

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 110**

51 Int. Cl.:

**C07D 233/64** (2006.01)

**C07C 323/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 31/4164** (2006.01)

**A61K 47/60** (2007.01)

**A61K 47/69** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 18153312 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3336082**

54 Título: **Lípidos escindibles**

30 Prioridad:

**08.06.2011 US 201161494882 P**

**08.06.2011 US 201161494745 P**

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

**20.11.2020**

73 Titular/es:

**TRANSLATE BIO, INC. (100.0%)**

**29 Hartwell Avenue**

**Lexington, MA 02421 , US**

72 Inventor/es:

**HEARTLEIN, MICHAEL;**

**GUILD, BRAYDON, CHARLES;**

**DEROSA, FRANK y**

**ZHANG, JERRY, CHI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 795 110 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Lípidos escindibles

5 La administración liposómica de ácidos nucleicos se ha empleado para la administración específica de sitio de ADN de plásmido encapsulado, oligonucleótidos antisentido, ARN corto de interferencia y terapias basadas en microARN. Sin embargo, la administración eficiente de ácidos nucleicos a las células y tejidos diana, así como la posterior transfección de tales células y tejidos diana 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 diana, todavía existen muchos problemas en aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, un inconveniente significativo de los sistemas de administración liposomales se refiere a la construcción de liposomas que tienen suficiente cultivo celular o *in vivo* estabilidad para alcanzar las células diana y/o compartimentos intracelulares deseados, y la capacidad de tales sistemas de liberación liposómica para liberar de manera eficiente sus materiales encapsulados a tales células diana. Además, muchos de los lípidos catiónicos que se emplean para construir dichos vehículos basados en liposomas son generalmente tóxicos para las células diana, y, por consiguiente, pueden ser de uso limitado, particularmente en cantidades necesarias para administrar con éxito materiales encapsulados a tales células diana.

20 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 diana, los vehículos basados en liposomas se consideran un vehículo atractivo para agentes terapéuticos y permanecen sujetos a esfuerzos de desarrollo continuados. Aunque los vehículos basados en 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 mejora de los sistemas de administración basados en liposomas. En particular, sigue existiendo la necesidad de catiónicos y lípidos mejorados que sean capaces de administrar macromoléculas tales como ácidos nucleicos a una amplia variedad de tipos de células y tejidos con una eficacia mejorada. También sigue existiendo una necesidad particular de nuevos lípidos que incorporen un enfoque multifuncional para administrar ácidos nucleicos y polinucleótidos encapsulados.

30 La WO2010/054401 sugiere la liofilización de preparaciones farmacéuticas que comprenden partículas de ácidos nucleicos lipídicos Chen et al., (210), J Control Release, 142(3), 229-311 analiza los parámetros de formulación par la liofilización de liposomas.

35 La invención proporciona un método para preparar una nanopartícula lipídica liofilizada, dicho método comprendiendo:

- 40 (a) proporcionar una nanopartícula lipídica en una solución acuosa que comprende uno o más lioprotectores seleccionados del grupo que consiste de sacarosa, trehalosa, dextrano e inulina, en donde la nanopartícula lipídica es un liposoma que encapsula un ARNm y comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido PEG-modificado y colesterol; y  
 (b) liofilizar la nanopartícula lipídica realizando los pasos de congelar y secar rápidamente la nanopartícula lipídica a las condiciones de temperatura y vacío proporcionadas en las Tablas 1, 3, 7 u 8;

45 en donde tras la reconstitución las nanopartículas lipídicas tienen un tamaño de partícula medio de menos de 125 nm en una solución PBS.

50 La invención también proporciona una composición farmacéutica estable que comprende una nanopartícula lipídica liofilizada, en donde la nanopartícula lipídica es un liposoma que encapsula un ARNm y comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido PEG-modificado y colesterol, en donde la composición farmacéutica estable comprende además uno o más lioprotectores, en donde el uno o más lioprotectores se seleccionan del grupo que consiste de sacarosa, trehalosa, dextrano e inulina y en donde tras la reconstitución las nanopartículas lipídicas tienen un tamaño de partícula medio de menos de 125 nm en una solución PBS, en donde la composición farmacéutica estable se puede obtener por el método anterior.

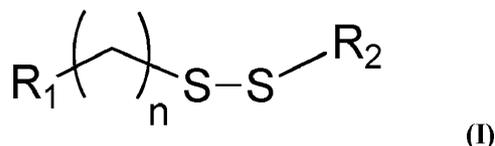
55 La divulgación proporciona compuestos novedosos, composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos y métodos relacionados de su uso. En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento son útiles como composiciones liposómicas, o como componentes de composiciones liposómicas, para facilitar la administración y la posterior transfección de una o más células diana. En ciertas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento son lípidos catiónicos y/o ionizables. En algunas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento se han diseñado en base a las características o propiedades deseadas, por ejemplo para mejorar la eficacia de la transfección o para promover resultados biológicos específicos. Además, en ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento 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 diana. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento se caracterizan por tener una o más propiedades fusogénicas, endosómicas o

lisosomales de alteración y/o liberación que proporcionan ventajas a dichos compuestos con respecto a otros lípidos clasificados de forma similar.

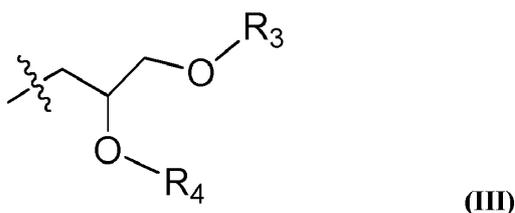
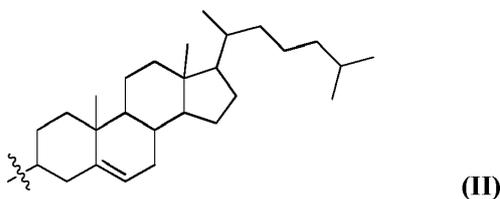
Los compuestos divulgados en el presente documento comprenden generalmente uno o más grupos funcionales escindibles (por ejemplo, escindibles enzimáticamente o mediante reducción, oxidación o hidrólisis) a los que están unidos (por ejemplo, unidos covalentemente) dos o más grupos o restos funcionales (por ejemplo, un grupo R<sub>1</sub> hidrofóbico y un grupo R<sub>2</sub> hidrófilo). Por ejemplo, en el presente documento también se divulgan compuestos que comprenden un grupo funcional disulfuro escindible (S-S). También se contemplan compuestos que comprenden cualquier grupo funcional que pueda escindirse, por ejemplo tras exposición a condiciones biológicas, y que, para los fines del presente documento, tales grupos puedan incluir, aunque sin limitación, ésteres y éteres. En ciertas realizaciones, los dos o más grupos funcionales (por ejemplo, un grupo de cabeza y un grupo de cola) que comprenden los compuestos hacen que dichos compuestos sean anfifílicos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, al menos uno de los grupos funcionales es un grupo de cola no polar, lipófilo o hidrófobo (por ejemplo, un lípido natural tal como colesterol o alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>). En ciertas realizaciones, al menos uno de los grupos funcionales es un grupo de cabeza polar o hidrófilo (por ejemplo, imidazol).

En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento (por ejemplo, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y/o HGT4005) son lípidos catiónicos o ionizables que pueden usarse como componente de una composición liposómica para facilitar o mejorar la administración y liberación de materiales encapsulados. (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos) a una o más células diana (por ejemplo, atravesando o fusionándose con las membranas lipídicas de tales células diana). En ciertas realizaciones, uno o más grupos funcionales escindibles (por ejemplo, un disulfuro) que comprenden tales compuestos permiten, por ejemplo, que un grupo de cabeza funcional hidrófilo se disocie (por ejemplo, tras la exposición a condiciones oxidativas, reductoras o ácidas) de un grupo de cola funcional lipofílico del compuesto, facilitando de esta manera una transición de fase en la bicapa lipídica de la una o más células diana. Por ejemplo, cuando una composición liposómica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) comprende uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento, la transición de fase en la bicapa lipídica de la una o más células diana facilita la administración de los materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos terapéuticos encapsulados en una nanopartícula lipídica) en la una o más células diana. De manera similar, enriquecer composiciones liposómicas con uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento puede mejorar la fusogenicidad de tales composiciones liposómicas, mejorando de ese modo la capacidad de tales compuestos para administrar materiales (por ejemplo, polinucleótidos) encapsulados en su interior intracelularmente.

En ciertas realizaciones, los compuestos tienen la estructura de fórmula (I),



en la que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, un alquilamino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquilamino tal como dimetilamino) y piridilo; en la que R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en la fórmula II y la fórmula III;



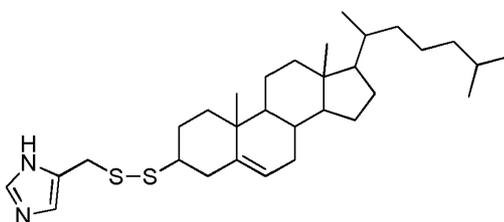
en la que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> saturado o insaturado de forma variable opcionalmente sustituido y un acilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> saturado o insaturado de forma variable

opcionalmente sustituido ; y en la que n es cero o cualquier número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En ciertas realizaciones, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno un alquilo C<sub>18</sub> poliinsaturado opcionalmente sustituido mientras que en otras realizaciones R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno es un alquilo C<sub>18</sub> poliinsaturado no sustituido. En ciertas realizaciones, uno o más de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieno.

También se divulgan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de fórmula I, en la que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, un alquilamino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquilamino tal como dimetilamino) y piridilo; en la que R<sub>2</sub> es de fórmula II; y en la que n es cero o cualquier número entero positivo. En el presente documento se divulgan adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de fórmula I, en la que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, un alquilamino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquilamino tal como dimetilamino) y piridilo; en la que R<sub>2</sub> es fórmula III; en la que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en un alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> saturado o insaturado de forma variable opcionalmente sustituido y un acilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> saturado o insaturado de forma variable opcionalmente sustituido; y en la que n es cero o cualquier número entero positivo. En ciertas realizaciones, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno un alquilo C<sub>18</sub> poliinsaturado opcionalmente sustituido, mientras que en otras realizaciones R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno un alquilo C<sub>18</sub> poliinsaturado no sustituido (por ejemplo, octadeca-9, 12-dieno).

