puede modificarse por hibridación a una segunda molécula de polinucleótido. Si se hibridara una molécula completa de ARNm con una molécula de polinucleótido complementaria, podría reducirse el inicio de la traducción. En algunas realizaciones, la región no traducida 5' y la región de inicio AUG de la molécula de ARNm pueden dejarse opcionalmente sin hibridar. Después del inicio de la traducción, la actividad de desenrollado del complejo ribosómico puede funcionar incluso en dúplex de alta afinidad para que pueda continuar la traducción. (Liebhaber. J. Mol. Biol. 1992; 226: 2-13; Monia, et al. J Biol Chem. 1993; 268: 14514-22). Se entenderá que cualquiera de los métodos descritos anteriormente para mejorar la estabilidad de los polinucleótidos puede usarse solo o en combinación con uno o más de cualquiera de los otros métodos y/o composiciones descritos anteriormente.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención mejoran la administración de polinucleótidos encapsulados en nanopartículas lipídicas a una o más células, tejidos u órganos objetivo. En algunas realizaciones, la administración mejorada a una o más células objetivo comprende aumentar la cantidad de polinucleótido que entra en contacto o se administra de otro modo a las células objetivo. En algunas realizaciones, mejorar la administración a las células objetivo comprende reducir la cantidad de polinucleótido que entra en contacto con células no objetivo. En algunas realizaciones, mejorar la administración a las células objetivo comprende permitir la transfección de por lo menos algunas células objetivo con el polinucleótido encapsulado. En algunas realizaciones, se aumenta de este modo en las células objetivo el nivel de expresión del polinucleótido encapsulado por las nanopartículas lipídicas que comprenden las presentes composiciones farmacéuticas y la producción correspondiente de la proteína o enzima codificada.

Los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales de la presente invención pueden combinarse opcionalmente con un gen informador (por ejemplo, en sentido ascendente o en sentido descendente de la región codificante del polinucleótido) que, por ejemplo, facilita la determinación de la administración de polinucleótidos a las células o tejidos objetivo. Los genes informadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, ARNm de proteína verde fluorescente (GFP ARNm), ARNm de luciferasa de *Renilla* (ARNm de Luciferasa), ARNm de luciferasa de luciérnaga, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el ARNm de GFP puede fusionarse con un polinucleótido que codifica ARNm de GLA (SEQ ID NO: 4) o ARNm de EPO (SEQ ID NO: 1) para facilitar la confirmación de la localización del ARNm en el plasma o en una o más células, tejidos u órganos objetivo.

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

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención facilitan la producción endógena por un sujeto de una o más proteínas y/o enzimas funcionales, y en particular la producción de proteínas y/o enzimas que demuestran menos inmunogenicidad con respecto a sus contrapartidas preparadas recombinantemente. En ciertas realizaciones de la presente invención, las nanopartículas lipídicas comprenden polinucleótidos que codifican ARNm de una proteína o enzima deficiente. Tras la distribución de tales composiciones a los tejidos objetivo y la posterior transfección de tales células objetivo, el ARNm exógeno cargado o encapsulado en las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones puede traducirse *in vivo* para producir una proteína funcional o enzima codificada por dicho ARNm encapsulado (por ejemplo, una proteína o enzima en la que el sujeto es deficiente). Por consiguiente, en ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención explotan la capacidad de un sujeto para traducir ARNm preparado exógena o recombinantemente para producir una proteína o enzima traducida

endógenamente y producir de este modo (y, cuando sea aplicable, excretar) una proteína o enzima funcional. Las proteínas o enzimas traducidas también pueden caracterizarse por la inclusión *in vivo* de modificaciones postraduccionales nativas que a menudo pueden estar ausentes en las proteínas o enzimas preparadas recombinantemente, reduciendo de este modo aún más la inmunogenicidad de la proteína o enzima traducida.

5 La encapsulación de ARNm en las nanopartículas lipídicas y la administración de las composiciones farmacéuticas que comprenden tales nanopartículas lipídicas evitan la necesidad de administrar el ARNm a orgánulos específicos dentro de una célula objetivo (por ejemplo, mitocondrias). Más bien, tras la transfección de una célula objetivo y la administración del ARNm encapsulado al citoplasma de la célula objetivo, pueden traducirse los contenidos de ARNm de las nanopartículas lipídicas y producirse una proteína o enzima funcional.

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

15 Alternativamente, la presente invención contempla el direccionamiento activo, que implica el uso de excipientes adicionales, referidos en la presente como "ligandos de direccionamiento" que pueden estar unidos (ya sea covalentemente o no covalentemente) a la nanopartícula lipídica para fomentar la localización de dicha nanopartícula lipídica en ciertas células objetivo o tejidos objetivo. Por ejemplo, el direccionamiento puede estar mediado por la inclusión de uno o más ligandos de direccionamiento endógenos (por ejemplo, apolipoproteína E) en o sobre la nanopartícula lipídica para fomentar la distribución a las células o tejidos objetivo. El reconocimiento del ligando de direccionamiento por los tejidos objetivo facilita activamente la distribución del tejido y la captación celular de las nanopartículas lipídicas y/o su contenido por las células y tejidos objetivo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la formulación farmacéutica pueden comprender un ligando dirigido a la apolipoproteína E en o sobre dichas nanopartículas lipídicas para facilitar o fomentar el reconocimiento y la unión de tales nanopartículas lipídicas a receptores de lipoproteínas endógenas de baja densidad expresadas, por ejemplo, por hepatocitos. Como se proporciona en la presente, la composición puede comprender un ligando capaz de potenciar la afinidad de las composiciones a una o más células objetivo. Los ligandos de direccionamiento pueden enlazarse a la bicapa externa de la nanopartícula lipídica durante la formulación o tras la formulación. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Además, algunas nanopartículas lipídicas pueden comprender polímeros fusogénicos como PEAA, hemaglutinina, otros lipopéptidos (ver las Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/835.281 y 60/083.294) y otras características útiles para la administración *in vivo* y/o intracelular. En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención demuestran eficacias de transfección mejoradas, y/o demuestran una selectividad mejorada hacia células o tejidos objetivo de interés. Por lo tanto, se contemplan composiciones o nanopartículas lipídicas que comprenden uno o más ligandos (por ejemplo, péptidos, aptámeros, oligonucleótidos, una vitamina u otras moléculas) que son capaces de mejorar la afinidad de las composiciones o sus nanopartículas lipídicas constituyentes y sus contenidos de polinucleótidos a una o más células o tejidos objetivo. Los ligandos adecuados pueden unirse o enlazarse opcionalmente a la superficie de la nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede abarcar la superficie de una nanopartícula lipídica o encapsularse dentro de la nanopartícula lipídica. Los ligandos adecuados se seleccionan en base a sus propiedades físicas, químicas o biológicas (por ejemplo, afinidad selectiva y/o reconocimiento de marcadores o características de la superficie celular objetivo). Los sitios objetivo específicos de la célula y su ligando objetivo correspondiente pueden variar ampliamente. Se seleccionan ligandos de direccionamiento adecuados de tal manera que se exploten las características únicas de una célula objetivo, permitiendo de este modo que la composición discrimine entre células objetivo y no objetivo. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden llevar marcadores de superficie (por ejemplo, apolipoproteína B o apolipoproteína E) que mejoran selectivamente el reconocimiento de, o la afinidad a los hepatocitos (por ejemplo, mediante el reconocimiento mediado por el receptor y la unión a dichos marcadores de superficie). Adicionalmente, se esperaría que el uso de galactosa como ligando de direccionamiento dirija las composiciones de la presente invención a los hepatocitos parenquimatosos, o alternatively, se esperaría que el uso de residuos de azúcar que contienen manosa como ligando de direccionamiento dirija las composiciones de la presente invención a células endoteliales hepáticas (por ejemplo, residuos de azúcar que contienen manosa que pueden unirse preferencialmente al receptor de asialoglicoproteína presente en los hepatocitos). (Ver, Hillery AM, et al. "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc.). La presentación de dichos ligandos de direccionamiento que se han conjugado con fracciones presentes en la nanopartícula lipídica facilita por tanto el reconocimiento y la captación de las composiciones liposomales de la presente invención por una o más células y tejidos objetivo. Los ejemplos de ligandos de direccionamiento adecuados incluyen uno o más péptidos, proteínas, aptámeros, vitaminas y oligonucleótidos.

65 Como se usa en la presente, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero no limitado a, humanos, primates no humanos, roedores y similares, a los cuales pueden

administrarse los compuestos, composiciones farmacéuticas o liposomales de la presente invención. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable en la presente en referencia a un sujeto humano.

5 La capacidad de los compuestos y composiciones farmacéuticas o liposomales descritas en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) para modular o mejorar la expresión de polinucleótidos encapsulados y la producción de un polipéptido o proteína proporciona medios novedosos y más eficientes para efectuar la producción *in vivo* de polipéptidos y proteínas para el tratamiento de una serie de enfermedades o afecciones patológicas. Tales composiciones de nanopartículas lipídicas son particularmente adecuadas para el tratamiento de enfermedades o afecciones patológicas asociadas con la expresión aberrante de ácidos nucleicos que codifican una proteína o enzima. Por ejemplo, la administración exitosa de polinucleótidos como el ARNm a órganos objetivo como el hígado y, en particular, a los hepatocitos, puede usarse para el tratamiento y la corrección de errores innatos del metabolismo que se localizan en el hígado. Por consiguiente, los compuestos, composiciones farmacéuticas y métodos relacionados descritos en la presente pueden emplearse para tratar una amplia variedad de enfermedades y afecciones patológicas, en particular aquellas enfermedades que se deben a deficiencias de proteínas o enzimas. Los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales descritos en la presente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas a base de HGT50001) pueden codificar un producto funcional (por ejemplo, una proteína, enzima, polipéptido, péptido, ARN funcional, y/o molécula antisentido), y preferiblemente codifica un producto del que se desea su producción *in vivo*.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención son ampliamente aplicables al administración de agentes terapéuticos como polinucleótidos, y en particular ARNm, para tratar una serie de trastornos. En particular, tales compuestos y composiciones de la presente invención son adecuados para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la deficiencia de proteínas y/o enzimas. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados en nanopartículas lipídicas codifican proteínas o enzimas funcionales que son excretadas o secretadas por una o más células objetivo en el fluido extracelular circundante (por ejemplo, ARNm que codifica hormonas y neurotransmisores). Alternativamente, en otra realización, los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposomales de la presente invención codifican proteínas funcionales o enzimas que permanecen en el citosol de una o más células objetivo (por ejemplo, ARNm que codifica una enzima asociada con el ciclo de la urea o trastornos metabólicos de almacenamiento lisosómico). Otros trastornos para los que los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles incluyen, pero no están limitados a, trastornos tales como atrofia muscular espinal (AME) relacionada con SMN1; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); galactosemia relacionada con GALT; fibrosis quística (CF); trastornos relacionados con SLC3A1, incluyendo la cistinuria; trastornos relacionados con COL4A5, incluyendo el síndrome de Alport; deficiencias de galactocerebrosidasa; adrenoleucodistrofia y adrenomielopatía ligadas al cromosoma X; 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 síndrome de X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil y síndrome de fallo ovárico prematuro de X frágil; síndrome de Prader-Willi; enfermedad de Fabry; telangiectasia hemorrágica hereditaria (AT); enfermedad de Niemann-Pick tipo C1; enfermedades relacionadas con las lipofuscinoses ceroides neuronales, incluyendo la lipofuscinoses ceroidea neuronal juvenil (JNCL), la enfermedad de Batten juvenil, la 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, incluyendo el síndrome de Rett clásico, encefalopatía neonatal grave relacionada con MECP2 y síndrome de 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 el 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 a X; agammaglobulinemia ligada a X; y la enfermedad de Wilson. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos, y en particular el ARNm, de la presente invención pueden codificar proteínas o enzimas funcionales. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden incluir ARNm que codifica ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL) o arginasa 1 (ARG1), regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), alfa glucosidasa ácida, arilsulfatasa A, α -galactosidasa A, eritropoyetina (por ejemplo, SED ID NO: 4), α 1-antitripsina, carboxipeptidasa N, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, iduronato-sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparina sulfamidasa, heparina-N-sulfatasa, lipasa de ácido lisosomal, hialuronidasa, galactocerebrosidasa, hormona de crecimiento humano, neurona motora de supervivencia, factor VIII, factor IX o receptores de lipoproteínas de baja densidad

En una realización, el ARNm codifica una proteína o una enzima seleccionada del grupo que consiste de hormona de crecimiento humano, eritropoyetina, α 1-antitripsina, alfa glucosidasa ácida, arilsulfatasa A,

carboxipeptidasa N, α -galactosidasa A, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, iduronato sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminida acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfosata, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparán-sulfamidasa, heparina-N-sulfatasa, lipasa de ácido lisosomal, hialuronidasa, galactocerebrosidasa, ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL), arginasa 1 (ARG1), regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), neurona motora de supervivencia (SMN), Factor VIII, Factor IX y receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR).