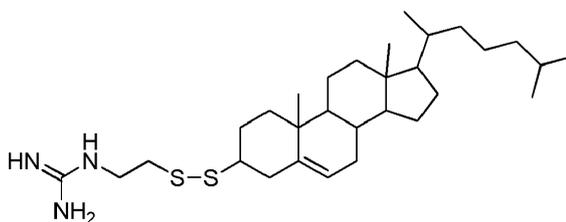
En ciertas realizaciones, el grupo R<sub>1</sub> o grupo de cabeza es un grupo polar o hidrofílico (por ejemplo, uno o más de los grupos imidazol, guanidinio y amino) y está unido al grupo lipídico R<sub>2</sub> por medio del grupo enlazador escindible con disulfuro (S-S), por ejemplo como se representa en la fórmula I. Otros grupos enlazadores escindibles contemplados pueden incluir composiciones que comprenden uno o más grupos enlazadores disulfuro (S-S) unidos (por ejemplo, unidos covalentemente) a por ejemplo, un grupo alquilo (por ejemplo, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>). En ciertas realizaciones, el grupo R<sub>1</sub> está unido covalentemente al grupo enlazador escindible por medio de un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> (por ejemplo, cuando n es de uno a veinte), o, como alternativa, puede estar directamente unido al grupo enlazador escindible (por ejemplo, cuando n es cero). En ciertas realizaciones, el grupo enlazador disulfuro es escindible *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, escindible enzimáticamente o escindible tras la exposición a condiciones ácidas o reductoras).

En ciertas realizaciones, la divulgación se refiere al compuesto 5-(((10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenanten-3-il)disulfanil)metil)-1H-imidazol, que tiene la estructura de fórmula IV (denominada en el presente documento "HGT4001").



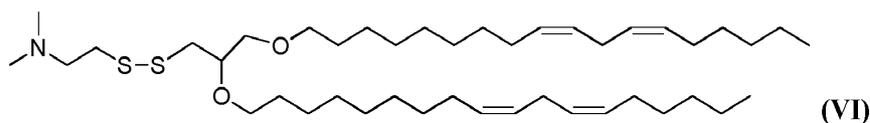
(IV)

En ciertas realizaciones, la divulgación se refiere al compuesto 1-(2-(((3S,10R,13R)-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]fenanten-3-il)disulfanil)etil)guanidina, que tiene la estructura de fórmula V (denominada en el presente documento como "HGT4002").

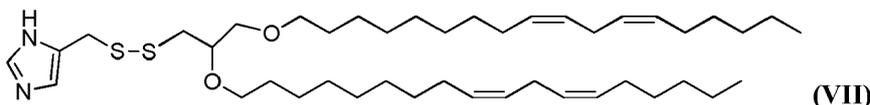


(V)

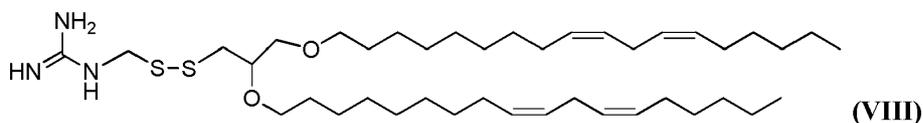
U En ciertas realizaciones, la divulgación se refiere al compuesto 2-((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)-N,N-dimetiletanamina, que tiene la estructura de fórmula VI (denominada en el presente documento "HGT4003").



5 En otras realizaciones, la divulgación se refiere al compuesto 5-(((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)metil)-1H-imidazol que tiene la estructura de fórmula VII (denominada en el presente documento "HGT4004").



15 En otras realizaciones más, la divulgación se refiere al compuesto 1-(((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil) disulfanil)metil)guanidina que tiene la estructura de Fórmula VIII (denominada en el presente documento "HGT4005").



20 En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento son lípidos catiónicos y/o ionizables, que pueden usarse como una composición liposómica o, como alternativa, como un componente de una composición liposómica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica). En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento se usan para enriquecer una composición liposómica (por ejemplo, nanopartículas lipídicas), confiriendo de este modo propiedades mejoradas a dicha composición liposómica enriquecida (por ejemplo, administración mejorada de polinucleótidos encapsulados a una o más células diana y/o reducción toxicidad *in vivo* de una composición liposómica). Por consiguiente, también se contemplan composiciones farmacéuticas y, en particular, composiciones liposómicas, que comprenden uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden uno o más de un lípido modificado con PEG, un lípido no catiónico y colesterol. Por ejemplo, se contemplan composiciones farmacéuticas y liposómicas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) que comprenden uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento (por ejemplo, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y/o HGT4005) y uno o más lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos, un lípido auxiliar/colesterol y componentes lipídicos modificados con PEG. También se contemplan composiciones farmacéuticas y liposómicas que comprenden uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento y que además comprenden uno o más lípidos catiónicos adicionales. De manera similar, también se contemplan composiciones liposómicas y composiciones farmacéuticas (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) que comprenden uno o más de los compuestos HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y/o HGT4005 y uno o más de C12-200, DLinDMA, DLinKC2-DMA., CHOL, DOPE, DMG-PEG-2000, ICE, DSPC, DODAP, DOTAP y C8-PEG-2000. La composición farmacéutica encapsula ARNm.

45 Las nanopartículas lipídicas que comprenden o están enriquecidas de otro modo con uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento pueden comprender además uno o más de DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamoniopropano), DODAP (1,2-dioleil-3)-dimetilamoniopropano), 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 HGT4001, DOPE y DMG-PEG2000. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una nanopartícula lipídica que comprende HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000.

55 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente comprenden uno o más lípidos modificados con PEG. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden o están enriquecidas de otro modo con uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento pueden comprender además uno o más lípidos modificados con PEG que comprenden una cadena de poli(etilen)glicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido que comprende uno o más alquilos C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>.

60 Los polinucleótidos encapsulados en las composiciones de la presente comprenden ARNm que codifica, por ejemplo, un polipéptido, proteína o enzima funcional, y tras su expresión (es decir, una vez traducido) por una o más células diana, se produce un producto polipeptídico funcional (por ejemplo, una proteína o enzima) y, en algunos casos, secretado por la célula diana a la circulación periférica de un sujeto. En ciertas realizaciones, el uno o más de los polinucleótidos que comprenden (o están cargados o encapsulados de otra manera) los compuestos y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento codifican un polipéptido que se expresa de forma aberrante en el sujeto. En ciertas realizaciones, los uno o más ARNm encapsulados que comprenden tales compuestos y composiciones liposómicas o farmacéuticas (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) codifican una

enzima funcional, tal como 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, los uno o más ARNm encapsulados que codifican una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, el polinucleótido encapsulado es ARNm que codifica una o más de las

5 enzimas alfa galactosidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, beta-glucosidasa, galactocerebrosidasa y glucosidasa alfa ácido). En otras realizaciones tal ARNm puede codificar una o más proteínas o enzimas, por ejemplo, proteínas o enzimas que pueden ser deficientes en un sujeto (por ejemplo, una enzima o proteína seleccionada del grupo de enzimas que consiste en regulador de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística (CFTR), alfa-L-iduronidasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-

10 acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta -glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparan sulfamidasa y hialuronidasa).

También se contemplan en el presente documento composiciones farmacéuticas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) que comprenden uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento y uno o más polinucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido) y, en particular, polinucleótidos que comprenden una o más modificaciones químicas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones en las que el polinucleótido es ARNm, tales modificaciones químicas hacen que el ARNm sea más estable y puede comprender, por ejemplo, una modificación de bloqueo terminal 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 inmediato-temprano 1 del CMV (IE1) en la región no

15 traducida 5' del ARNm, tal como, por ejemplo, SEQ ID NO:1:

```

XCAGAUCCGCGGAGACGCCAUCCACGCUGUUUUGACCUCCAUAGAAGA
CACCGGGACCGAUCCAGCCUCCGCGGGCCGGGAACGGUGCAUUGGAACGC
20 GGAUCCCCGUGCCAAGAGUGACUCACCGUCCUUGACACG,

```

en donde X, si la presente es GGA (SEQ ID NO:1);

25 o una secuencia que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a LA SEQ ID NO: 1.

En otras realizaciones, la modificación química comprende la inclusión de una cola de poli A en la región no traducida 3' del ARNm. También se contemplan modificaciones químicas que comprenden la inclusión de una estructura Cap1 en la región no traducida 5' del ARNm. En otras realizaciones más, la modificación química

30 comprende la inclusión de una secuencia del gen de la hormona del crecimiento humano (hGH) en la región 3' no traducida del ARNm. La secuencia de hGH puede comprender, por ejemplo, SEQ ID NO:2

```

CGGGUGGCAUCCUGUGACCCCUCUCCAGUGCCUCUCCUGGCCUGGAA
35 GUUGCCACUCCAGUGCCCACCAGCCUUGUCCUAAUAAAUAAGUUGCA
UC (SEQ ID NO:2)

```

o una secuencia que es al menos 90 % o al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

40 Los compuestos y composiciones farmacéuticas divulgados en el presente documento se pueden formular para dirigirse y/o transfectar específicamente una o más células, tejidos y órganos diana. En ciertas realizaciones, dichos compuestos y composiciones farmacéuticas facilitan la transfección de tales células diana por uno o más mecanismos (por ejemplo, liberación basada en fusógeno y/o rotura mediada por esponja de protones de la membrana de bicapa lipídica de las células diana). Las células diana contempladas incluyen, por ejemplo, una o más

45 células seleccionadas del grupo que consiste en hepatocitos, células epiteliales, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células pulmonares, células óseas, células madre, células mesenquimatosas, células neuronales, células cardíacas, adipocitos, células musculares lisas vasculares, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, linfocitos Beta, células pituitarias, células del revestimiento sinovial, células ováricas, células testiculares, fibroblastos, linfocitos B, linfocitos T, reticulocitos, leucocitos y células tumorales.

50 La invención proporciona composiciones farmacéuticas estables que comprenden vehículos de administración liposomales liofilizados que son útiles para efectuar la administración de contenidos encapsulados (por ejemplo, ARNm) a una o más células, tejidos u órganos diana. La divulgación proporciona además métodos y procesos relacionados para preparar tales composiciones farmacéuticas, así como los métodos para tratar una o más

55 enfermedades o afecciones mediante la administración de tales composiciones farmacéuticas a un sujeto que lo necesite se divulgan en el presente documento. También se espera que las composiciones liofilizadas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) descritas en el presente documento tengan estabilidad mejorada a largo plazo durante el almacenamiento en refrigeración o a temperatura ambiente (por ejemplo, temperatura ambiente).

60 Las composiciones farmacéuticas que comprenden nanopartículas liofilizadas (vehículos de administración liposómicos) se caracterizan por ser estables (por ejemplo, tan estables como composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos equivalentes no liofilizados). La estabilidad de los vehículos de administración liofilizados se

puede determinar, por ejemplo, con referencia al tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas que comprenden dicha composición. En la preparación de las composiciones farmacéuticas de la invención, la liofilización de las nanopartículas lipídicas no modifica ni altera apreciablemente el tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas después de la liofilización y/o la reconstitución. Por ejemplo, en el presente documento se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración de lípidos liofilizados, en las que después de la reconstitución (por ejemplo, con agua purificada), las nanopartículas lipídicas no se floculan o agregan, o como alternativa, demuestran floclulación o agregación limitada o insignificante (por ejemplo, determinada por el tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas reconstituidas). Por consiguiente, en ciertas realizaciones, tras la reconstitución de una nanopartícula lipídica liofilizada, las nanopartículas lipídicas tienen un  $Dv_{50}$  de menos de aproximadamente 100 nm (por ejemplo, menos de aproximadamente 75 nm, 50 nm, 25 nm, o menor). De forma similar, en ciertas realizaciones, tras la reconstitución de una nanopartícula lipídica liofilizada, las nanopartículas lipídicas tienen un  $Dv_{90}$  de menos de aproximadamente 200 nm (por ejemplo, menos de aproximadamente 150 nm, 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm, o menor).