Los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente pueden administrarse a un sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones se formulan en combinación con uno o más polinucleótidos, portadores, ligandos de direccionamiento o reactivos de estabilización adicionales u otros excipientes adecuados. Las técnicas para la formulación y administración de medicamentos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición.

Los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposomales (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) de la presente invención pueden administrarse y dosificarse de acuerdo con la práctica médica actual, teniendo en cuenta el estado clínico del sujeto, la naturaleza de los materiales encapsulados, el sitio y método de administración, la programación de la administración, la edad, el sexo, el peso corporal del sujeto y otros factores relevantes para los practicantes clínicos con experiencia en la técnica. La "cantidad eficaz" para los propósitos de la presente puede determinarse mediante las consideraciones relevantes que conocen los expertos en investigación clínica experimental, técnicas farmacológicas, clínicas y médicas. En algunas realizaciones, la cantidad administrada es eficaz para lograr por lo menos algo de estabilización, mejora o eliminación de síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas de progreso, regresión o mejora de la enfermedad por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una cantidad adecuada y un régimen de dosificación es uno que provoca por lo menos la expresión transitoria del uno o más polinucleótidos en las células objetivo.

Las vías adecuadas de administración de los compuestos y composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal, vaginal, transmucosal o intestinal; administración parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones o infusiones intratecales, intracerebroventriculares, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares. En ciertas realizaciones, la administración de los compuestos o composiciones (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) descritas en la presente a un sujeto facilita el contacto de tales compuestos o composiciones con una o más células, tejidos u órganos objetivo.

Alternativamente, los compuestos y composiciones de la presente invención pueden administrarse de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección o infusión de las composiciones farmacéuticas directamente en un tejido objetivo, preferiblemente en una formulación de depósito o de liberación sostenida, de tal manera que el contacto de las células objetivo con las nanopartículas lipídicas constituyentes puede facilitarse aún más. La administración local puede verse afectada de varias maneras, dependiendo del tejido que es objetivo. Por ejemplo, las composiciones que contienen aerosoles de la presente invención pueden inhalarse (para administración nasal, traqueal o bronquial); las composiciones de la presente invención pueden inyectarse en el sitio de lesión, manifestación de enfermedad o dolor, por ejemplo; las composiciones pueden proporcionarse en grageas para aplicación oral, traqueal o esofágica; puede suministrarse en forma de líquido, comprimido o cápsula para administración al estómago o intestinos, puede suministrarse en forma de supositorio para aplicación rectal o vaginal; o incluso puede administrarse al ojo mediante el uso de cremas, gotas o incluso inyecciones. Las formulaciones que contienen los compuestos de la presente invención complejados con moléculas o ligandos terapéuticos pueden incluso administrarse quirúrgicamente, por ejemplo en asociación con un polímero u otra estructura o sustancia que puede permitir que las composiciones se difundan desde el sitio de implantación a las células circundantes. Alternativamente, tales composiciones pueden aplicarse quirúrgicamente sin el uso de polímeros o soportes.

También se contemplan en la presente composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden uno o más de los compuestos divulgados en la presente y métodos relacionados para el uso de tales composiciones liofilizadas como se divulga, por ejemplo, en la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/494.882 (N° de Expediente de Representante SHIR-023-001), presentada el 8 de junio de 2011.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se formulan de tal manera que sean adecuadas para la liberación prolongada de, por ejemplo, los polinucleótidos o ácidos nucleicos encapsulados en las mismas. Tales composiciones de liberación prolongada pueden administrarse convenientemente a un sujeto a intervalos de dosificación prolongados. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces al día, diariamente o cada dos días. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces por semana, una vez por semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, o más preferiblemente cada cuatro semanas, una vez al mes, cada seis semanas, cada ocho semanas, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis

meses, cada ocho meses, cada nueve meses o anualmente. También se contemplan composiciones y nanopartículas lipídicas que se formulan para la administración de depósito (por ejemplo, intramuscularmente, subcutáneamente, intravítreamente) para administrar o liberar un polinucleótido (por ejemplo, ARNm) durante períodos de tiempo prolongados. Preferiblemente, los medios de liberación prolongada empleados se combinan con modificaciones (por ejemplo, modificaciones químicas) introducidas en los polinucleótidos para mejorar la estabilidad.

Aunque ciertos compuestos y composiciones de la presente invención se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar los compuestos de la invención y no se pretende que los limiten.

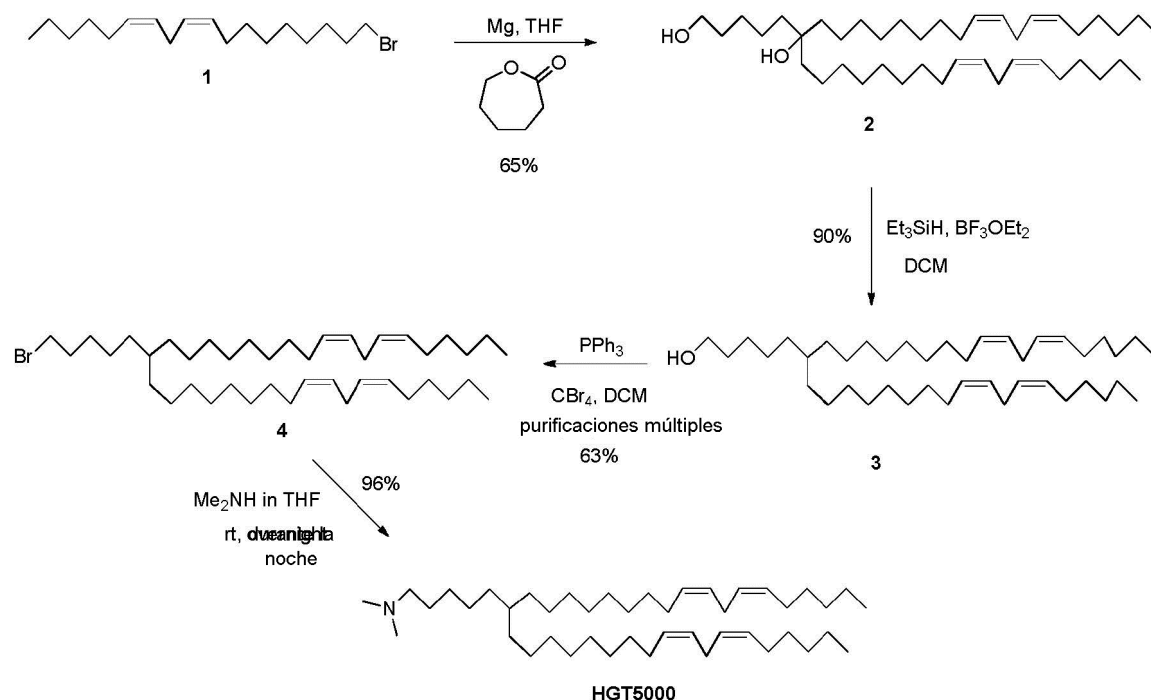
Debe entenderse que los artículos "un" y "uno", como se usan en la presente en la memoria descriptiva, a menos que se indique claramente lo contrario, incluyen los referentes plurales. Cuando los elementos se presentan como listas (por ejemplo, en el grupo Markush o en un formato similar), debe entenderse que también se divulga cada subgrupo de los elementos, y cualquier elemento puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención, o los aspectos de la invención, se refieren a que comprenden elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones o aspectos de la invención de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc. Con propósitos de simplicidad, esas realizaciones no se han establecido en todos los casos específicamente en tantas palabras en la presente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

El compuesto *(15Z,18Z)-N,N*-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-15,18-dien-1-amina (referido en la presente como "HGT5000") se preparó de acuerdo con el esquema sintético general que se muestra a continuación en la Reacción 1.

Reacción 1



El compuesto intermedio *(15Z,18Z)*-6-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il]tetracosa-15,18-dieno-1,6-diol identificado como compuesto **(2)** en la Reacción 1 anterior se preparó de la siguiente manera. A un matraz de fondo redondo de 100 ml se añadieron 10 g (30 mmol) de compuesto **(1)** (bromuro de linolileno) y THF seco (20 ml) bajo nitrógeno. Se añadió polvo de magnesio (1,11 g, 45 mmol) a la solución de reacción agitada seguido de 2 gotas de dibromoetano a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a 50° C durante 1 hora, y luego se diluyó con THF seco (40 ml). La mezcla de la reacción se agitó otros 15 minutos a temperatura ambiente.

En un matraz de 3 bocas de 250 ml separado se tomó ϵ -caprolactona (1,44 ml, 13,5 mmol) en THF seco

(20 ml) bajo nitrógeno. A la solución agitada se le añadió el reactivo de Grignard a través de una cánula a 0° C. La mezcla resultante se calentó a 85° C durante 3 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se inactivó luego con solución de NH₄Cl y se extrajo con diclorometano (3 x 100 ml). Los extractos combinados se lavaron con salmuera (50 ml), se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron. El residuo se purificó dos veces por cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de elución de hexano a 3:2 hexano/EA) para proporcionar el compuesto **(2)** como un aceite. Rendimiento: 5,46 g (65%). ¹H NMR (301 MHz, CDCl₃) δ: 5.25 - 5.45 (m, 8H), 3.65 (m, 2H), 2.77 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H), 1.95 - 2.1 (m, 8H), 1.2 - 1.70 (m, 50H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H).

El compuesto intermedio *(15Z,18Z)-6-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il]tetracosa-15,18-dieno-1-ol* identificado como compuesto **(3)** en la Reacción 1 anterior se preparó de la siguiente manera. El compuesto **(2)** (4,4 g, 7,15 mmol) se disolvió en diclorometano (70 ml). La solución se agitó bajo nitrógeno a 0° C y se añadió Et₃SiH (8,07 ml, 50,08 mmol). Se añadió eterato de dietil trifluoruro de boro (8,77 ml, 71,5 mmol) gota a gota a 0° C. La mezcla de la reacción se agitó luego a la misma temperatura durante 3 horas, luego a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se inactivó luego con una solución de carbonato de sodio al 10% (200 ml). La mezcla resultante se extrajo dos veces con diclorometano (2 x 150 ml). El extracto combinado se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó dos veces por cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente de hexano a 2:1 hexano/EA) para proporcionar el compuesto del producto intermedio deseado **(3)** como un aceite. Rendimiento: 3,86 g (90%). ¹H NMR (301 MHz, CDCl₃) δ: 5.2 - 5.5 (m, 8H), 3.62 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6 Hz, 4H), 1.9 - 2.1 (m, 8H), 1.5 - 1.65 (m, 2H), 1.1 - 1.45 (m, 48 H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H).