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

Los vehículos de administración de lípidos liofilizados estables (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) proporcionados por la invención también se caracterizan por sus propiedades de almacenamiento mejoradas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los vehículos de administración de lípidos liofilizados se pueden almacenar en refrigeración y permanecer estables (por ejemplo, como se demuestra por pérdidas mínimas o ninguna en su actividad farmacéutica o biológica prevista) durante períodos de tiempo prolongados (por ejemplo, estables durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36 meses o más tras el almacenamiento a aproximadamente 4 °C). En otras realizaciones, los vehículos de administración de lípidos liofilizados pueden almacenarse sin refrigeración y permanecer estables durante períodos de tiempo prolongados (por ejemplo, estables durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 36 meses o más después de almacenamiento a aproximadamente 25 °C). En ciertas realizaciones, tras la reconstitución con un medio de rehidratación apropiado (por ejemplo, agua purificada, agua desionizada, dextrosa al 5 % y/o solución salina normal), la composición reconstituida demuestra actividad farmacológica o biológica comparable con la observada antes de la liofilización. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la actividad farmacológica o biológica del ARNm encapsulado es equivalente a la observada antes de la liofilización de la composición o, como alternativa, demuestra una reducción despreciable de la actividad farmacológica o biológica (por ejemplo, una reducción de menos de aproximadamente un 1 %, 2 %, 2,5 %, 4 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 %, 15 %, 18,5 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o 50 % de la actividad biológica o farmacológica del ARNm encapsulado).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración de lípidos liofilizados (por ejemplo, nanopartículas lipídicas liofilizadas) que comprenden además uno o más lioprotectores en donde el uno o más lioprotectores se seleccionan del grupo que consiste de sacarosa, trehalosa, dextrano e insulina. En ciertas realizaciones, la inclusión de uno o más lioprotectores en la nanopartícula lipídica puede mejorar o potenciar de otro modo la estabilidad de los vehículos de administración de lípidos liofilizados (por ejemplo, en condiciones normales de almacenamiento) y/o facilitar la reconstitución de los vehículos de administración de lípidos liofilizados usando un medio de rehidratación, preparando de este modo una formulación acuosa. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las nanopartículas lipídicas se preparan y antes de la liofilización el tampón presente en la formulación liposómica puede reemplazarse (por ejemplo, mediante centrifugación) por un lioprotector, tal como una solución o suspensión de sacarosa (por ejemplo, una solución acuosa que comprende entre aproximadamente 1-50 % o 10-25 % de sacarosa). Otros lioprotectores adecuados que pueden usarse para preparar las composiciones liofilizadas descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, trehalosa, dextrano (por ejemplo, 1,5 kDa, 5 kDa y/o 40 kDa) e inulina (por ejemplo, 1,8 kDa y/o 4 kDa).

En algunas realizaciones, las composiciones liofilizadas divulgadas en el presente documento también son capaces de facilitar la liberación prolongada de los contenidos encapsulados en una o más nanopartículas lipídicas que comprenden dicha composición. Por ejemplo, se contemplan las composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración de lípidos liofilizados, en los que la composición se puede implantar en un sujeto sin reconstitución (por ejemplo, se implanta por vía subcutánea, por ejemplo, como una membrana o un disco). Tales composiciones liofilizadas implantadas pueden erosionarse o disgregarse de otra forma a una velocidad predeterminada, por ejemplo, tras la exposición a uno o más fluidos biológicos (por ejemplo, suero, sangre, fluido cerebroespinal, mucosidad, sudor, secreciones gástricas, orina y/o saliva). En ciertas realizaciones, tales composiciones farmacéuticas implantadas que comprenden vehículos de administración de lípidos liofilizados liberan, por ejemplo, polinucleótidos encapsulados durante al menos 1, 2, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120 días o

más. Como alternativa, tales composiciones implantadas que comprenden vehículos de administración de lípidos liofilizados liberan, por ejemplo, polinucleótidos encapsulados durante al menos uno, dos, tres, seis, doce, dieciséis, veinticuatro, treinta y seis meses o más.

- 5 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración de lípidos liofilizados proporcionadas por la invención pueden reconstituirse antes de la administración a un sujeto (por ejemplo, un mamífero). Tras la reconstitución (por ejemplo, usando agua purificada o dextrosa al 5 % como medio de rehidratación), la composición acuosa reconstituida se puede administrar a un sujeto mediante una o más de las siguientes vías de administración: por vía intravenosa, oral, rectal, vaginal, transmucosal, sublingual, subdural, nasal, intramuscular, subcutánea, inyección intramedular, intratecal, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, oftálmica y/o intraocular.

15 La composición farmacéutica estable de la invención puede usarse en el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad asociada con la expresión aberrante de un gen o ácido nucleico) en un sujeto, en donde la enfermedad se selecciona de atrofia muscular espinal (AME) relacionada con SMN1; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); galactosemia relacionada con GALT; fibrosis quística (CF); trastornos relacionados con SLC3A1, incluyendo cistinuria; trastornos relacionados con COL4A5 incluyendo el síndrome de Alport; deficiencias de galactocerebrosidasa; adrenoleucodistrofia y adrenomieloneuropatía ligadas al cromosoma X; enfermedad de Huntington; enfermedad de Parkinson; distrofias musculares (como, por ejemplo, Duchenne y Becker); enfermedades de hemofilia como, por ejemplo, hemofilia B (FIX) y hemofilia A (FVIII); ataxia de Friedreich; Enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; esclerosis tuberosa relacionada con TSC1 y TSC2; síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB); cistinosis relacionada con CTNS; trastornos relacionados con FMR1 que incluyen síndrome de X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil y síndrome de fallo ovárico prematuro de X frágil; síndrome de Prader-Willi; enfermedad de Fabry; telangiectasia hemorrágica hereditaria (AT); enfermedad de Niemann-Pick tipo C1; las enfermedades relacionadas con lipofuscinosis ceroides neuronales, incluyendo la lipofuscinosis ceroidea neuronal juvenil (JNCL), la enfermedad de Batten juvenil, la enfermedad de Santavuori-Haltia, la enfermedad de Jansky-Bielschowsky y deficiencias de PTT-1 y TPP1; ataxia infantil relacionada con EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 y EIF2B5 con hipomielinización/desaparición de sustancia blanca del sistema nervioso central; ataxia episódica tipo 2 relacionada con CACNA1A y CACNB4; los trastornos relacionados con MECP2, incluyendo síndrome de Rett clásico, encefalopatía neonatal grave relacionada con MECP2 y el síndrome PPM-X; síndrome de Rett atípico relacionado con CDKL5; enfermedad de Kennedy (SBMA); arteriopatía cerebral autosómica dominante relacionada con Notch-3 con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); trastornos convulsivos relacionados con SCN1A y SCN1B; los trastornos relacionados con la polimerasa G, que incluyen el síndrome de Alpers-Huttenlocher, neuropatía atáxica sensorial relacionada con POLG, disartría y oftalmoparesia, y oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante y recesiva con deleciones de ADN mitocondrial; hipoplasia suprarrenal ligada al cromosoma X; agammaglobulinemia ligada a X; enfermedad de Wilson; y enfermedad de Fabry. También se contemplan los usos de la composición farmacéutica estable para tratar las enfermedades anteriores, en donde el uso comprende poner en contacto la una o más células diana con los compuestos o la composición farmacéutica descritos en el presente documento de tal manera que una o más células diana se transfectan con los uno o más polinucleótidos encapsulados.

45 En ciertas realizaciones, los métodos de tratamiento divulgados emplean las composiciones que comprenden vehículos de administración de lípidos liofilizados o reconstituidos divulgados en el presente documento, que son capaces de modular la expresión de ácidos nucleicos y polinucleótidos expresados de manera aberrante en una o más células y tejidos diana. Por consiguiente, también se proporcionan métodos para tratar enfermedades en un sujeto administrando una cantidad eficaz de composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración de lípidos liofilizados proporcionados en el presente documento en un sujeto (por ejemplo, tras la reconstitución con un medio de rehidratación, tal como agua estéril para inyección). 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 polipeptídico funcional en una o más células y tejidos diana (por ejemplo, hepatocitos). En algunas realizaciones, las células o tejidos diana expresan de manera aberrante el ARNm encapsulado por uno o más de los vehículos de administración lipídicos liofilizados (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) de la invención.

55 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para aumentar la expresión de uno o más ARNm en una o más células, tejidos y órganos diana. Generalmente, tales métodos comprenden poner en contacto las células diana con uno o más compuestos y/o composiciones farmacéuticas o liposómicas que comprenden o encapsulan uno o más polinucleótidos. También se divulgan métodos para transfectar una o más células con un ARNm (por ejemplo, que comprende las etapas de rehidratar una composición liofilizada y poner en contacto dicha una o más células con la composición rehidratada).

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

65

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La **figura 1** ilustra la salida de luminiscencia de la proteína luciferasa de luciérnaga en hígado y bazo de ratones después de la administración intravenosa de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) basadas en HGT4003. Las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4003 administradas proporcionan un enriquecimiento de ARNm encapsulado en el hígado sobre el bazo. Los valores se representan como la mediana de las unidades relativas de luz (URL)/mg de proteína total cuatro horas después de la administración.

La **figura 2** ilustra la salida de luminiscencia de la proteína luciferasa de luciérnaga en los tejidos de cerebro y de la médula espinal de ratones después de la administración intracerebrovascular (ICV) e intratecal (IT) de nanopartículas lipídicas cargadas con ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) basadas en HGT4003. Las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4003 administradas proporcionan un enriquecimiento de ARNm encapsulado en el cerebro usando la vía de administración ICV en comparación con la vía de administración IT. Los valores se representan como la mediana de unidades relativas de luz (URL)/mg de proteína total cuatro horas después de la administración.

**DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES DE EJEMPLO**

Los compuestos divulgados son útiles, por ejemplo, como vehículos de administración liposomal o como componentes de vehículos de administración liposómicos. En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento pueden usarse como una composición liposómica o, como alternativa, como un componente de una composición liposómica (por ejemplo, como una nanopartícula lipídica). También se pueden emplear en composiciones farmacéuticas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) y métodos para administrar tales composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o afección o para administrar una molécula terapéutica. 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 diana.