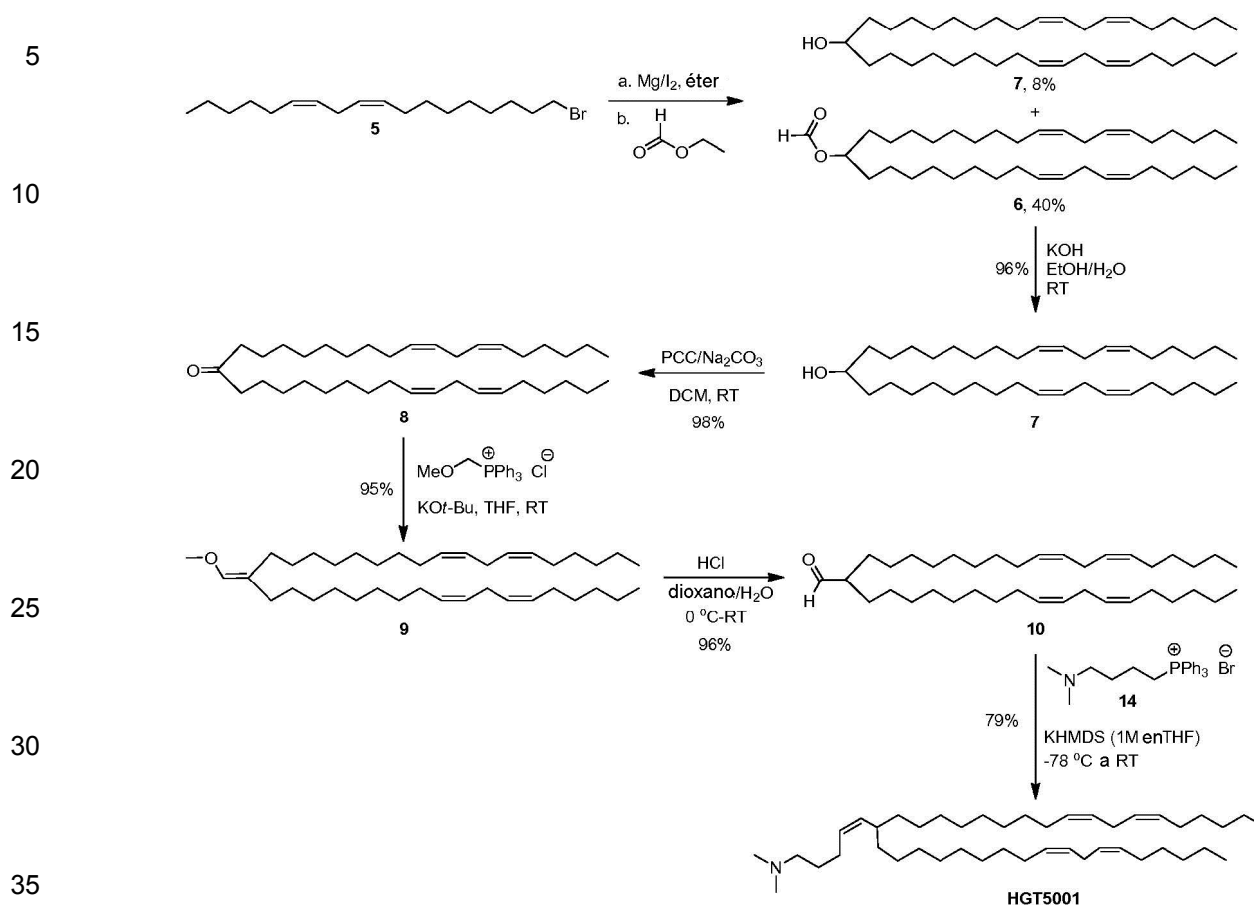
El compuesto intermedio *(6Z,9Z,28Z,31Z)-19-(5-bromopentil)heptatriaconta-6,9,28,31-tetraeno* identificado como compuesto **(4)** en la Reacción 1 anterior se preparó de la siguiente manera. Una solución de compuesto **(3)** (3,86 g, 6,45 mmol) en diclorometano (80 ml) se agitó bajo nitrógeno a 0° C. Se añadió trifenilfosfina (1,86 g, 7,10 mmol) a la solución seguido de tetrabromometano (2,14 g, 6,45 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a 0° C durante 3 horas, luego a temperatura ambiente durante 30 minutos. La TLC todavía mostró una presencia de material de partida, por consiguiente, se añadió otra porción de trifenilfosfina (0,4 g) a 0° C. Después de 30 minutos, todo el material de partida se había consumido y la mezcla de la reacción se concentró. Al residuo se le añadió una mezcla de éter y hexano (2:1, 200 ml) y la suspensión se agitó durante 15 minutos. Los sólidos se filtraron y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante múltiples cromatografías en columna (gradiente de elución de hexano a 3:2 hexano/EA) para proporcionar el compuesto del producto intermedio deseado **(4)**. Rendimiento: 2,7 g (63%). ¹H NMR (301 MHz, CDCl₃) δ: 5.2 - 5.5 (m, 8H), 3.40 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6 Hz, 4H), 1.8 - 2.1 (m, 8H), 1.15 - 1.5 (m, 46H), 0.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 6H).

Para preparar el compuesto HGT5000 *(15Z,18Z)-N,N-dimetil-6(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-15,18-dien-1-amina*, se disolvió compuesto **(4)** (2,70 g, 4,07 mmol) en una solución 2 M de dimetilamina en THF (204 ml, 100 eq.). La solución resultante se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de la reacción se concentró luego a presión reducida. El residuo se purificó dos veces por cromatografía en columna de gel de sílice (elución en gradiente de metanol al 0%-10% en diclorometano) para dar el compuesto HGT5000 como un aceite amarillo claro. Rendimiento: 2,52 g (96%). ¹H NMR (301 MHz, CDCl₃) δ: 5.42 - 5.29 (m, 8H), 2.77 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H), 2.28 - 2.24 (m, 8H), 2.01 - 2.08 (m, 8H), 1.66 - 1.63 (m, 2H), 1.41 - 1.20 (m, 48H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 130.3, 128.0, 59.9, 45.3, 37.5, 33.8, 31.6, 30.3, 29.8, 29.7, 29.4, 28.0, 27.5, 27.3, 26.8, 26.7, 25.7, 22.7. APCI [M+H] 626.6. R_f = 0.48 (10% MeOH in DCM).

45 Ejemplo 2

El compuesto *(15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-4,15,18-trien-1-amina* (referido en la presente como "HGT5001") se preparó de acuerdo con el esquema sintético general ilustrado a continuación en la Reacción 2.

Reacción 2



Los compuestos intermedios *(6Z,9Z,28Z,31Z)*-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il formiato (**6**) y *(6Z,9Z,28Z,31Z)*-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ol identificados respectivamente como compuestos (**6**) y (**7**) en la Reacción 2 anterior se prepararon en un matraz de 500 ml de 3 bocas secado al horno que se cargó con Mg (0,5 g, 20,83 mmol, 1,37 eq.) e I₂ (un cristal) bajo argón. El matraz se desgasificó en una línea de alto vacío, luego se enjuagó con argón (el proceso se repitió cuatro veces) y luego se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. A este matraz se añadió éter anhidro (22 ml) y la suspensión se agitó durante aproximadamente 10 minutos. Luego se añadieron 5 g (15,2 mmol, 1 eq.) de compuesto (**5**) (bromuro de linoleilo) bajo argón (se observó un cambio de color después de la adición de aproximadamente 4,5 ml de compuesto (**5**)) y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Se observó una reacción exotérmica después de agitar durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. Por tanto, la mezcla se enfrió usando un baño de agua con hielo durante aproximadamente 2 minutos, luego se retiró el baño de hielo y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, dando como resultado una mezcla de la reacción de color ceniza y no se consumió todo el Mg. La mezcla se enfrió a 0° C y se añadió HCO₂Et gota a gota (0,58 ml, 7,17 mmol, 0,47 eq.) directamente a la solución. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3 horas (se observó el producto después de 1 hora por MS y TLC), la mezcla se decantó y las vueltas de Mg se lavaron con éter. Los lavados combinados se diluyeron con éter (100 ml), se lavaron con H₂SO₄ al 10% (2 X 50 ml), agua, salmuera y luego se secaron (Na₂SO₄). La solución se filtró, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice.

5-7% de éter en hexanos eluyó el alcohol (compuesto (**7**)) del residuo. Rendimiento: 0,34 g (8%).
 Compuesto 7: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.38-5.31 (m, 8H), 3.58 (br s, 1H), 2.76 (t, J = 6 Hz, 4 H), 2.04 (q, J = 6.8 Hz, 8H), 1.39-1.26 (m, 40H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 6H). APCI[M+H] 527, 511 (-H₂O).

El 2% de éter en hexanos eluyó el formiato (compuesto (**6**)) del residuo. Rendimiento: 1,7 g (40%).
 Compuesto **6**: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.08 (s, 1H), 5.42-5.28 (m, 8H), 4.99-4.95 (m, 1H), 2.76 (t, J = 6 Hz, 4 H), 2.04 (q, J = 6.6 Hz, 8H), 1.39-1.26 (m, 40H), 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 6H). APCI[M+H] 557. Para obtener el compuesto (**7**) del compuesto (**6**), se añadió KOH (polvo, 0,76 g, 13,5 mmol, 1,4 eq.) a una solución turbia del compuesto (**6**) (5,33 g, 9,59 mmol, 1 eq.) en EtOH/H₂O (90 ml/16 ml). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo una atmósfera de N₂. Esta mezcla se concentró luego, se diluyó con éter, se lavó con HCl

acuoso al 5% (2 X 100 ml), agua y se secó (Na_2SO_4). La solución se filtró, se concentró y luego se secó a vacío alto para obtener el compuesto (**7**) como un aceite incoloro. Rendimiento: 4,9 g (96%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 5.38-5.31 (m, 8H), 3.58 (br s, 1H), 2.76 (t, $J = 6$ Hz, 4 H), 2.04 (q, $J = 6.8$ Hz, 8H), 1.39-1.26 (m, 40H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H). APCI[M+H] 527, 511 ($-\text{H}_2\text{O}$).

5 El compuesto intermedio (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ona identificado como compuesto (**8**) en la Reacción 2 anterior se preparó de la siguiente manera. A una solución del compuesto (**7**) (4,81 g, 9,09 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (230 ml) se añadió en porciones Na_2CO_3 (0,49 g, 4,54 mmol) y luego PCC (4,9 g, 22,7 mmol, 2,5 eq.) durante un período de 15 minutos. La mezcla negra se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La TLC mostró la finalización de la reacción. La mezcla de la reacción se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice (200 g) y la almohadilla se lavó con CH_2Cl_2 (3 X 400 ml). El filtrado se concentró y se secó en una línea de alto vacío para obtener el compuesto de cetona (**8**) como un aceite incoloro. Rendimiento: $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 5.36-5.33 (m, 8H), 2.76 (t, $J = 5.8$ Hz, 4 H), 2.37 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.04 (q, $J = 6$ Hz, 8H), 1.32-1.27 (m, 36H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H). APCI[M+H] 527.

15 El compuesto intermedio (6Z,9Z,28Z,31Z)-19-(metoximetil)heptatriaconta-6,9,28,31-tetraeno identificado como compuesto (**9**) en la Reacción 2 anterior se preparó de la siguiente manera. Una mezcla de compuesto (**8**) (2,7 g, 5,12 mmol, 1 eq.) y cloruro de (metoximetil)trifenilfosfonio (2,63 g, 7,67 mmol, 1,5 eq.) se desgasificó a alto vacío y se lavó con argón (4 veces). Se añadió THF anhidro (68 ml) seguido de KOt-Bu 1 M en THF (7,67 ml, 7,67 mmol, 1,5 eq.) gota a gota con una jeringa. La solución roja resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de la reacción se diluyó con éter, se lavó con agua, salmuera y se secó (Na_2SO_4). La eliminación del solvente y la cromatografía (1-4% de éter en hexanos) del residuo produjeron el compuesto del producto (**9**) como un aceite incoloro. Rendimiento: 2,7 g (95%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 5.72 (s, 1H), 5.36-5.33 (m, 8H), 3.5 (s, 3H), 2.76 (t, $J = 6$ Hz, 4 H), 2.05-1.98 (m, 10H), 1.85-1.80 (m, 2H), 1.31-1.27 (m, 36H), 0.88 (t, $J = 6.6$ Hz, 6H). APCI[M+H] 555.

20 El compuesto intermedio (11Z,14Z)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)icosa-11,14-dienal identificado como compuesto (**10**) en la Reacción 2 anterior se preparó de la siguiente manera. A una solución turbia del compuesto (**9**) (1,3 g, 2,34 mmol) en una mezcla de dioxano/ H_2O (56 ml/29 ml) se añadió solución de HCl 4 M en dioxano (29 ml, 116 mmol, 49 eq.) a 0°C gota a gota durante 10 minutos. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y luego se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas (monitorizado por TLC). Luego, la mezcla se diluyó con éter, se enfrió a 0°C y después se inactivó lentamente con NaHCO_3 acuoso. La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó (Na_2SO_4), se filtró, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice. El 1% de éter en hexanos eluyó el compuesto del producto (**10**) como un aceite incoloro. Rendimiento: 1,21 g (96%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 9.53 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 5.36-5.33 (m, 8H), 2.76 (t, $J = 5.8$ Hz, 4 H), 2.23-2.18 (m, 1H), 2.05-1.96 (m, 8H), 1.61-1.16 (m, 40H), 0.88 (t, $J = 7$ Hz, 6H). APCI[M+H] 541.

30 El compuesto intermedio bromuro de (4-dimetilaminobutil)trifenilfosfonio (compuesto (**14**)) se preparó de acuerdo con el esquema sintético general que mostrado a continuación en la Reacción 3.

Reacción 3



50 El compuesto intermedio bromuro de (4-bromobutil)trifenilfosfonio (compuesto (**12**)) representado en la Reacción 3 anterior se preparó colocando 10 g (46,3 mmol) de 1,4-dibromobutano (compuesto (**11**)) y 12,1 g de PPh_3 (46,3 mmol), 10 eq.) en tolueno seco (74 ml), y la mezcla se calentó a reflujo y se hirvió durante la noche. El sólido que se formó se filtró, se lavó con tolueno y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del producto (**12**) como un sólido blanco. Rendimiento: 16,1 g (73%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.84-7.68 (m, 15H), 4.03-3.93 (m, 2H), 3.58 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 2.36-2.28 (m, 2H), 1.89-1.76 (m, 2H). APCI[M+H] 397 (M-Br), 399 (M+2-Br).

55 El compuesto intermedio bromuro de (4-dimetilaminobutil)trifenilfosfonio (compuesto (**14**)) se preparó luego añadiendo 3 g (6,28 mmol, 1 eq.) de compuesto (**12**) en porciones a una solución de dimetilamina 2 M en THF (31,4 ml, 62,8 mmol), 10 eq.) A 0°C bajo N_2 . La suspensión resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 horas. Luego se añadió CH_3CN (35 ml) a esta suspensión y se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante la noche. Luego se burbujeó gas nitrógeno en la mezcla de la reacción para eliminar el exceso de dimetilamina y solventes. El sólido resultante se secó a alto vacío y proporcionó el compuesto producto (**13**) seco como un sólido amarillo claro. Rendimiento: 3,16 g (96%). El compuesto producto (**13**) se agitó con NaHCO_3 acuoso saturado (110 ml) durante 15 minutos y se liofilizó para producir un sólido de color amarillo claro. Este sólido se agitó con cloroformo y se filtró. El filtrado se secó sobre MgSO_4 , se filtró, se concentró y el residuo se secó a alto vacío a 45°C para producir el compuesto de producto (**14**) como un sólido rosa claro. Rendimiento: 2,7 g (97%). $^1\text{H NMR}$ (300

MHz, CDCl_3): δ 7.89-7.75 (m, 9H), 7.71-7.65 (m, 6H), 3.93-3.83 (m, 2H), 2.47 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.25 (s, 6H), 1.94-1.87 (m, 2H), 1.75-1.62 (m, 2H). APCI[M+H] 362 (M-Br).

5 Luego se preparó HGT5001 ((15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracos-4,15,18-trien-1-amina) mediante la adición de compuesto intermedio cargado (**14**) (0,58 g, 1,32 mmol, 1,5 eq.) a un matraz RB secado por llama (3 bocas, 100 ml) y el matraz se equipó luego con una barra de agitación magnética. Esta configuración se desgasificó (bajo alto vacío) y se enjuagó con argón (3 veces). Luego se añadió THF anhidro (10 ml) al matraz con una jeringuilla. La suspensión resultante se agitó bajo argón durante 5 minutos y luego se enfrió a -78° C. Luego, se añadió KHMDs (1 M en THF, 1,32 ml, 1,32 mmol, 1,5 eq.) gota a gota al matraz de reacción y dio como resultado una solución naranja amarillento turbia. Esta solución se agitó a -78° C durante 45 minutos. El baño de enfriamiento se retiró y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos para dar una solución naranja rojiza. La mezcla se enfrió de nuevo a -78° C y se añadió una solución de compuesto intermedio (**10**) (0,47 g, 0,88 mmol) en THF seco (13 ml) a través de una cánula. El color de la mezcla de la reacción cambió a amarillo claro. La mezcla de la reacción se agitó a -78° C durante 45 minutos y luego se retiró el baño de enfriamiento, se continuó la agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos adicionales. La mezcla se enfrió de nuevo a -20° C y luego se inactivó con agua (7 ml). La mezcla de la reacción se diluyó con éter y se agitó durante 10 minutos. La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna en una columna de gel de sílice. El 1,5-2% de metanol en cloroformo eluyó el producto HGT5001 como un aceite amarillo claro. Rendimiento: 0,43 g (79%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, C_6D_6): δ 5.52-5.46 (m, 9H), 5.22-5.12 (m, 1H), 2.89 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H), 2.43 (br s, 1H), 2.24-2.03 (m, 18H), 1.55-1.37 (m, 2H), 1.35-1.22 (m, 40H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H). APCI[M+H] 624. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{81}\text{N}$ (teoría, encontrado): C (84.67, 84.48); H (13.08, 13.12); N (2.24, 2.19).

Ejemplo 3

25 Se formaron nanopartículas lipídicas que comprenden HGT5000, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 y que encapsulan ARNm de eritropoyetina (EPO) humana mediante métodos estándar de inyección de etanol. (Ponsa, et al., Int. J. Pharm. (1993) 95: 51-56.) Se prepararon soluciones madre de los lípidos etanólicas con anticipación a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20° C.

30 El ARNm de eritropoyetina humana (EPO) se sintetizó por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica el gen, lo que fue seguido de la adición de una estructura de cap 5' (Cap1) (Fechter, P. et al., J. Gen. Virology (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli (A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud según lo determinado por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en el ARNm de EPO se representan como X e Y en la SEQ ID NO: 1, como se indica a continuación.

ARNm de eritropoyetina humana:

SEQ ID NO: 1

40 **X**AUGGGGGUGCACGAAUGUCCUGCCUGGCUGUGGCUUCUCCUGUCCUGCUGUCGCUCCCUCUGGGCC
UCCCAGUCCUGGGCGCCCCACCAACGCCUCAUCUGUGACAGCCGAGUCCUGGAGAGGUACCUCUUGGAG
GCCAAGGAGGCGGAGAAUAUCACGACGGGCUGUGCUGAACACUGCAGCUUGAAUGAGAAUAUCACUGU
45 CCCAGACACCAAAGUUAUUUCUAUGCCUGGAAGAGGAUGGAGGUCGGGCAGCAGGCCGUAGAAGUCU
GGCAGGGCCUGGGCCUGCUGUCGGAAGCUGUCCUGCGGGGCCAGGCCUGUUGGUCAACUCUCCCCAG
CCGUGGGAGCCCCUGCAGCUGCAUGUGGUAUAAAGCCGUCAGUGGCCUUCGCAGCCUCACCACUCUGCU
UCGGGCUCUGGGAGCCCAGAAGGAAGCCAUCUCCCCUCCAGAUGCGGCCUCAGCUGCUCCACUCCGAA
50 CAAUCACUGCUGACACUUCCGCAAACUCUUCGAGUCUACUCCAAUUUCCUCCGGGGAAAGCUGAAG
CUGUACACAGGGGAGGCCUGCAGGACAGGGGACAGAUGAY

X = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 3)

55 El ARNm de EPO se almacenó en agua a una concentración final de 1 mg/ml a -80° C hasta el momento de su uso. Todas las concentraciones de ARNm se determinaron mediante el ensayo Ribogreen (Invitrogen). La encapsulación del ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1%. Los tamaños de partículas (dispersión dinámica de la luz (DLS)) y los potenciales zeta se determinaron usando un instrumento Zetasizer Malvern en soluciones 1x PBS e 1mM KCl, respectivamente.

65 Se mezclaron y diluyeron con etanol partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT5000, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de EPO a partir de un stock de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al

20%. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8° C. Concentración final = 1,82 mg/ml de ARNm de EPO (encapsulado). Z_{ave} = 105.6 nm ($Dv_{(50)}$ = 53.7 nm; $Dv_{(90)}$ = 157 nm).

5 Ejemplo 4

Se formaron nanopartículas lipídicas que comprenden HGT5000, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 y que encapsulan ARNm de alfa-galactosidasa humana (GLA) mediante métodos de inyección de etanol estándar. (Ponsa, et al., Int. J. Pharm. (1993) 95: 51-56.) Las soluciones madre etanólicas de los lípidos se prepararon por adelantado a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20° C.

El ARNm de GLA humano se sintetizó mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica el gen, lo que fue seguido por la adición de una estructura cap 5' (Cap1) (Fechter, P. et al., J. Gen. Virology (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli (A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud según se determina por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en el ARNm de GLA se representan como X e Y en la SEQ ID NO: 4, como se indica a continuación.

ARNm de alfa-galactosidasa (GLA):

20 SEQ ID NO: 4

XAUGCAGCUGAGGAACCCAGAACUACAUCUGGGCUGCGCGCUUGCGCUUCGCUUCCUGGCCUCGUUU
 CCUGGGACAUCCCUGGGGCUAGAGCACUGGACAAUGGAUUGGCAAGGACGCCUACCAUGGGCUGGCUG
 CACUGGGAGCGCUUCAUGUGCAACCUUGACUGCCAGGAAGAGCCAGAUUCCUGCAUCAGUGAGAAGCU
 25 CUUCAUGGAGAUGGCAGAGCUCAUGGUCUCAGAAGGCUGGAAGGAUGCAGGUUAUGAGUACCUCUGCA
 UUGAUGACUGUUGGAUGGCUCUCCCCAAAGAGAUUCAGAAGGCAGACUUCAGGCAGACCCUCAGCGCUUU
 CCUCAUGGGAUUCGCCAGCUAGCUAAUUAUGUUCACAGCAAAGGACUGAAGCUAGGGAUUUUAUGCAGA
 UGUUGGAAAUA AAAACCUGCGCAGGCUUCCCUGGGAGUUUUGGAUACUACGACAUUGAUGCCCAGACCU
 30 UUGCUGACUGGGGAGUAGAUCUGCUAAAAUUUGAUGGUUUGUACUGUGACAGUUUGGAAAAUUUGGCA
 GAUGGUUAUAAGCACAUGUCCUUGGCCUGAAUAGGACUGGCAGAAAGCAUUGUGUACUCCUGUGAGUG
 GCCUCUUUAUAUGUGGCCCUUUCAAAAGCCCAAUUAUACAGAAAUCCGACAGUACUGCAAUCACUGGC
 GAAUUUUUGCUGACAUUGAUGAUUCCUGGAAAAGUAUAAAGAGUAUCUUGGACUGGACAUCUUUUUAA
 35 CAGGAGAGAAUUGUUGAUGUUGCUGGACCAGGGGUUGGAAUGACCCAGAUUAUGUUAGUGAUUGGCAA
 CUUUGGCCUCAGCUGGAAUCAGCAAGUAACUCAGAUGGCCUCUGGGCUAUC AUGGCUGCUCCUUUAU
 UCAUGUCUAAUGACCUCGACACAUCAGCCCUCAAGCCAAAGCUCUCCUUCAGGAUAAGGACGUAAU
 GCCAUCAAUCAGGACCCUUGGGCAAGCAAGGUACCAGCUUAGACAGGGAGACAACUUUGAAGUGUG
 40 GGAACGACCUCUCUCAGGCUUAGCCUGGGCUGUAGCUAUGAUAAACCGGCAGGAGAUUGGUGGACCUC
 GCUCUUUAUACCAUCGCAGUUGCUUCCUGGGUAAAGGAGUGGCCUGUAAUCCUGCCUGCUUCAUCACA
 CAGCUCUCCUGUGAAAAGGAAGCUAGGGUUCUAUGAAUGGACUUCAAGGUUAAGAAGUCACAUAAA
 UCCCACAGGCACUGUUUUGCUUCAGCUAGAAAUAACAUGCAGAUGUCAUUAAAAGACUUACUUUAA**Y**

45 **X** = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 3)

50 El ARNm de GLA se almacenó en agua a una concentración final de 1 mg/ml a -80° C hasta el momento de su uso. Todas las concentraciones de ARNm se determinaron mediante el ensayo Ribogreen (Invitrogen). La encapsulación del ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1%. Los tamaños de partículas (dispersión dinámica de la luz (DLS)) y los potenciales zeta se determinaron usando un instrumento Zetasizer Malvern en soluciones 1x PBS e 1mM KCl, respectivamente.