Los compuestos divulgados en el presente documento generalmente comprenden uno o más grupos escindibles tales como, por ejemplo, uno o más grupos funcionales disulfuro (S-S) como se representa en la fórmula I a continuación. Los términos "escindir" y "escindible" se usan generalmente en el presente documento para indicar que uno o más enlaces químicos (por ejemplo, uno o más enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y/o interacciones iónicas) entre átomos en o adyacentes al grupo funcional en cuestión se rompen (por ejemplo, se hidrolizan) o se pueden romper con la exposición a condiciones seleccionadas (por ejemplo, tras la exposición a condiciones enzimáticas). En ciertas realizaciones, el grupo escindible es un grupo funcional disulfuro y, en realizaciones particulares, es un grupo disulfuro que es capaz de escindirse después de la exposición a condiciones biológicas seleccionadas (por ejemplo, condiciones intracelulares). En ciertas realizaciones, el grupo escindible es un grupo funcional éster que es capaz de escindirse tras la exposición a las condiciones biológicas seleccionadas. Por ejemplo, los grupos disulfuro pueden escindirse enzimáticamente o mediante una reacción de hidrólisis, oxidación o reducción. Tras la escisión de dicho grupo funcional disulfuro, el uno o más restos o grupos funcionales (por ejemplo, uno o más de un grupo de cabeza y/o un grupo de cola) que se unen a los mismos pueden liberarse. Los grupos escindibles ejemplares pueden incluir, pero no están limitados a, grupos disulfuro, grupos éster, grupos éter, y cualquier derivado de los mismos (por ejemplo ésteres de alquilo y arilo). En ciertas realizaciones, el grupo escindible no es un grupo éster o un grupo éter.

Los grupos escindibles descritos en el presente documento están generalmente unidos (por ejemplo, unidos por uno o más enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas y enlaces covalentes) a uno o más restos o grupos funcionales (por ejemplo, al menos un grupo de cabeza y al menos un grupo de cola). En ciertas realizaciones, al menos uno de los restos o grupos funcionales es hidrófilo (por ejemplo, un grupo de cabeza hidrófilo que comprende uno o más de imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, alquilamino opcionalmente sustituido y piridilo). Como se usa en el presente documento, 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 de disulfuro escindible (S-S) unido covalentemente a un grupo de cabeza hidrófilo, en el que el grupo hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, aminoalquilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquilamino tal como dimetilamino) y piridilo.

En ciertas realizaciones, el grupo o resto funcional hidrófilo seleccionado puede alterar o impartir propiedades al compuesto o a la composición liposómica de la que dicho compuesto es un componente (por ejemplo, mejorando las eficacias de transfección de una nanopartícula lipídica cuyo compuesto es un componente). Por ejemplo, la incorporación de guanidinio como un grupo de cabeza hidrófilo en los compuestos divulgados en el presente documento puede promover la fusogenicidad de dicho compuesto (o de la composición liposómica de la que dicho compuesto es un componente) con la membrana celular de una o más células diana, mejorando así, por ejemplo, las eficiencias de transfección de dicho compuesto. Se ha formulado la hipótesis de que el nitrógeno del resto hidrofílico

de guanidinio forma un estado de transición anular de seis miembros que otorga estabilidad a la interacción y, por lo tanto, permite la captación celular de materiales encapsulados. (Wender, et al., Adv. Drug Del. Rev. (2008) 60: 452-472). De forma similar, la incorporación de uno o más grupos amino o restos en los compuestos divulgados (por ejemplo, como un grupo de cabeza) puede promover adicionalmente la rotura de la membrana endosómica/lisosómica de la célula diana explotando la fusiogenicidad 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 para experimentar una transición de fase hexagonal y fusionarse con la superficie de la célula diana, es decir, la membrana vesicular. (Koltover, et al. Science (1998) 281: 78-81.) Se cree que el resultado favorece la rotura de la membrana vesicular y la liberación de los contenidos de las nanopartículas lipídicas en la célula diana.

De manera similar, en ciertas realizaciones, la incorporación de, por ejemplo, imidazol como un grupo de cabeza hidrófilo en los compuestos divulgados en el presente documento puede servir para promover la liberación endosómica o lisosómica de, por ejemplo, contenidos que están encapsulados en una composición liposómica (es decir, nanopartícula lipídica) de la invención. Dicha liberación mejorada se puede lograr mediante uno o ambos mecanismos de rotura mediados por esponja de protones y/o un mecanismo de fusogénesis mejorado. El mecanismo de esponja de protones se basa en la capacidad de un compuesto, y en particular un resto o grupo funcional del compuesto, para amortiguar la acidificación del endosoma. Esto puede manipularse o controlarse de otro modo mediante el pKa del compuesto o de uno o más de los grupos funcionales que comprenden dicho compuesto (por ejemplo, imidazol). Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la fusogenicidad de, por ejemplo, los compuestos basados en imidazol divulgados en el presente documento (por ejemplo, HGT4001 y HGT4004) están relacionados con las propiedades de rotura endosómica, que son facilitadas por tales grupos de imidazol, que tienen un pKa menor en comparación con otros lípidos catiónicos tradicionales. Tales propiedades de rotura endosómica a su vez promueven el hinchamiento osmótico y la rotura de la membrana liposómica, seguido de la transfección o liberación intracelular de los materiales polinucleotídicos cargados o encapsulados en la célula diana. Este fenómeno puede ser aplicable a una variedad de compuestos con perfiles de pKa deseables además de un resto de imidazol. Dichas realizaciones también incluyen funcionalidades basadas en multi-nitrógeno, tales como poliaminas, polipéptido (histidina) y estructuras dendríticas basadas en nitrógeno.

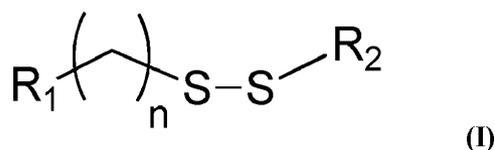
Los compuestos y, en particular, los compuestos basados en imidazol divulgados en el presente documento (por ejemplo, HGT4001 y HGT4004), también se caracterizan por su toxicidad reducida, en particular con respecto a lípidos tradicionales y lípidos catiónicos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento comprenden uno o más compuestos lipídicos catiónicos basados en imidazol de manera que la concentración relativa de otros lípidos catiónicos más tóxicos en dicha composición farmacéutica o liposómica puede reducirse o eliminarse de otro modo. Los compuestos o lípidos basados en imidazol (por ejemplo, HGT4001 y/o HGT4004) se pueden usar como el único lípido catiónico en una o más de las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) o, como alternativa, se pueden combinar con lípidos catiónicos (por ejemplo, LIPOFECTINA o LIPOFECTAMINA) además de los lípidos no catiónicos, colesterol y lípidos modificados con PEG. En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento o, como alternativa, el componente lipídico catiónico total de las composiciones farmacéuticas y liposómicas puede comprender una relación molar de aproximadamente 1 % a aproximadamente 90 %, aproximadamente 2 % a aproximadamente 70 %, aproximadamente 5 % a aproximadamente 50. %, aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 % del lípido total presente en tal composición farmacéutica o liposómica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica), preferentemente aproximadamente 20 % a aproximadamente 70 % del lípido total presente en dicha composición farmacéutica o liposómica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica).

En ciertas realizaciones, al menos uno de los grupos funcionales de restos que comprenden los compuestos divulgados en el presente documento es de naturaleza hidrófoba (por ejemplo, un grupo de cola hidrófobo que comprende un lípido de origen natural tal como colesterol). Como se usa en el presente documento, 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 la presente se divulgan compuestos que comprenden un grupo funcional escindible (es decir, un grupo disulfuro (S-S)) unido a grupos hidrófobos, en donde dichos grupos hidrófobos comprenden uno o más lípidos de origen natural como colesterol, y/o un alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> variablemente saturado o insaturado, opcionalmente sustituido, y/o un acilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> variablemente saturado o insaturado, opcionalmente sustituido.

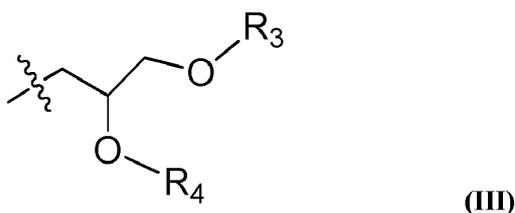
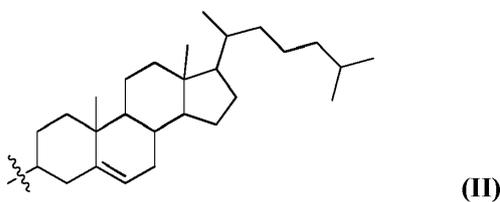
En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento comprenden, por ejemplo, al menos un grupo de cabeza hidrófilo y al menos un grupo de cola hidrofóbico, cada uno unido al menos a un grupo escindible, convirtiendo así a dichos compuestos en anfifílicos. Tal como se usa en el presente documento para describir un compuesto o composición, el término "anfifílico" significa la capacidad de disolverse en entornos tanto polares (por ejemplo, agua) como no polares (por ejemplo, lípidos). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento comprenden al menos un grupo de cola lipófilo (por ejemplo, colesterol o un alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>) y al menos un grupo de cabeza hidrófilo (por ejemplo, imidazol), cada uno unido a un grupo escindible (por ejemplo, disulfuro).

Debe observarse que los términos "grupo de cabeza" y "grupo de cola" tal como se utilizan describen los compuestos divulgados y, en particular, los grupos funcionales que comprenden tales compuestos, se usan para facilitar la referencia para describir la orientación de uno o más compuestos funcionales. grupos relativos a otros grupos funcionales. Por ejemplo, un grupo de cabeza hidrófilo (por ejemplo, guanidinio) puede estar unido (por ejemplo, por uno o más enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas y enlaces covalentes) a un grupo funcional escindible (por ejemplo, un grupo disulfuro), que a su vez está unido a un grupo de cola hidrofóbica (por ejemplo, colesterol).

También se divulgan en el presente documento compuestos que tienen la estructura de fórmula I,



en la que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, un alquilamino opcionalmente sustituido (por ejemplo, un alquilamino tal como dimetilamino) y piridilo; en la que R<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en la fórmula II y la fórmula III;



en la que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en un alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> saturado o insaturado de forma variable opcionalmente sustituido y un acilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> saturado o insaturado de forma variable opcionalmente sustituido; y en la que n es cero o cualquier número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más). En ciertas realizaciones, cada uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> comprende un alquilo C<sub>18</sub> poliinsaturado opcionalmente sustituido, mientras que en otras realizaciones R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno un alquilo C<sub>18</sub> poliinsaturado no sustituido. En ciertas realizaciones, cada uno de R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieno. En ciertas realizaciones, n es 1 (tal que el alquilo es etilo), 2 (tal que el alquilo es metilo), 3 (tal que el alquilo es, por ejemplo, propilo o isopropilo), 4 (tal que el alquilo es, por ejemplo, butilo, iso-butilo, sec-butilo o terc-butilo), 5 (tal que el alquilo es, por ejemplo, pentano), 6 (tal que el alquilo es, por ejemplo, hexano), 7 (de modo que el alquilo es, por ejemplo, heptano), 8 (tal que el alquilo es, por ejemplo, octano), 9 (n tal que el alquilo es, por ejemplo, nonano) o 10 (tal que el alquilo es, por ejemplo, decano).

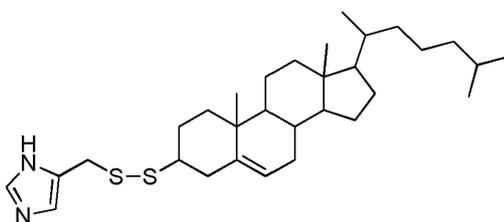
Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a hidrocarburos de C<sub>1</sub>-C<sub>40</sub> de cadena tanto lineal como ramificada (por ejemplo, hidrocarburos C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>) e incluyen tantos hidrocarburos saturados como insaturados. En ciertas realizaciones, el alquilo puede comprender uno o más alquilos cíclicos y/o uno o más heteroátomos tales como oxígeno, nitrógeno o azufre y opcionalmente puede estar sustituido con sustituyentes (por ejemplo, uno o más de alquilo, halo, alcoxilo, hidroxilo, amino, arilo, éter, éster o amida). En ciertas realizaciones, un alquilo contemplado incluye (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieno. Con el uso de designaciones tales como, por ejemplo, "C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>" se pretende hacer referencia a un alquilo (por ejemplo, cadena lineal o ramificada e incluye alquenos y alquilos) que tiene los átomos de carbono del intervalo indicado.

Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a grupos aromáticos (por ejemplo, estructuras monocíclicas, bicíclicas y tricíclicas) que contienen de seis a diez átomos de carbono en la porción de 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 tales como oxígeno, nitrógeno o azufre.

También se divulgan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de fórmula I, en la que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en imidazol, guanidinio, amino, imina, enamina, un alquilamino opcionalmente sustituido (por ejemplo, dimetilamino) y piridilo; en la que R<sub>2</sub> es fórmula II; y en la que n es cero o cualquier número entero positivo (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más). Se divulgan adicionalmente en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de fórmula I, en la que R<sub>1</sub> se selecciona del grupo que consiste en imidazol, guanidinio, imina, enamina, amino, un alquilamino opcionalmente sustituido (por ejemplo, dimetilamino) y piridilo; en la que R<sub>2</sub> es fórmula III; en la que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en un alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> saturado o insaturado de forma variable opcionalmente sustituido y un acilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> saturado o insaturado de forma variable opcionalmente sustituido; y en la que n es cero o cualquier número entero positivo. En ciertas realizaciones, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno un alquilo C<sub>18</sub> poliinsaturado opcionalmente sustituido, mientras que en otras realizaciones R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno un alquilo C<sub>18</sub> poliinsaturado no sustituido. En ciertas realizaciones, un alquilo contemplado incluye (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieno.

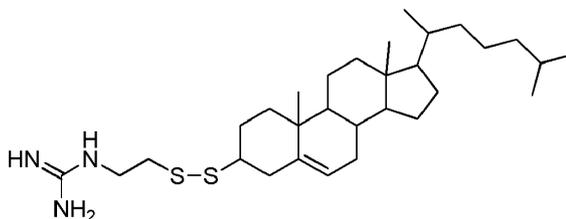
En ciertas realizaciones, el grupo R<sub>1</sub> o grupo de cabeza es un grupo polar o hidrofílico (por ejemplo, uno o más de los grupos imidazol, guanidinio y amino) y está unido al grupo lipídico R<sub>2</sub> por medio del grupo enlazador escindible con disulfuro (S-S), por ejemplo como se representa en la fórmula I. El grupo R<sub>1</sub> o grupo de cabeza se puede unir covalentemente al grupo enlazador escindible por medio de un grupo alquilo (por ejemplo, un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> en el que n es de uno a veinte) o, como alternativa, puede estar directamente unido al grupo enlazador escindible (por ejemplo, en el que n es cero). Los compuestos y composiciones farmacéuticas divulgados en el presente documento pueden prepararse de manera que tras la exposición a condiciones seleccionadas (por ejemplo, condiciones biológicas o enzimáticas apropiadas) el grupo enlazador escindible (por ejemplo, un grupo disulfuro) se escinde y de ese modo provoca la disociación de uno o más de los grupos o restos funcionales (por ejemplo, un grupo de cabeza y/o cola) unidos a los mismos. La disociación de los grupos o restos funcionales (por ejemplo, un grupo R<sub>1</sub> hidrofílico tal como imidazol) puede provocar una transición de fase en la composición liposómica de la que uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento es un componente que desestabiliza el liposoma y facilita la fusión con la membrana de una o más células diana. Otros grupos enlazadores escindibles contemplados pueden incluir composiciones que comprenden uno o más grupos enlazadores disulfuro (S-S) unidos (por ejemplo, unidos covalentemente) a, por ejemplo, un grupo alquilo (por ejemplo, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>).

En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona el compuesto 5-(((10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenanten-3-il) disulfanil)metil)-1H-imidazol, que tiene la estructura de fórmula IV (denominada en el presente documento "HGT4001").



(IV)

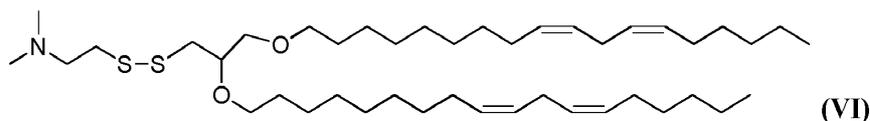
En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona el compuesto 1-(2-(((3S,10R,13R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenanten-3-il)disulfanil)etil)guanidina, que tiene la estructura de fórmula V (mencionada en el presente documento como "HGT4002").



(V)

En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona el compuesto 2-((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)-N,N-dimetiletanamina, que tiene la estructura de fórmula VI (denominada en el presente documento "HGT4003").

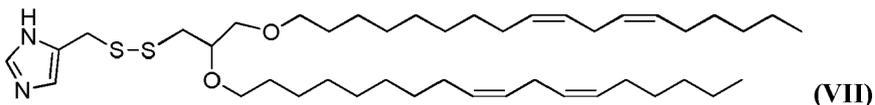
5



10

En otras realizaciones, la divulgación proporciona el compuesto 5-(((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil) disulfanil)metil)-1H-imidazol que tiene la estructura de fórmula VII (denominada en el presente documento "HGT4004").

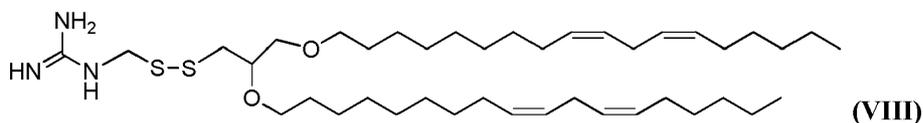
15



20

En otras realizaciones más, la divulgación proporciona el compuesto 1-(((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil) disulfanil)metil)guanidina que tiene la estructura de fórmula VIII (referida hasta en el presente documento como "HGT4005").

25



30

Los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse para construir composiciones liposómicas que facilitan o mejoran la administración y liberación de materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos terapéuticos) a una o más células diana (por ejemplo, impregnando o fusionando con las membranas lipídicas de tales células objetivo). En ciertas realizaciones, uno o más grupos funcionales escindibles que comprenden tales compuestos permiten, por ejemplo, un grupo de cabeza funcional hidrófilo para disociarse (por ejemplo, tras la exposición a condiciones reductoras o ácidas) de un grupo de cola funcional lipofílico del compuesto., facilitando así una transición de fase en la bicapa lipídica de una o más células diana. Por ejemplo, cuando una composición liposómica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) comprende o está enriquecida de otro modo con uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento, la transición de fase en la bicapa lipídica de la una o más células diana facilita la administración de los materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos terapéuticos encapsulados en una nanopartícula lipídica) en la una o más células diana.

40

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

50

En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento (y las composiciones farmacéuticas y liposómicas que comprenden tales compuestos) emplean una estrategia multifuncional para facilitar la administración de materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos) y la posterior transfección de una o más células diana. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento (y las composiciones farmacéuticas y liposómicas que comprenden tales compuestos) se caracterizan por tener una o más endocitosis mediada por receptor, endocitosis mediada por clatrina y mediada por caveolas, fagocitosis y macropinocitosis, fusogenicidad, rotura endosómica o lisosómica y/o propiedades de liberación que proporcionan ventajas de tales compuestos en relación con otros lípidos clasificados de forma similar.

60

En ciertas realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposómicas de las que tales compuestos son un componente (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) muestran una capacidad potenciada (por ejemplo, aumentada) para transfectar una o más células diana. De acuerdo con esto, también se proporcionan en el presente documento métodos para transfectar una o más células diana. Dichos métodos comprenden generalmente la etapa de poner en contacto la una o más células diana con los compuestos y/o composiciones farmacéuticas divulgados en el presente documento (por ejemplo, una nanopartícula lipídica basada en HGT4003 que encapsula uno o más polinucleótidos) de manera que una o más células diana se transfectan con los materiales encapsulados en el mismo (por ejemplo, uno o más polinucleótidos). Como se usa en el presente documento, los términos

65

"transfecta" 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, preferentemente, en una célula diana. El polinucleótido introducido puede mantenerse estable o transitoriamente en la célula diana. El término "eficacia de la transfección" se refiere a la cantidad relativa de dicho material encapsulado (por ejemplo, polinucleótidos) tomada, introducida y/o expresada por la célula diana que está sujeta a transfección. En la práctica, la eficacia de la transfección se estima mediante la cantidad de un producto polinucleotídico informador producido por las células diana después de la transfección. En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones farmacéuticas divulgados en el presente documento demuestran altas eficacias de transfección mejorando la probabilidad de que las dosificaciones apropiadas de los materiales encapsulados (por ejemplo, uno o más polinucleótidos) se envíen al sitio de la patología y se expresen posteriormente, mientras que al mismo tiempo que minimiza posibles efectos adversos sistémicos.