55 Se mezclaron y diluyeron con etanol partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT5000, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de GLA a partir de la solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8° C. Concentración final = 1,38 mg/ml de ARNm de GLA (encapsulado). Z_{ave} = 77.7 nm ($Dv_{(50)}$ = 62.3 nm; $Dv_{(90)}$ = 91.7 nm).

65 Ejemplo 5

Se formaron nanopartículas lipídicas que comprenden HGT5001, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 y que

encapsulan ARNm de alfa-galactosidasa humana (GLA) mediante métodos de inyección de etanol estándar. (Ponsa, et al., Int. J. Pharm. (1993) 95: 51-56.) Se prepararon soluciones madre etanólicas de los lípidos por adelantado a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20° C.

5 El ARNm de alfa-galactosidasa humana (GLA) se sintetizó mediante transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica el gen, lo que fue seguido por la adición de una estructura cap 5' (Cap1) (Fechter, P. et al., J. Gen. Virology (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli (A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud según se determina por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en el ARNm de alfa-galactosidasa humana (GLA) se representan respectivamente como X e Y en la SEQ ID NO: 4, como se indica a continuación.

ARNm de alfa-galactosidasa humana (GLA):

SEQ ID NO: 4

15 **X**AUGCAGCUGAGGAACCCAGAACUACAUCUGGGCUGCGCGCUUGCUCUUCGCUUCCUGGCCUCGUUU
 CCUGGGACAUCCCUGGGGCUAGAGCACUGGACAAUGGAUUGGCAAGGACGCCUACCAUGGGCUGGCUG
 CACUGGGAGCGCUUCAUGUGCAACCUUGACUGCCAGGAAGAGCCAGAUUCCUGCAUCAGUGAGAAGCU
 20 CUUCAUGGAGAUGGCAGAGCUCUAGGUCUCAGAAGGCUGGAAGGAUGCAGGUUAUGAGUACCUCUGCA
 UUGAUGACUGUUGGAUGGCUCUCCCAAAGAGAUUCAGAAGGCAGACUUCAGGCAGACCCUCAGCGCUUU
 CCUCAUGGGAUUCGCCAGCUAGCUAAUUAUGUUCACAGCAAAGGACUGAAGCUAGGGAUUUUAUGCAGA
 UGUUGGAAAUA AAAACCUGCGCAGGCUUCCUGGGAGUUUUGGAUACUACGACAUUGAUGCCCAGACCU
 25 UUGCUGACUGGGGAGUAGAUCUGCUAAAAUUUGAUGGUUGUACUGUGACAGUUUGGAAAAUUUGGCA
 GAUGGUUAUAAGCACAUUGUCCUUGGCCUGAAUAGGACUGGCAGAAAGCAUUGUGUACUCCUGUGAGUG
 GCCUCUUUAUAUGUGGCCCUUUCAAAAGCCCAAUUAUACAGAAAUCCGACAGUACUGCAAUCACUGGC
 GAAAUUUUGCUGACAUUGAUGAUUCCUGGAAAAGUAUAAAGAGUAUCUUGGACUGGACAUCUUUUAAC
 CAGGAGAGAAUUGUUGAUGUUGCUGGACCAGGGGUUGGAAUGACCCAGAUUAGUUAGUGAUUGGCAA
 30 CUUUGGCCUCAGCUGGAAUCAGCAAGUAACUCAGAUUGGCCUCUGGGCUAUCAUUGGCUGCUCUUUAU
 UCAUGUCUAAUGACCUCGACACAUCAGCCUCAAAGCCAAAGCUCUCCUUCAGGAUAAGGACGUAAUU
 GCCAUCAAUCAGGACCCUUGGGCAAGCAAGGUUACCAGCUUAGACAGGGAGACAACUUUGAAGUGUG
 GGAACGACCUCUCUCAGGCUUAGCCUGGGCUGUAGCUAUGAUAAAACGGCAGGAGAUUGGUGGACCUC
 35 GCUCUUAUACCAUCGCAGUUGCUUCCUGGGUAAAAGGAGUGGCCUGUAAUCCUGCCUGCUUCAUCACA
 CAGCUCUCCUGUGAAAAGGAAGCUAGGGUUCUAUGAAUGGACUUCAGGUUAAGAAGUCACAUAAA
 UCCCACAGGCACUGUUUUGCUUCAGCUAGAAAUAACAUGCAGAUGUCAUUAAAAGACUUACUUUAA**Y**
 (SEQ ID NO: 2)

40 **X** = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 3)

45 Se mezclaron y diluyeron con etanol partes alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT5001, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrato 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de GLA a partir de un stock de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8° C. Concentración final = 0,68 mg/ml de ARNm de GLA (encapsulado). $Z_{ave} = 79.6\text{nm}$ ($DV_{(50)} = 57.26\text{nm}$; $DV_{(90)} = 100\text{nm}$).

Ejemplo 6

55 Se formaron nanopartículas lipídicas que comprenden HGT5001, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 y que encapsulan ARNm de eritropoyetina (EPO) humana mediante métodos de inyección de etanol estándar. (Ponsa, et al., Int. J. Pharm. (1993) 95: 51-56.) Se prepararon soluciones madre etanólicas de los lípidos por adelantado a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20° C.

60 El ARNm de eritropoyetina (EPO) humana se sintetizó por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN plasmídico que codifica el gen, lo que fue seguido por la adición de una estructura cap 5' (Cap1) (Fechter, P. et al., J. Gen. Virology (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli (A) 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud según se determina por electroforesis en gel. Las regiones no traducidas 5' y 3' presentes en el ARNm de eritropoyetina (EPO) humana se representan respectivamente como X e Y en la SEQ ID NO: 1, como se indica a continuación.

65

ARNm de eritropoyetina humana:

SEQ ID NO: 1

5
 XAUGGGGGUGCACGAAUGUCCUGCCUGGGCUGUGGCUUCUCCUGUCCCUGCUGUCGCUCCCUCUGGGCC
 UCCCAGUCCUGGGCGCCCCACCAACGCCUCAUCUGUGACAGCCGAGUCCUGGAGAGGUACCUCUUGGAG
 10 GCCAAGGAGGCCGAGAAUAUCACGACGGGCUGUGCUGAACACUGCAGCUUGAAUGAGAAUAUCACUGU
 CCCAGACACCAAAGUAAUUCUAUGCCUGGAAGAGGAUGGAGGUCGGGCAGCAGGCCGUAGAAGUCU
 GGCAGGGCCUGGCCUCUGCUGUCGGAAGCUGUCCUGCGGGGCCAGGCCUGUUGGUCAACUCUCCCCAG
 CCGUGGGAGCCCCUGCAGCUGCAUGUGGAUAAAGCCGUCAGUGGCCUUCGCAGCCUCACCACUCUGCU
 UCGGGCUCUGGGAGCCCAGAAGGAAGCAUCUCCCCUCCAGAUGCGGCCUCAGCUGCUCCACUCCGAA
 15 CAAUCACUGCUGACACUUCCGAAACUCUUCGAGUCUACUCCAAUUUCCUCCGGGGAAAGCUGAAG
 CUGUACACAGGGGAGGCCUGCAGGACAGGGGACAGAUGAY

X = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 2)

20 **Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 3)**

25 Se mezclaron y diluyeron con etanol alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT5001, DOPE, colesterol y DMG-PEG2K hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución tamponada acuosa (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de EPO a partir del stock de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20%. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8° C. Concentración final = 1,09 mg/ml de ARNm de EPO (encapsulado). $Z_{ave} = 62.1nm$ ($Dv_{(50)} = 45.2nm$; $Dv_{(90)} = 74.6nm$).

30 *Ejemplo 7*

Para determinar si las nanopartículas lipídicas a base de HGT5000 que encapsulan ARNm de GLA humano y se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 4 anterior fueron capaces de administrar los constructos de polinucleótidos encapsulados a una o más células objetivo, se realizó un estudio de respuesta a la dosis en ratones de tipo salvaje (CD-1) que posteriormente se monitorizaron para la producción de proteína GLA humana.

40 Los estudios anteriores se realizaron usando ratones CD-1 macho o hembra de aproximadamente 6-8 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Las muestras se introdujeron durante un período de una semana en el día 1 y de nuevo en el día 5 mediante una inyección de bolo único en la vena de la cola. Las concentraciones en suero de proteína GLA se determinaron a las seis horas, veinticuatro horas, cuarenta y ocho horas y setenta y dos horas después de la administración de la segunda dosis intravenosa. Los ratones se sacrificaron setenta y dos horas después de la administración de la segunda dosis intravenosa en el día ocho y los órganos se perfundieron con solución salina. Se recogieron el hígado, el bazo y, cuando es aplicable, el cerebro de cada ratón, se repartieron en dos partes y o se almacenaron en formalina tamponada neutral al 10% o se congelaron al instante y se almacenaron a 80° C.

50 Como se ilustra en la FIG. 1, después de la inyección intravenosa de dos dosis de 10 µg, 20 µg, 30 µg, 60 µg o 90 µg de ARNm de GLA cargado en las nanopartículas lipídicas a base de HGT5000, se pudo detectar un nivel sustancial de proteína GLA humana en suero de ratón en el plazo de 6 horas. Además, se pudieron observar niveles detectables de proteína GLA en el suero 48 horas después de la administración intravenosa de la segunda dosis individual. Como se ilustra en la FIG. 2, los niveles de nanogramos de proteína GLA humana también fueron detectables en órganos seleccionados de los ratones, como el hígado, el riñón y el bazo, 72 horas después de la administración de la segunda inyección de bolo de la vena de la cola del ARNm de GLA.

55 También se realizaron estudios adicionales que evaluaban las nanopartículas lipídicas a base de HGT5000 que encapsulaban ARNm de GLA humano y preparadas de acuerdo con el Ejemplo 4 anterior usando un modelo murino de enfermedad de Fabry. Las muestras se introdujeron mediante una dosis de bolo único de 90 µg (en base al GLA encapsulado) de la nanopartícula lipídica cargada con GLA mediante una inyección en la vena de la cola. Se detectaron niveles suprafisiológicos de proteína GLA (aproximadamente 50 veces mayor) en el suero 24 horas después de la administración de la única dosis de 90µg de GLA. Como se ilustra en la FIG. 3 y la FIG. 4, la proteína GLA humana fue detectable en el suero y en órganos seleccionados de los ratones Fabry después de la administración de una inyección de bolo en la vena de la cola de la nanopartícula lipídica a base de HGT5000 que encapsula ARNm de GLA. En particular, la proteína GLA humana se detectó en el suero de los ratones Fabry después de la administración de nanopartículas lipídicas a base de HGT5000 cargadas con ARNm de GLA durante un período de tiempo de 72 horas. Los niveles de proteína GLA humana también fueron detectables en órganos de

ratón Fabry seleccionados después de la administración de nanopartículas lipídicas a base de HGT5000 cargadas con ARNm de GLA tanto a las 24 horas como a las 72 horas posteriores a la administración.

Ejemplo 8

Para determinar si las nanopartículas lipídicas a base de HGT5001 que encapsulan ARNm de GLA humano y preparadas de acuerdo con el Ejemplo 5 anterior fueron capaces de administrar constructos de polinucleótidos encapsulados a una o más células objetivo, se realizó un estudio de respuesta a la dosis en ratones de tipo salvaje (CD-1) que posteriormente se monitorizaron para la producción de proteína GLA humana.