Se puede administrar una amplia gama de materiales que pueden ejercer efectos farmacéuticos o terapéuticos a las células diana usando los compuestos, composiciones y métodos de la presente divulgación. Por consiguiente, los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento se pueden usar para encapsular cualquier material adecuado para la administración intracelular. En ciertas realizaciones, dichos materiales encapsulados son capaces de conferir un beneficio terapéutico o de diagnóstico a las células en las que se suministran dichos materiales, y pueden incluir cualquier fármaco, biológico y/o diagnóstico. Los materiales pueden ser orgánicos o inorgánicos. Las moléculas orgánicas pueden ser péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, esteroides, ácidos nucleicos (incluyendo ácidos nucleicos peptídicos) o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento 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 el presente documento, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente para hacer referencia a material genético (por ejemplo, ADN o ARN), y cuando dichos términos se usan con respecto a los compuestos y composiciones divulgados en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) generalmente se refieren al material genético encapsulado por dichos compuestos y composiciones (por ejemplo, nanopartículas lipídicas). En algunas realizaciones, el polinucleótido es ARN. El ARN adecuado incluye ARNm, ARNip, ARNmi, ARNsn y ARNsno. Los polinucleótidos contemplados también incluyen ARN no codificante intergénico grandes (ARNncig), que generalmente no codifican proteínas, sino que funcionan, por ejemplo, en señalización inmune, biología de células madre y el desarrollo de enfermedades. (Véase, por ejemplo, Guttman, et al., 458: 223 - 227 (2009); y Ng, et al., Nature Genetics 42: 1035-1036 (2010)). En realizaciones preferidas de la divulgación, el polinucleótido es ARNm. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento incluyen ARN o ARN estabilizado que codifica una proteína o enzima (es decir, ARNm, por ejemplo, ARNm que codifica alfa galactosidasa). La presente divulgación contempla el uso de tales polinucleótidos (y en particular ARN o ARN estabilizado) como un agente terapéutico que es capaz de ser expresado por las células diana para facilitar de ese modo la producción (y en algunos casos la excreción) de una enzima o proteína funcional por dicho objetivo células como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional n.º PCT/US2010/058457 y en la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/494,881, presentada el 8 de junio de 2011. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, tras la expresión de uno o más polinucleótidos por células diana, puede observarse producción de una enzima o proteína funcional en la que un sujeto es deficiente (por ejemplo, una enzima del ciclo de urea o una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosómico). El término "funcional", como se usa en el presente documento para calificar una proteína o enzima, significa que la proteína o enzima tiene actividad biológica, o, como alternativa, es capaz de realizar la misma función que la proteína o enzima nativa o que funciona normalmente o similar.

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

En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones farmacéuticas proporcionados en el presente documento son capaces de modular la expresión de ácidos nucleicos y polinucleótidos expresados de forma aberrante en una o más células y tejidos diana. Por consiguiente, también se proporcionan en el presente documento métodos para tratar enfermedades en un sujeto administrando al sujeto una cantidad eficaz de los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas o liposómicas descritas en el presente documento. 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 polipeptídico funcional en una o más células y tejidos diana (por ejemplo, hepatocitos). En algunas realizaciones, las células o tejidos diana expresan de forma aberrante el polinucleótido encapsulado por uno o más de los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposómicas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas)

divulgados en el presente documento. También se proporcionan en el presente documento métodos para aumentar la expresión de uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) en una o más células, tejidos y órganos diana. Generalmente, tales métodos comprenden poner en contacto las células diana con uno o más compuestos y/o composiciones farmacéuticas o liposómicas que comprenden o encapsulan uno o más polinucleótidos.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento pueden usarse como un liposoma o como un componente de un liposoma. Específicamente, en ciertas realizaciones, los compuestos divulgados en el presente documento pueden usarse como componente lipídico (por ejemplo, lípido catiónico) de una composición liposómica (por ejemplo, una nanopartícula lipídica). Dichos liposomas pueden usarse para encapsular materiales y  
10 facilitar la administración de dichos materiales a una o más células, tejidos y órganos diana. Como se usa en el presente documento, el término "liposoma" generalmente se refiere a una vesícula compuesta de lípidos (por ejemplo, lípidos anfifílicos) dispuestos en una o más bicapas o 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 el presente documento). Dichos liposomas pueden ser vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene los materiales encapsulados (por ejemplo, polinucleótidos) para administrarse a una o más células, tejidos y órganos diana. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento comprenden una o más nanopartículas lipídicas. Los liposomas contemplados incluyen nanopartículas lipídicas. Ejemplos de lípidos adecuados (por ejemplo, lípidos catiónicos) que se pueden usar para  
20 formar los liposomas y nanopartículas lipídicas contemplados en el presente documento incluyen uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento (por ejemplo, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y/o HGT4005). Tales liposomas y nanopartículas lipídicas también pueden comprender lípidos catiónicos adicionales tales como C12-200, DLin-KC2-DMA y/o HGT5001, lípidos no catiónicos, lípidos auxiliares/basados en colesterol, lípidos modificados con PEG, así como los compuestos de fosfatidilo (por ejemplo, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos) y combinaciones o mezclas de los anteriores.

Se han descrito varios lípidos catiónicos en la literatura, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. En ciertas realizaciones, dichos lípidos catiónicos se incluyen en las composiciones farmacéuticas o liposómicas  
30 descritas en el presente documento además de uno o más de los compuestos o lípidos divulgados en el presente documento (por ejemplo, HGT4003). 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 n.º 4,897,355) DOTMA se puede formular solo o se puede combinar con un lípido neutro, dioleoilfosfatidiletanolamina o "DOPE" u otros lípidos catiónicos o no catiónicos en una nanopartícula lipídica. Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, lípidos catiónicos ionizables como se describe en La solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/617,468, presentada el 29 de marzo de 2012, como, por ejemplo,  
35 (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-2-dien-1-il) tetracosa-15,18-dien-1-amina (HGT5000), (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-4,15,18-trien-1-amina (HGT5001), y (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il) tetracosa-5,15,18-trien -1-amina (HGT5002); C12-200 (WO 2010/053572), 2-(2,2-di ((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)-1,3-dioxolan-4-il)-N,N-dimetiletanamina (DLinKC2-DMA))) (véase el documento WO 2010/042877; Semple et al., Nature Biotech. 28: 172-176 (2010)), 2-(2,2-di ((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)-1,3-dioxolan-4-il)-N,N-dimetiletanamina "DLin- KC2-DMA, 3-(1H-imidazol-4-il) propanoato de  
40 "(3S,10R,13R,17R)-10, 13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo "ICE", (15Z,18Z)- N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dieno-1-il) tetracosa-15,18-dien-1-amina "HGT5000" (15Z,18Z)-N,N -dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il) tetracosa-4,15,18-trien-1-amina "HGT5001" y (15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il) tetracosa-5,15,18-trien-1-amina "HGT5002", 5-carboxiespermilglicina-dioctadecilamida o "DOGS", "2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio o" DOSPA "(Behr et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. 86, 6982 (1989)); Patente de Estados Unidos n.º 5.171.678; patente de Estados Unidos n.º 5.334,761), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano 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-dilinoileiloxi -N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLinDMA", 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano o "DLenDMA", cloruro de N-dioleil-N,N-dimetilamonio o "DODAC", bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio o "DDAB", N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietyl-amonio bromuro o "DMRIE", 3-dimetilamino -2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis, cis-9,12-octadecadienoxi) propano o "CLinDMA", 2-[5'-(colest- 5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-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-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[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. Biotechnol. 23 (8): 1003-1007 (2005)); publicación PCT WO2005/121348A1). También se contempla el uso de lípidos catiónicos basados en colesterol para formular las composiciones (por ejemplo, nanopartículas lipídicas). Dichos lípidos catiónicos basados en colesterol pueden usarse, solos o en combinación con otros lípidos catiónicos o no catiónicos. Los lípidos catiónicos adecuados basados en colesterol incluyen, por ejemplo, DC-Chol (N,N-dimetil-N-etilcarboxamidocolesterol), 1,4-bis (3-N-

oleilamino-propil)piperazina (Gao, et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 179, 280 (1991); Wolf et al. BioTechniques 23, 139 (1997); patente de Estados Unidos n.º 5.744.335).

5 También se contemplan los lípidos catiónicos tales como los lípidos basados en dialquilamino, basados en imidazol y basados en guanidinio. Por ejemplo, también se contempla el uso del lípido catiónico 3-(1H-imidazol-4-il) propanoato de (3S,10R,13R, 17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclo-penta[a]fenantren-3-ilo o "ICE" ", como se describe en la solicitud internacional n.º PCT/US2010/058457.

10 El uso y la inclusión de fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG) y lípidos derivatizados como ceramidas derivatizadas (PEG-CER), incluida N-octanoil-esfingosina-1-[succinil(metoxi-polietilenglicol)-2000] (C8 PEG-2000 ceramida) en las composiciones liposómicas y farmacéuticas descritas en el presente documento también se contempla, preferentemente en combinación con uno o más de los compuestos y lípidos divulgados en el presente documento. Los lípidos modificados con PEG contemplados incluyen, pero no se limitan a, una cadena de polietilenglicol de hasta 5 kDa de longitud unida covalentemente a un lípido con cadena(s) alquílica(s) de C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> longitud. En algunas realizaciones, el lípido modificado con PEG empleado en las composiciones y métodos divulgados en el presente documento es 1,2-dimiristoil-sn-glicerol, metoxipolietilenglicol (PW 2000 MW) "DMG-PEG2000". La adición de lípidos modificados con PEG al vehículo de administración de lípidos puede evitar la agregación compleja y también puede proporcionar un medio para aumentar la duración de la circulación y aumentar la administración de la composición de lípido-polinucleótido a los tejidos diana, (Klibanov et al. (1990) FEBS Letters, 268 (1): 235-237), o pueden ser seleccionados para intercambiar rápidamente fuera de la formulación *in vivo* (véase la patente de Estados Unidos n.º 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 derivatizados pueden comprender una relación molar de aproximadamente 0 % a aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 20 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 15 %, aproximadamente 4 % a aproximadamente 10 % o aproximadamente 2 % del lípido total presente en una nanopartícula lipídica liposomal.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido modificado con PEG y colesterol. Como se usa en el presente documento, la frase "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido neutro, zwitteriónico o aniónico. Como se usa en el presente documento, la frase "lípido aniónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que llevan una carga neta negativa a un pH seleccionado, tal como el pH fisiológico. lípidos no catiónicos incluyen, pero no se limitan a, diestearoilfosfatidilcolina (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), dimiristoilfosfoetanolamina (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-fosfatidiletanolamina (SOPE), ceramidas, esfingomielinas, colesterol, o una mezcla de los mismos. Tales lípidos no catiónicos se pueden usar solos, pero se usan preferentemente en combinación con otros excipientes, por ejemplo, uno o más de los compuestos lipídicos catiónicos divulgados en el presente documento (por ejemplo, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y/o HGT4005). Cuando se usa en combinación con un lípido catiónico, el lípido no catiónico puede comprender una relación molar de 5 % a aproximadamente 90 %, o preferentemente de aproximadamente 10 % a aproximadamente 70 % del lípido total presente en la nanopartícula lipídica.

50 También se contempla la inclusión de polímeros en las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas o liposómicas descritas en el presente documento. Los polímeros adecuados pueden incluir, por ejemplo, poliácridatos, poliácridatos, polilactida, copolímeros de polilactida-poliglicólidos, policaprolactonas, dextrano, albúmina, gelatina, alginato, colágeno, quitosano, ciclodextrinas y polietilenimina. Dichos polímeros se pueden usar solos, pero se usan preferentemente en combinación con otros excipientes, por ejemplo, uno o más de los compuestos lipídicos catiónicos divulgados en el presente documento (por ejemplo, HGT4001, HGT4002, HGT4003, HGT4004 y/o HGT4005).