Los estudios anteriores se realizaron usando ratones CD-1 macho o hembra de aproximadamente 6-8 semanas de edad al comienzo de cada experimento. Las muestras se introdujeron mediante una única inyección de bollo en la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron en los puntos temporales designados y los órganos se perfundieron con solución salina. Se recogieron el hígado, el bazo y, cuando es aplicable, el cerebro de cada ratón, se repartieron en dos partes y se almacenaron en formalina tamponada neutra al 10% o se congelaron al instante y se almacenaron a -80° C.

La dosis individual de 30 µg de las nanopartículas de lípidos cargadas con ARNm de GLA a base de HGT50001 se administraron a los ratones de tipo salvaje, y como se ilustra en la FIG. 5, se detectó la proteína GLA humana en suero a las 6 horas después de la administración a concentraciones que excedieron los niveles fisiológicos normales en 100 veces. Como también se representa en la FIG. 5, veinticuatro horas después de la administración de las nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de GLA a base de HGT5001 a los ratones de tipo salvaje, la proteína GLA humana permaneció detectable a concentraciones que excedían las concentraciones fisiológicas normales en 30 veces más. Además, como se muestra en la FIG. 6, se pudieron detectar concentraciones sustanciales de proteína GLA humana en el hígado, riñón y bazo de los ratones de tipo salvaje después del tratamiento veinticuatro horas después de la administración de las nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de GLA a base de HGT5001.

Ejemplo 9

El presente estudio se realizó para demostrar aún más la capacidad de las nanopartículas lipídicas a base de HGT5000 como a base de HGT5001 para administrar ARNm de eritropoyetina humana (EPO) encapsulada a una o más células objetivo en ratas Sprague Dawley de tipo salvaje. Las nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de EPO a base de HGT5000 y HGT50001 se prepararon de acuerdo con los protocolos establecidos en los ejemplos anteriores. Las muestras se administraron mediante una única inyección de bolo en la vena de la cola. La concentración de proteína EPO secretada en el torrente sanguíneo se monitorizó durante un período de veinticuatro horas, obteniéndose muestras de suero a las seis, doce, dieciocho y veinticuatro horas después de la administración.

La proteína EPO humana se detectó en el suero de rata Sprague-Dawley después de la administración de nanopartículas lipídicas a base de HGT5000 y HGT5001 cargadas con ARNm de EPO durante un período de veinticuatro horas. Como se muestra en la FIG. 7, tanto las nanopartículas lipídicas a base de HGT5000 como a base de HGT5001 dieron como resultado una producción eficaz de proteínas en las ratas Sprague Dawley de tipo salvaje. Se detectaron niveles significativos de proteína EPO humana en el transcurso de este estudio para los sistemas de nanopartículas a base de HGT5000 y HGT5001. Por consiguiente, el presente ejemplo ilustra que tanto las nanopartículas lipídicas a base de HGT5000 como de HGT5001 proporcionan medios altamente eficaces para administrar constructos de polinucleótidos a una o más células objetivo y que después de la expresión de tales nanopartículas lipídicas a tales células objetivo, la proteína expresada codificada por el ARNm encapsulado era detectable en suero.

Análisis

Los estudios anteriores ilustran que los compuestos lipídicos divulgados en la presente son útiles como vehículos de administración de liposomas o como componentes de vehículos de administración de liposomas. En particular, tales compuestos y composiciones facilitan la administración de polinucleótidos encapsulados (por ejemplo, polinucleótidos de ARNm que codifican proteínas o enzimas funcionales) a una o más células, tejidos y órganos objetivo, haciendo que tales células expresen el polinucleótido encapsulado. Por ejemplo, después de una única inyección intravenosa de una dosis dada de un polinucleótido de ARNm encapsulado en una nanopartícula lipídica a base de HGT5000, se detectó una concentración sustancial de la proteína codificada tanto en suero como en uno o más órganos objetivo de los presentes ratones. Además, como es evidente por el Ejemplo 8, en muchos casos, la concentración de proteína expresada excedió las concentraciones necesarias para la eficacia terapéutica, lo que sugiere que solo una fracción de la dosis administrada de las composiciones es necesaria para lograr concentraciones terapéuticamente eficaces dentro del plasma, órgano, tejido o células objetivo. Como resultado, la cantidad total administrada de lípido catiónico que es necesaria para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del agente encapsulado puede reducirse, dando como resultado una reducción correspondiente en la

toxicidad de las composiciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Shire Human Genetic Therapies Inc.
DeRosa, Frank
Guild, Braydon C.
Heartlein, Michael

10 <120> Lípidos Catiónicos Ionizables

<130> 2006685-0286

15 <150> 61/617,468

<151> 2012-03-29

<160> 4

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1309

<212> ARN

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 762 873 T3

	gggauccuac caugcagcug aggaacccag aacuacaucu gggcugcgcg cuugcgcuuc	60
	gcuuccuggc ccucguuucc ugggacaucc cuggggcuag agcacuggac aauggauugg	120
5	caaggacgcc uaccaugggc uggcugcacu gggagcgcuu caugugcaac cuugacugcc	180
	aggaagagcc agauuccugc aucagugaga agcucuucan ggagauggca gagcucaugg	240
10	ucucagaagg cuggaaggau gcagguuau aguaccucug cauugaugac uguuggaugg	300
	cuccccaaag agauucagaa ggcagacuuc aggcagaccc ucagcgcuu ccucauggga	360
15	uucgccagcu agcuauuuau guucacagca aaggacugaa gcuagggau uaugcagaug	420
	uuggaaaaua aaccugcgca ggcuucccug ggaguuuugg auacuacgac auugaugccc	480
	agaccuuugc ugacugggga guagaucugc uaaaauuuga ugguuuguac ugugacaguu	540
20	uggaaaauuu ggcagauggu uauaagcaca uguccuuggc ccugaauagg acuggcagaa	600
	gcuuugugua cuccugugag uggccucuuu auauguggcc cuuucaaaag cccaauuaa	660
25	cagaaaucgg acaguacugc aaucacuggc gaaauuuugc ugacauugau gauuccugga	720
	aaaguauaaa gaguaucuu gacuggacau cuuuuaacca ggagagaauu guugauguug	780
	cuggaccagg ggguuuggau gaccagaua uguuagugau uggcaacuuu ggccucagcu	840
30	ggauucagca aguaacucag auggcccucu gggcuaucau ggcugcuccu uuauucaugu	900
	cuaaugaccu ccgacacauc agcccucaag ccaaagcucu ccuucaggau aaggacguaa	960
35	uugccaucua ucaggacccc uugggcaagc aaggguaacca gcuuagacag ggagacaacu	1020
	uugaagugug ggaacgaccu cucucaggcu uagccugggc uguagcuau auaaacggc	1080
40	aggagauugg uggaccucgc ucuuauacca ucgcaguugc uucccugggu aaaggagugg	1140
	ccuguaaucc ugccugcuuc aucacacagc uccucccugu gaaaaggaag cuaggguucu	1200
	augaauggac uucaaggua agaagucaca uaaaucccac aggcacuguu uugcuucagc	1260
45	uagaaaauac aaugcagaug ucauuaaaag acuuacuuua auuugaauu	1309

50 <210> 2
 <211> 11
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

55 <400> 2
 gggauccuac c 11

60 <210> 3
 <211> 8
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

65 <400> 3
 uuugaauu 8

<210> 4
 <211> 1309

ES 2 762 873 T3

<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 4

5
 gggauccuac caugcagcug aggaacccag aacuacaucu gggcugcgcg cuugcgcuuc 60
 gcuuccuggc ccucguuucc ugggacaucc cuggggcuag agcacuggac aauggauugg 120
 10 caaggacgcc uaccaugggc uggcugcacu gggagcgcuu caugugcaac cuugacugcc 180
 aggaagagcc agauuccugc aucagugaga agcucuucan ggagauggca gagcucaugg 240
 15 ucucagaagg cuggaaggau gcagguuaug aguaccucug cauugaugac uguuggaugg 300
 cuccccaaag agauucagaa ggcagacuuc aggcagaccc ucagcgcuu ccucauggga 360
 uucgccagcu agcuaauuau guucacagca aaggacugaa gcuagggauu uaugcagaug 420
 20 uuggaaaua aaccugcgca ggcuucccug ggaguuuugg auacuacgac auugaugccc 480
 agaccuuugc ugacugggga guagaucugc uaaaauuuga ugguuuguac ugugacaguu 540
 25 uggaaaauu ggcagauggu uauaagcaca uguccuuggc ccugaauagg acuggcagaa 600
 gcauugugua cuccugugag uggccucuuu auauguggcc cuuucaaaag cccaauuaa 660
 30 cagaaaucg acaguacugc aaucacuggc gaaauuuugc ugacauugau gauuccugga 720
 aaaguauaaa gaguaucuug gacuggacau cuuuuaacca ggagagaauu guugauguug 780
 cuggaccagg ggguuuggau gaccagaua uguuagugau uggcaacuuu ggccucagcu 840
 35 ggaucagca aguaacucag auggccucu gggcuaucau ggcugcuccu uuauucaugu 900
 cuaaugaccu ccgacacauc agcccucaag ccaaagcucu ccuucaggau aaggacguaa 960
 40 uugccaauca ucaggacccc uggggcaagc aaggguaacca gcuuagacag ggagacaacu 1020
 uugaagugug ggaacgaccu cucucaggcu uagccugggc uguagcuau auaaacccggc 1080
 45 aggagauugg uggaccucgc ucuuauacca ucgcaguugc uucccugggu aaaggagugg 1140
 ccuguaaucc ugccugcuuc aucacacagc uccucccugu gaaaaggaag cuaggguuuc 1200
 augauggac uucaagguua agaagucaca uaaaucccac aggcacuguu uugcuucagc 1260
 50 uagaaaauac aaugcagaug ucauuaaaag acuuacuuua auuugaau 1309

55

60

65

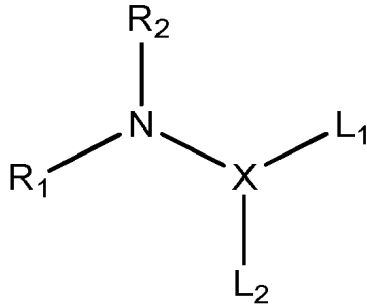
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura:

5

10

15



20

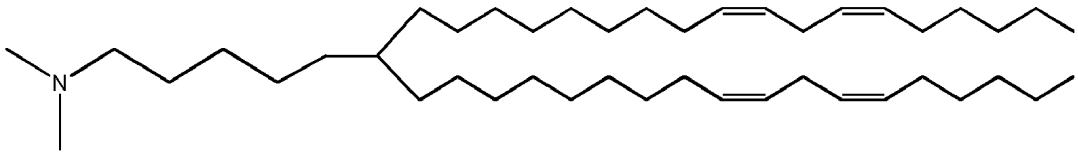
en la que R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste de un alquilo C_1-C_{20} variablemente saturado o insaturado y un acilo C_6-C_{20} variablemente saturado o insaturado; en la que L_1 y L_2 son cada uno un alquenilo C_{18} no sustituido, poliinsaturado; y en donde x se selecciona del grupo que consiste de un alquilo C_5-C_{20} y un alquenilo C_1-C_{20} variablemente insaturado.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene una de las siguientes estructuras:

25

(a)

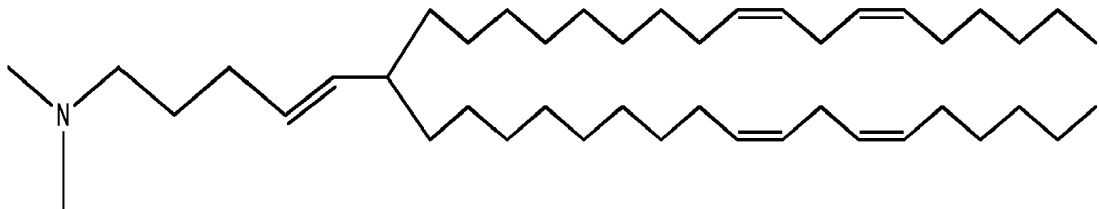
30



35

o
(b)

40



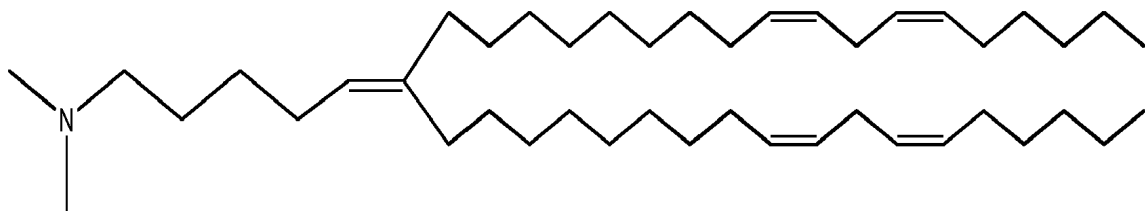
45

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene una de las siguientes estructuras:

50

(a)

55

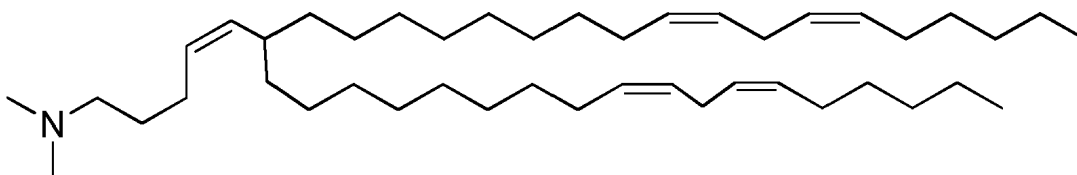


60

o
(b)

65

5



10

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:

- (a) R_1 y R_2 son cada uno metilo, o
- (b) L_1 y L_2 son cada uno octadeca-9,12-dieno.

15

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde:

- (a) x es un alqueno C_6 , hexano, hex-1-eno o hex-2-eno, o
- (b) x no es hexano, o
- (c) R_1 y R_2 son cada uno metilo; en donde L_1 y L_2 son cada uno octadeca-9,12-dieno; y en donde x es hexano, hex-1-eno o hex-2-eno.

20

6. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5.

25

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde la composición farmacéutica es una nanopartícula lipídica.

8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la reivindicación 2.

30

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en donde la composición farmacéutica es una nanopartícula lipídica.

35

10. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende además:

- (a) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste de un lípido catiónico, un lípido modificado con PEG, un lípido no catiónico y un lípido auxiliar, o
- (b) uno o más polinucleótidos, opcionalmente en donde:

40

- (i) el uno o más polinucleótidos comprende una modificación química, o
- (ii) el uno o más polinucleótidos comprende uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA), o
- (iii) el uno o más polinucleótidos se seleccionan del grupo que consiste de ADN, ARN, oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNm, ARNnp, ARNsno, ARNm y combinaciones de los mismos, o
- (iv) el uno o más polinucleótidos comprenden ARNm, opcionalmente en donde el ARNm codifica una enzima o una proteína, y opcionalmente en donde el ARNm codifica la proteína o enzima seleccionada del grupo que consiste de hormona de crecimiento humana, eritropoyetina, α 1-antitripsina, alfa glucosidasa ácida, arilsulfatasa A, carboxipeptidasa N, α -galactosidasa A, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, iduronato sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilglucosamina 4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparan sulfamidasa, heparina-N-sulfatasa, lipasa ácida lisosomal, hialuronidasa, galactocerebrosidasa, ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL), arginasa 1 (ARG1), regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), neurona motora de supervivencia (SMN), Factor VIII, Factor IX y receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR).

55

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en donde la nanopartícula lipídica es sustancialmente no tóxica cuando se administra a un sujeto.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, que comprende además:

60

- (a) uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste de un lípido catiónico, un lípido neutro, un lípido modificado con PEG, un lípido no catiónico y un lípido auxiliar, o
- (b) C14-DMG-PEG2000, DOPE y colesterol, o
- (c) uno o más agentes terapéuticos, opcionalmente en donde el agente terapéutico es un polinucleótido.

65

13. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 6 u 8 para su uso en terapia.

14. La composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 13, en donde la terapia comprende poner en contacto una o más células objetivo con la composición farmacéutica de las reivindicaciones 6 u 8 de tal manera que la una o más células objetivo se transfectan con el polinucleótido.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