55 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas (nanopartículas lipídicas) se formulan en parte en base a su capacidad para facilitar la transfección del ARNm de una célula diana. En otra realización, las composiciones farmacéuticas (nanopartículas lipídicas) pueden seleccionarse y/o prepararse para optimizar la administración de ARNm a una célula, tejido u órgano diana. Por ejemplo, si la célula diana es un hepatocito, las propiedades de las composiciones farmacéuticas y/o liposómicas (por ejemplo, tamaño, carga y/o pH) pueden optimizarse para administrar eficazmente dicha composición (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) a la célula u órgano diana, reducir el aclaramiento inmunológico y/o promover la retención en ese órgano diana. Como alternativa, si el tejido objetivo es el sistema nervioso central, la selección y preparación de las composiciones farmacéuticas y liposómicas debe considerar la penetración 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 diana (por ejemplo, mediante administración intracerebrovascular). En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas o

liposómicas o sus nanopartículas lipídicas constituyentes se pueden combinar con agentes que facilitan la transferencia de materiales encapsulados (por ejemplo, agentes que alteran o mejoran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y mejoran así la transferencia de tales polinucleótidos encapsulados a las células objetivo). Mientras que las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) pueden facilitar la introducción de materiales encapsulados tales como uno o más polinucleótidos en células diana, la adición de policationes (por ejemplo, poli L-lisina y protamina) a, por ejemplo, uno o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas como un copolímero también puede facilitar, y en algunos casos mejorar notablemente la eficacia de transfección de varios tipos de liposomas catiónicos en 2-28 veces en varias líneas celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*. (Véase, N. J. Caplen, et al., Gene Ther. 1995; 2: 603; S. Li, et al., Gene Ther. 1997; 4, 891.)

Las composiciones farmacéuticas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) de la presente invención se preparan para encapsular ARNm. El proceso de incorporación de ARNm en un liposoma o una nanopartícula lipídica se denomina en el presente documento "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 ARNm en una nanopartícula lipídica puede servir para proteger el ARNm de un entorno que puede contener enzimas o productos químicos (por ejemplo, suero) que degradan el ARNm y/o sistemas o receptores que provocan la excreción rápida del ARNm. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son capaces de mejorar la estabilidad del ARNm encapsulados por las mismas, particularmente con respecto a los entornos a los que se expondrá dicho ARNm. Encapsular ARNm en una o más de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) también facilita la administración del ARNm en las células y tejidos diana. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden uno o más de los compuestos lipídicos descritos en el presente documento pueden permitir que el ARNm encapsulado alcance la célula diana o puede permitir preferentemente que el ARNm encapsulado alcance las células u órganos diana de forma discriminatoria (por ejemplo, las nanopartículas lipídicas pueden concentrarse en el hígado o el bazo de un sujeto al que se administran tales nanopartículas lipídicas). Alternativamente, las nanopartículas lipídicas pueden limitar la administración de ARNm a otras células u órganos no diana donde la presencia de los polinucleótidos encapsulados puede ser indeseable o de utilidad limitada.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) se preparan combinando múltiples componentes lipídicos (por ejemplo, uno o más de los compuestos divulgados en el presente documento) con uno o más componentes poliméricos. Por ejemplo, una nanopartícula lipídica puede prepararse usando HGT4003, DOPE, CHOL y DMG-PEG2000. Una nanopartícula lipídica puede estar compuesta por combinaciones de lípidos adicionales en diversas relaciones, que incluyen, por ejemplo, HGT4001, 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 del lípido o los lípidos seleccionados, la naturaleza de las células o tejidos diana pretendidos y las características de los materiales o polinucleótidos que debe administrar la nanopartícula lipídica. Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena alquílica, así como el tamaño, la carga, el pH, la pKa, la fusogenicidad y la toxicidad del lípido o los lípidos seleccionados.

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

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una nanopartícula lipídica en la que el polinucleótido encapsulado (por ejemplo, ARNm) está asociado tanto a 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 el presente documento y que comprenden las nanopartículas lipídicas pueden asociarse con el ARNm a través de interacciones electrostáticas con tales polinucleótidos.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento 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 pueden incluir rodamina-dioleoilfosfatidiletanolamina (Rh-PE), ARNm de proteína verde fluorescente (ARNm de GFP), ARNm de luciferasa de

*Renilla* y ARNm de luciferasa de luciérnaga (SEQ ID NO: 1).

5 Durante la preparación de las composiciones liposómicas descritas en el presente documento, los agentes transportadores solubles en agua también pueden encapsularse en el interior acuoso incluyéndolos en la solución hidratante, y las moléculas lipófilas pueden incorporarse en la bicapa lipídica por 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 preformadas o liposomas puede realizarse, por ejemplo, mediante los métodos divulgados en Patente de Estados Unidos n.º 4.946.683. Después de la encapsulación del ARNm, las nanopartículas lipídicas pueden procesarse para eliminar el ARNm no encapsulado a través de procesos tales como la cromatografía en gel, la diafiltración o la ultrafiltración. Por ejemplo, si se desea eliminar el ARNm unido externamente de la superficie de las composiciones liposómicas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) descritas en el presente documento, tales nanopartículas lipídicas pueden someterse a una columna de dietilaminoetilo SEPHACEL.

15 Además de los materiales encapsulados (por ejemplo, polinucleótidos o uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico) se pueden incluir o encapsular 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 (Véase, las patentes de Estados Unidos n.º 5.194.654 y 5.223.263).

20 Existen varios métodos para reducir el tamaño, o "dimensionado", de las composiciones liposómicas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) descritos en el presente documento, y cualquiera de estos métodos generalmente se puede emplear cuando se usa el tamaño. El método de extrusión es un método único de dimensionado de liposomas. (Hope, MJ et al. Reduction of Liposome Size and Preparation of Unilamellar Vesicles by Extrusion Techniques. En: *Liposome Technology* (G. Gregoriadis, Ed.) Vol. 1. pág. 123 (1993)). El método consiste en extruir liposomas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o una membrana cerámica asimétrica para reducir los tamaños de los liposomas a una distribución de tamaños relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión se cicla a través de la membrana una o más veces hasta que se alcanza la distribución de tamaño de liposoma deseada. Los liposomas pueden extruirse a través de membranas de poros sucesivamente más pequeñas para lograr una reducción gradual en el tamaño de los liposomas.

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

45 La selección del tamaño apropiado de las composiciones liposómicas descritas en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) debe tomar en consideración el sitio de la célula o tejido diana y, hasta cierto punto, la aplicación para la que se está realizando la nanopartícula lipídica. Tal como se usa en el presente documento, la frase "célula diana" se refiere a células a las que una o más de las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento deben dirigirse o dirigirse. En algunas realizaciones, las células diana comprenden un tejido u órgano particular. En algunas realizaciones, las células diana son deficientes en una proteína o enzima de interés. Por ejemplo, cuando se desea administrar un polinucleótido a un hepatocito, el hepatocito representa la célula diana. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas (y, por ejemplo, el ARNm encapsulado en ellas) divulgados en el presente documento, transfectan las células diana sobre una base discriminatoria (es decir, no transfectan células no diana). Las composiciones y métodos divulgados en el presente documento pueden prepararse para dirigirse preferentemente a una variedad de células diana, que incluyen, pero no están limitadas a, hepatocitos, células epiteliales, células hematopoyéticas, células epiteliales, células endoteliales, células de pulmón, células óseas, células madre, células mesenquimatosas, células neuronales (por ejemplo, meninges, astrocitos, neuronas motoras, células de los ganglios de la raíz dorsal y neuronas motoras de cuerno anterior), células fotorreceptoras (por ejemplo, bastones y conos), células epiteliales pigmentadas de la retina, células secretoras, células cardíacas, adipocitos, células del músculo liso vascular, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, linfocitos Beta, células pituitarias, células del revestimiento sinovial, células ováricas, células testiculares, fibroblastos, linfocitos B, linfocitos T, reticulocitos, leucocitos, granulocitos y células tumorales.

65 Después de la transfección de una o más células diana por, por ejemplo, los polinucleótidos encapsulados en una o más nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas o liposómicas descritas en el

presente documento, la producción del producto (por ejemplo, un polipéptido o proteína) codificada por dicho polinucleótido puede preferentemente se estimula y se mejora la capacidad de dichas células diana para expresar el polinucleótido y producir, por ejemplo, un polipéptido o proteína de interés. Por ejemplo, la transfección de una célula diana por uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas que encapsulan ARNm potenciará (es decir, aumentará) la producción de la proteína o enzima codificada por dicho ARNm.

En algunas realizaciones, puede ser deseable limitar la transfección del ARNm a ciertas células o tejidos. Por ejemplo, el hígado representa un órgano diana importante para las composiciones de la presente invención en parte debido a su papel central en el metabolismo y producción de proteínas y, por consiguiente, enfermedades causadas por defectos en productos génicos específicos del hígado (por ejemplo, el ciclo de la urea trastornos) pueden beneficiarse de la dirección específica de las células (por ejemplo, hepatocitos). Por consiguiente, pueden explotarse las características estructurales del tejido diana para dirigir la distribución de las composiciones farmacéuticas de la presente invención (por ejemplo, una nanopartícula lipídica a base de HGT4001) a tales tejidos objetivo. Por ejemplo, para dirigir a los hepatocitos, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas o liposómicas descritas en el presente documento pueden dimensionarse de manera que sus dimensiones sean menores que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos en el hígado; por consiguiente, la una o más de tales nanopartículas lipídicas pueden penetrar fácilmente tales fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos diana. Como alternativa, una nanopartícula lipídica se puede dimensionar de manera que las dimensiones del liposoma sean de un diámetro suficiente para limitar o evitar expresamente la distribución en ciertas células o tejidos. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento pueden dimensionarse de manera que sus dimensiones sean mayores que las fenestraciones de la capa endotelial que recubre los sinusoides hepáticos para limitar así la distribución de la nanopartícula lipídica liposómica a los hepatocitos. En tal realización, las composiciones liposómicas grandes (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) no penetrarán fácilmente las fenestraciones endoteliales, y en su lugar serían eliminadas por las células macrófagas de Kupffer que recubren los sinusoides hepáticos. El dimensionado de, por ejemplo, las nanopartículas lipídicas que comprenden la composición farmacéutica puede por lo tanto proporcionar una oportunidad para manipular adicionalmente y controlar con precisión el grado en que la expresión de los polinucleótidos encapsulados se puede potenciar en una o más células diana. Generalmente, el tamaño de al menos una de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas de la presente invención es menor de aproximadamente 125 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, 25 nm o 10 nm tras la reconstitución en PBS.

De forma similar, las composiciones descritas en el presente documento se pueden preparar para distribuir preferentemente a otros tejidos, células u órganos diana, tales como corazón, pulmones, riñones, bazo. Por ejemplo, las nanopartículas lipídicas descritas en el presente documento pueden prepararse para lograr una administración mejorada a las células y tejidos diana. De acuerdo con esto, las composiciones descritas en el presente documento pueden enriquecerse con lípidos catiónicos, no catiónicos y modificados con PEG adicionales para dirigirse a tejidos o células diana.