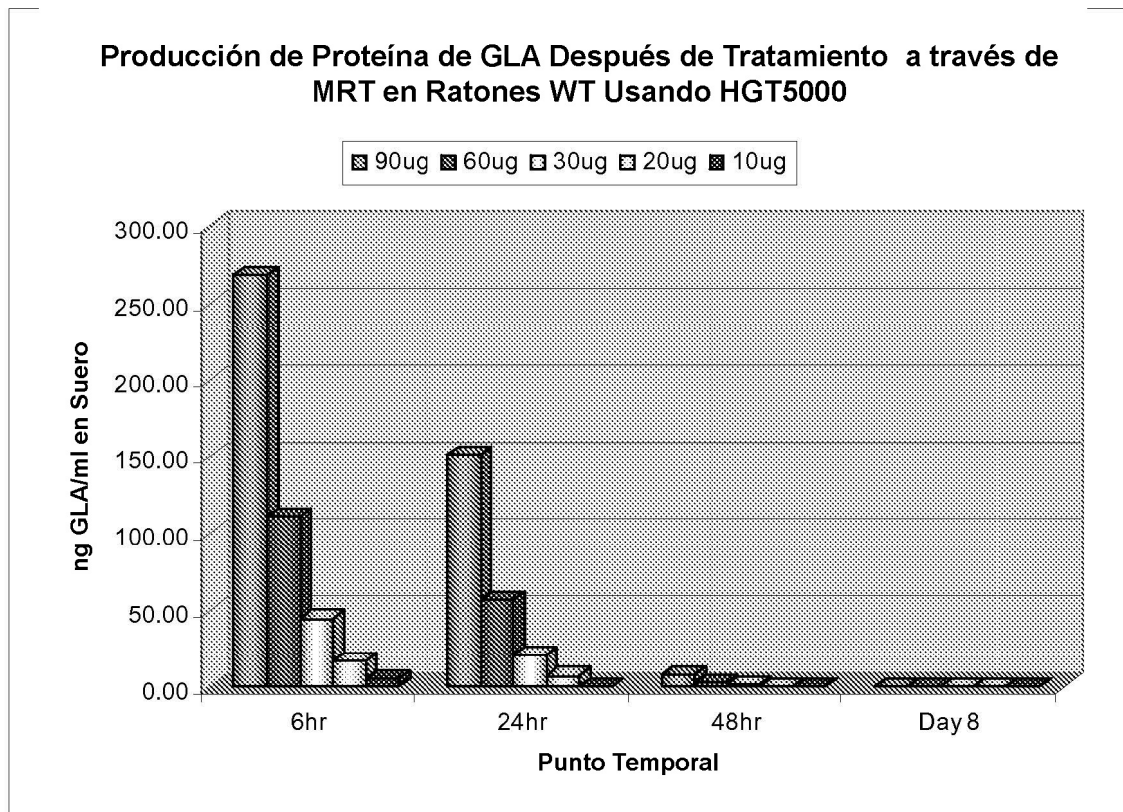


FIG. 1

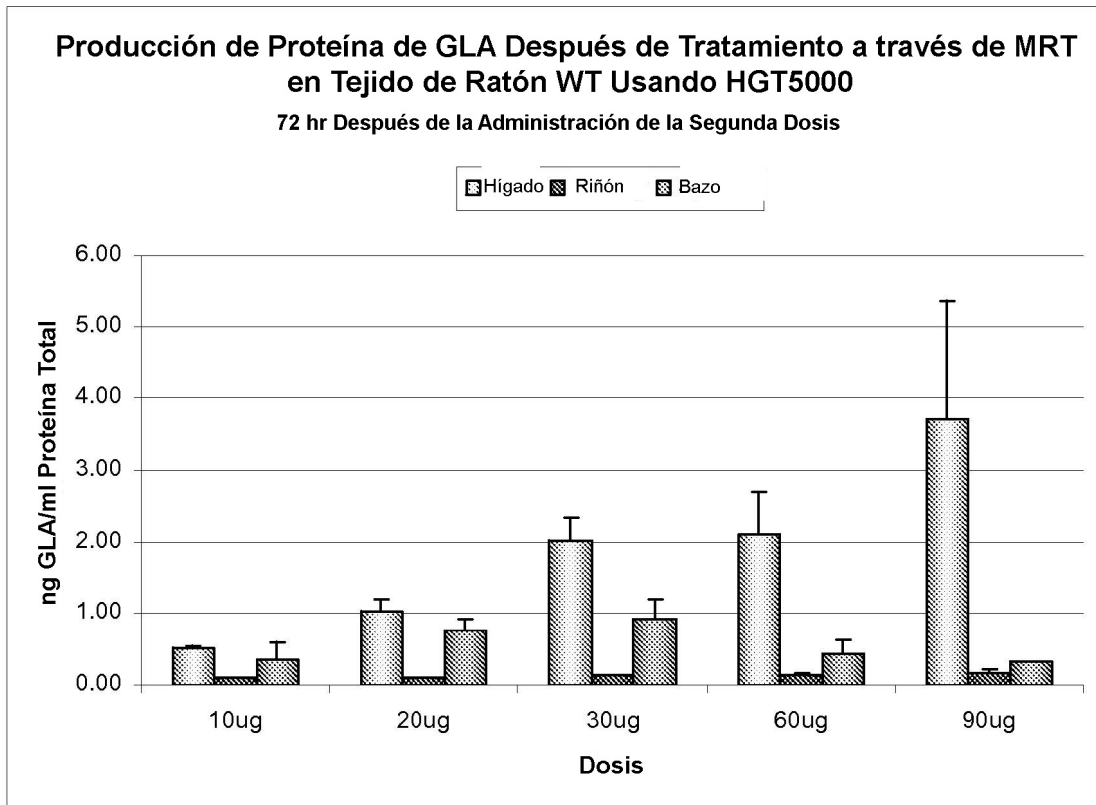


FIG. 2

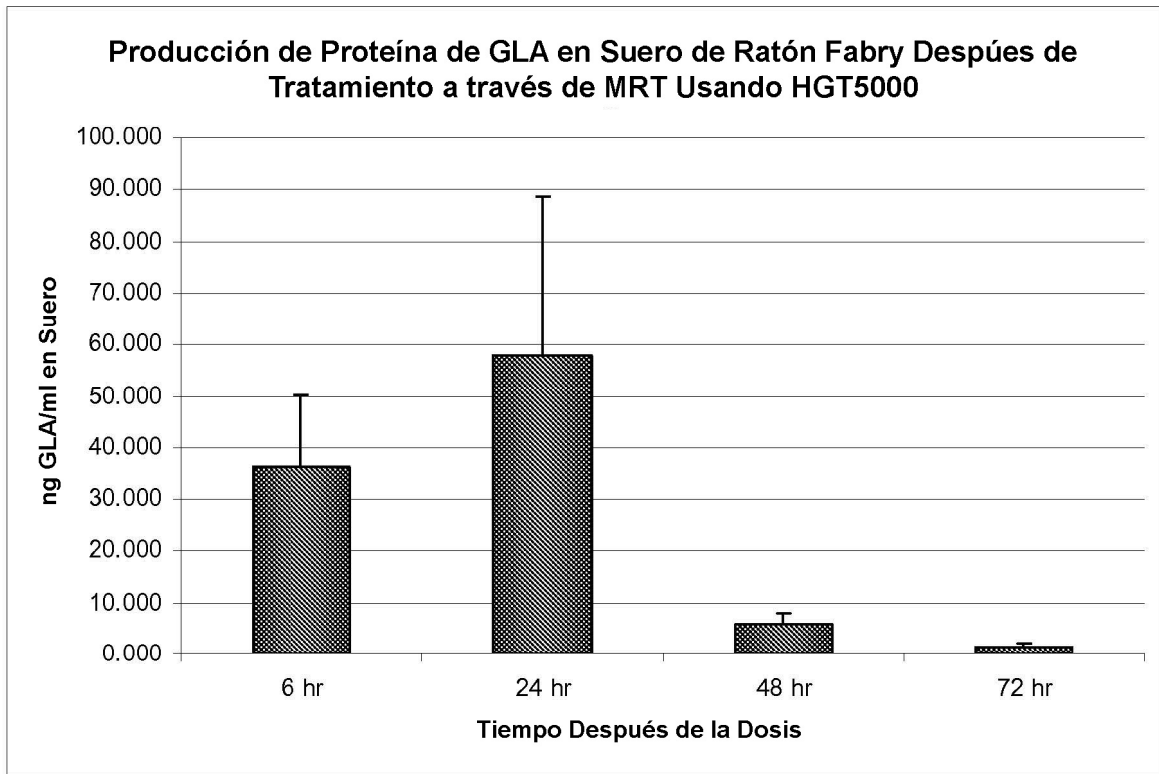


FIG. 3

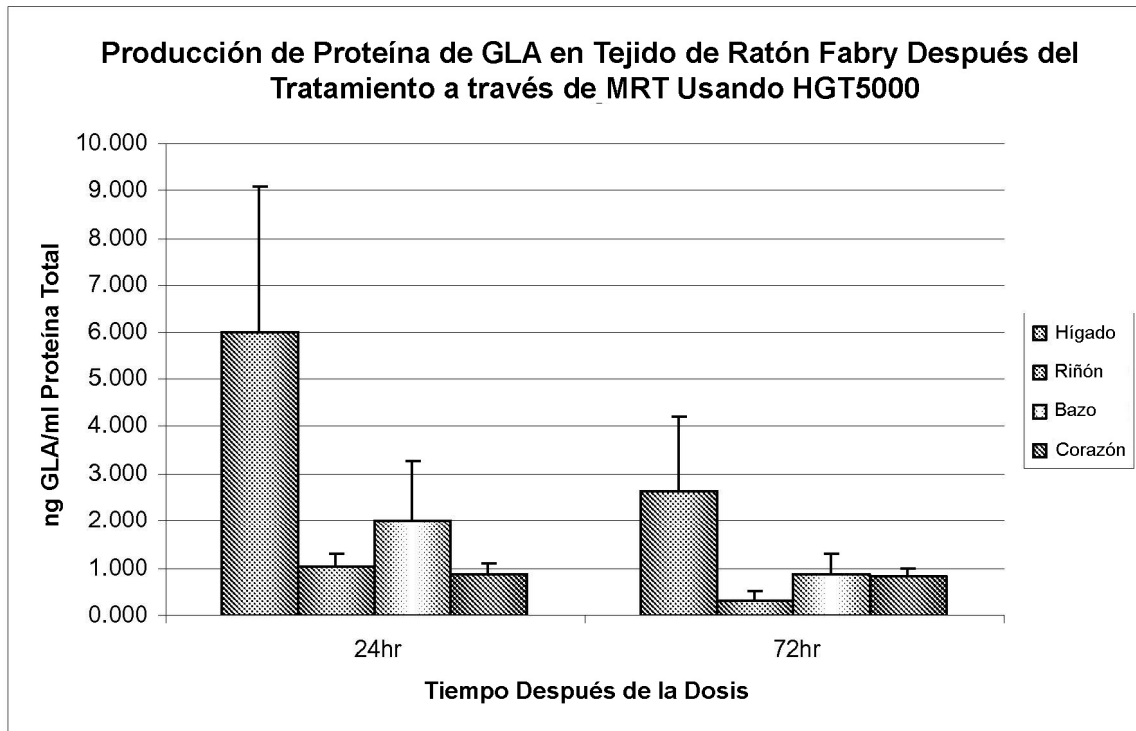


FIG. 4

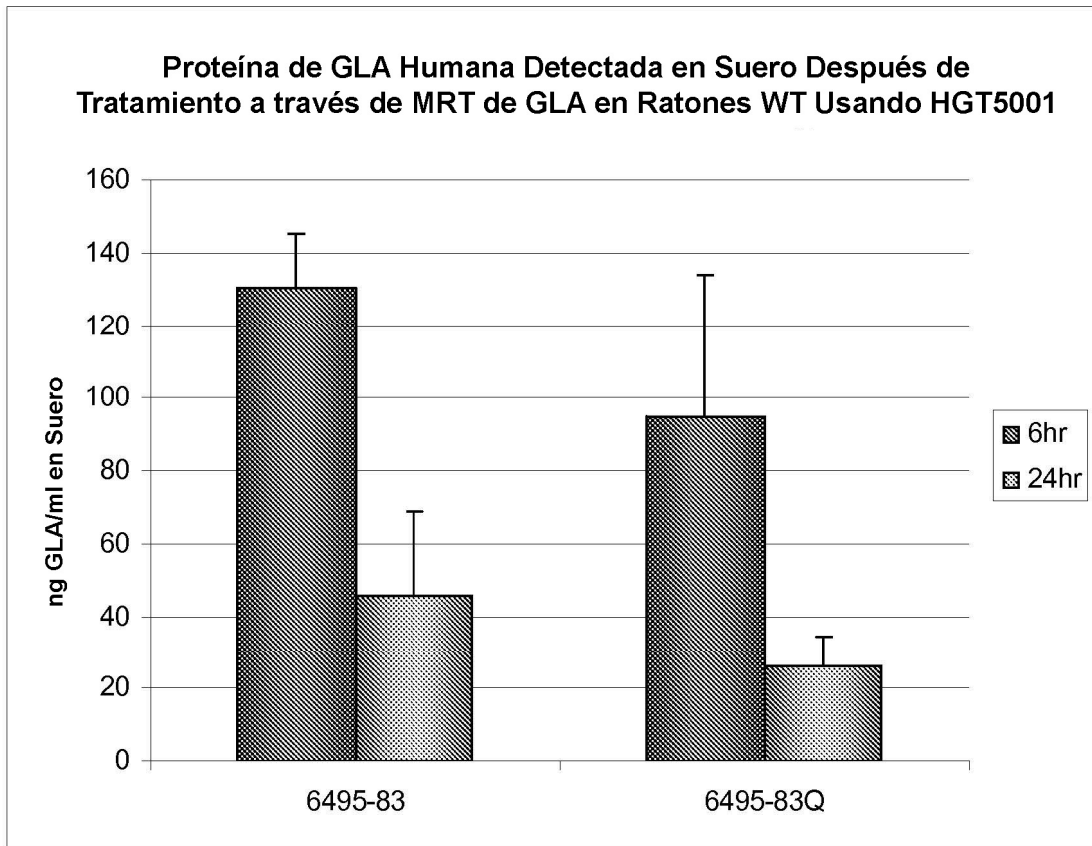


FIG. 5

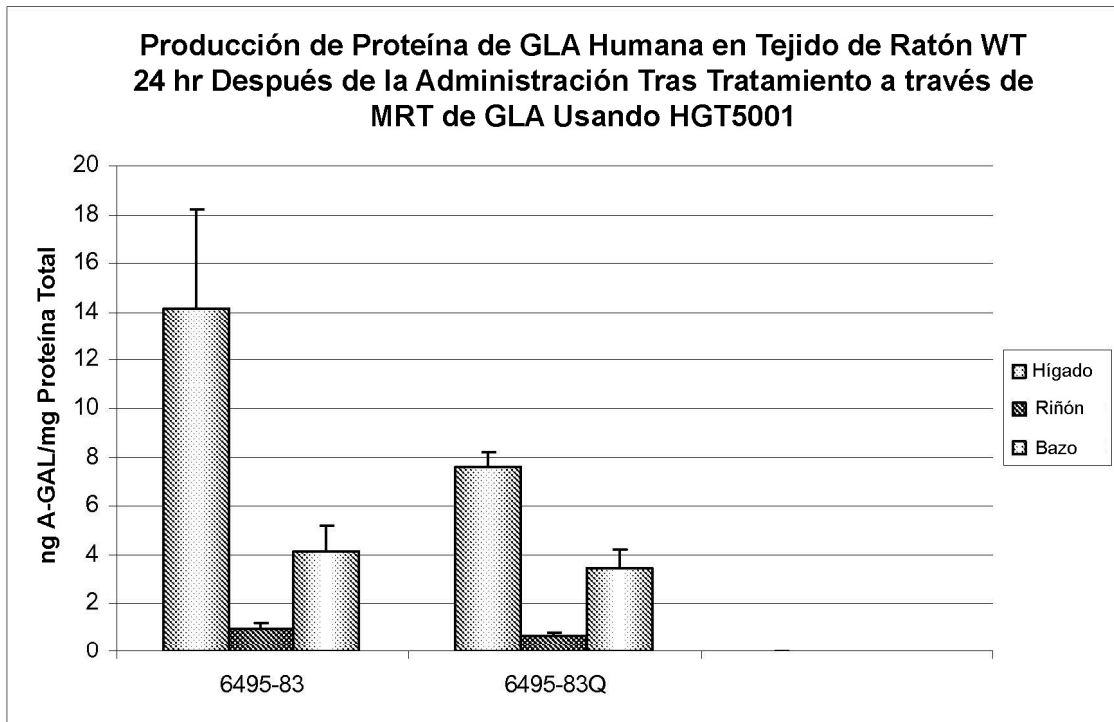


FIG. 6

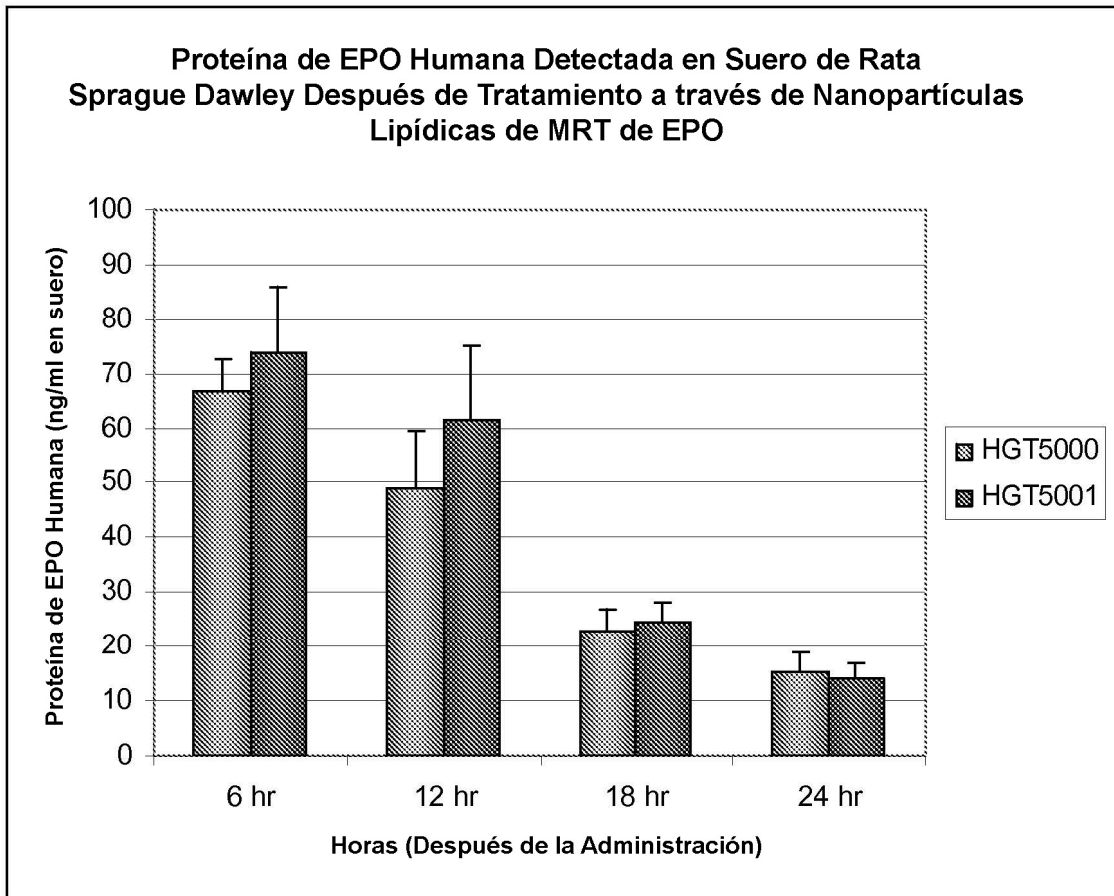


FIG. 7