En algunas realizaciones, los compuestos y las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas basadas en HGT4002) se distribuyen a las células y tejidos del hígado para potenciar la administración, transfección y la posterior expresión de los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) encapsulado en el mismo por las células y tejidos del hígado (por ejemplo, hepatocitos) y la producción correspondiente del polipéptido o proteína codificada por dicho polinucleótido. Si bien tales composiciones se pueden distribuir preferentemente en las células y tejidos del hígado, los efectos terapéuticos de los polinucleótidos expresados y la posterior producción de una proteína codificada de ese modo no necesitan limitarse a las células y tejidos diana. Por ejemplo, los hepatocitos diana pueden funcionar como un "reservorio" o "depósito" capaz de expresar o producir, y excretar periféricamente o sistémicamente una proteína o enzima funcional, como se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional n.º PCT/US2010/058457 y en la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/494.881. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención (que comprenden, por ejemplo, nanopartículas lipídicas basadas en HGT4005) puede dirigir hepatocitos y/o distribuirse preferentemente a las células y tejidos del hígado tras la administración. Después de la transfección de los hepatocitos diana por el ARNm encapsulado en una o más de tales nanopartículas lipídicas, el ARNm se expresa (por ejemplo, se traduce) y un producto funcional (por ejemplo, un polipéptido o proteína) se excreta y se distribuye sistémicamente, donde dicho producto funcional puede ejercer un efecto terapéutico deseado.

Los polinucleótidos encapsulados en uno o más de los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposómicas divulgados en el presente documento pueden administrarse y/o transfectar células o tejidos diana. En algunas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados son capaces de ser expresados y los productos polipeptídicos funcionales producidos (y en algunos casos excretados) por la célula diana, confiriendo así una propiedad beneficiosa a, por ejemplo, las células o tejidos diana. Dichos polinucleótidos encapsulados pueden codificar, por ejemplo, una hormona, enzima, receptor, polipéptido, péptido u otra proteína de interés. En ciertas realizaciones, dichos polinucleótidos encapsulados también pueden codificar un ARN interferente pequeño (ARNip) o ARN antisentido con el fin de modular o, de otro modo, disminuir o eliminar 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 acción sentido o antisentido (por ejemplo, modulando la expresión de un gen diana o ácido nucleico).

5 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 semivida de tal polinucleótido o que mejoran o de otra manera facilitan la traducción de dicho polinucleótido.

10 También se contempla la coadministración de uno o más polinucleótidos únicos a células diana mediante los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento, por ejemplo, combinando dos agentes terapéuticos o polinucleótidos únicos en una única nanopartícula lipídica. También se contempla la administración de uno o más polinucleótidos encapsulados a una o más células diana para tratar un único trastorno o deficiencia, en el que cada uno de dichos polinucleótidos funciona mediante un mecanismo de acción diferente. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas o liposómicas de la presente invención pueden comprender un primer ARNm que, por ejemplo, está encapsulado en una nanopartícula lipídica y destinado a corregir una proteína endógena o deficiencia de enzima, y un segundo polinucleótido destinado a desactivar o "derribar" un mal funcionamiento endógeno polinucleótido y su proteína o producto enzimático. Tales polinucleótidos encapsulados pueden codificar, por ejemplo, ARNm y ARNip.

20 Mientras que los polinucleótidos transcritos *in vitro* (por ejemplo, ARNm) pueden transfectarse en las células diana, tales polinucleótidos pueden degradarse rápida y eficientemente por la célula *in vivo*, haciendo que tales polinucleótidos sean ineficaces. Además, algunos polinucleótidos son inestables en los fluidos corporales (particularmente suero humano) y pueden degradarse o digerirse incluso antes de alcanzar una célula diana. Además, dentro de una célula, un ARNm natural puede descomponerse con una semivida de entre 30 minutos y varios días. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los polinucleótidos encapsulados proporcionados en el presente documento y, en particular, los polinucleótidos de ARNm proporcionados en el presente documento, conservan preferentemente al menos alguna capacidad para expresarse o traducirse, para producir de ese modo una proteína o enzima funcional dentro de una o más células diana.

30 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y liposómicas comprenden uno o más de los compuestos lipídicos divulgados en el presente documento 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 por nucleasas *in vitro*) 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 diana. En ciertas realizaciones, la actividad de dichos polinucleótidos encapsulados (ARNm que codifica una proteína o enzima funcional) se prolonga durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, la actividad de los polinucleótidos puede prolongarse de manera que las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto sobre una base semisemanal o quincenal, o más preferentemente sobre una base mensual, bimensual, trimestral o anual. La actividad prolongada o extendida de las composiciones farmacéuticas de la presente invención y, en particular, del ARNm encapsulado, está directamente relacionada con la cantidad de proteína o enzima funcional traducida a partir de dicho ARNm. De forma 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 consenso de Kozac desempeña un papel en el inicio de la traducción de proteínas y la inclusión de dicha secuencia de consenso Kozac en los polinucleótidos de ARNm encapsulados puede extender o prolongar adicionalmente la actividad de los polinucleótidos de ARNm. Además, la cantidad de proteína o enzima funcional producida por la célula diana es una función de la cantidad de polinucleótido (por ejemplo, ARNm) administrado a las células diana y la estabilidad de dicho polinucleótido. En la medida en que la estabilidad de los polinucleótidos encapsulados por las composiciones de la presente invención pueda mejorarse o mejorarse, la semivida, la actividad de la proteína o enzima traducida y la frecuencia de dosificación de la composición pueden ampliarse adicionalmente.

55 En ciertas realizaciones, los polinucleótidos pueden modificarse químicamente, por ejemplo, para conferir estabilidad (por ejemplo, estabilidad con respecto a la versión de tipo natural o natural del ARNm y/o la versión del ARNm naturalmente endógeno a las células diana). Por consiguiente, en algunas realizaciones, el ARNm encapsulado proporcionado en el presente documento comprende al menos una modificación química que confiere una estabilidad aumentada o potenciada al polinucleótido, que incluye, por ejemplo, resistencia mejorada a la digestión con nucleasas *in vivo*. Como se usa en el presente documento, las frases "modificaciones químicas" y "químicamente modificadas" como tales términos se refieren a los polinucleótidos proporcionados en el presente documento, incluyen al menos una alteración que preferentemente mejora la estabilidad y hace que el polinucleótido sea más estable (por ejemplo, resistente a la digestión con nucleasas) que el tipo salvaje o versión de origen natural de ese polinucleótido. Los términos "estable" y "estabilidad" como tales términos se refieren a los polinucleótidos encapsulados por las composiciones farmacéuticas y liposómicas de la presente invención, y particularmente con respecto al ARNm, se refieren a resistencia incrementada o potenciada a la degradación mediante, por ejemplo, nucleasas (es decir, endonucleasas o exonucleasas) que normalmente son capaces de degradar dicho ARN. Una mayor estabilidad puede incluir, por ejemplo, menos sensibilidad a la hidrólisis u otra destrucción por enzimas

endógenas (por ejemplo, endonucleasas o exonucleasas) o afecciones dentro de la célula o tejido diana, aumentando o mejorando así la residencia de dichos polinucleótidos en la célula diana, tejido, sujeto y/o citoplasma. Las moléculas de ARNm estabilizadas proporcionadas en el presente documento demuestran semividas más largas en relación con sus contrapartidas naturales no modificadas (por ejemplo, la versión de tipo salvaje del polinucleótido).

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

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

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

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

Se cree que la cola 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, lo que hace que el ARN sea más estable. Las colas de poli A se pueden agregar usando una variedad de técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, las colas largas de poli A se pueden agregar a ARN sintético o transcrito *in vitro* utilizando la poli A polimerasa (Yokoe, et al. *Nature Biotechnology*. 1996; 14: 1252-1256) Un vector de transcripción también puede codificar colas largas de poli A. Además, las colas de poli A se pueden agregar mediante transcripción directamente de productos de PCR. La cola de poli A también se puede ligar al extremo 3' de un ARN sentido con ARN ligasa (véase, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª ed., Ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: edición de 1991). En ciertas realizaciones, la longitud de la cola de poli A es al menos aproximadamente 90, 200, 300, 400 al menos 500 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la longitud de la cola de poli A se ajusta para controlar la estabilidad de una molécula de ARNm con sentido modificado en las

composiciones de la invención y, por lo tanto, la transcripción de la proteína. Por ejemplo, dado que la longitud de la cola de poli A puede influir en la semivida de una molécula de ARNm sentido, la longitud de la cola de poli A se puede ajustar para modificar el nivel de resistencia del ARNm a nucleasas y controlar así el curso del tiempo de expresión de polinucleótidos y producción de proteínas en una célula diana. En ciertas realizaciones, las moléculas de polinucleótidos estabilizadas son suficientemente resistentes a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por nucleasas), de manera que puedan administrarse a la célula diana sin una nanopartícula lipídica.

En ciertas realizaciones, las modificaciones químicas son modificaciones de bloqueo terminal de los uno o más polinucleótidos que comprenden las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, tales moléculas de ARNm pueden modificarse mediante la incorporación de secuencias no traducidas 3' y/o 5' (UTR) que no se encuentran naturalmente en el polinucleótido de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, la secuencia flanqueante 3' y/o 5' que flanquea naturalmente un ARNm y codifica una segunda proteína no relacionada se puede incorporar a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm que codifica una proteína funcional para modificarla. Por ejemplo, secuencias 3' o 5' de moléculas de ARNm que son estables (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 polinucleótido de ARNm sentido para aumentar la estabilidad de la molécula de ARNm sentido.

También se contemplan en la presente invención modificaciones a las secuencias de ARNm hechas a uno o ambos extremos 3' y 5' del polinucleótido. Por ejemplo, la presente invención contempla modificaciones en el extremo 3' y/o 5' del ARNm para incluir una secuencia parcial de un gen 1 inmediato-temprano del CMV (IE1) o un fragmento del mismo para mejorar la resistencia a nucleasas y/o mejora la semivida del polinucleótido (tal como, por ejemplo, la SEQ ID NO:1). Además de aumentar la estabilidad de la secuencia de polinucleótidos de ARNm, se ha descubierto sorprendentemente la inclusión de una secuencia parcial de un gen 1 inmediato-temprano del CMV (IE1) (por ejemplo, a una o más de la región no traducida 5' y la región no traducida 3' del ARNm) mejora adicionalmente la traducción del ARNm. También se contempla la inclusión de una secuencia del gen de la hormona del crecimiento humano (hGH), o un fragmento del mismo en uno o ambos extremos 3' y 5' del polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para estabilizar adicionalmente el polinucleótido (tal como, por ejemplo, SEQ ID NO: 2). En general, las modificaciones químicas contempladas mejoran la estabilidad y/o las propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, semivida) del polinucleótido con relación a sus equivalentes no modificados, e incluyen, por ejemplo, modificaciones hechas para mejorar la resistencia de dichos polinucleótidos a la digestión *in vivo* con nucleasas.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica, las dos o más nanopartículas lipídicas comprendidas en la misma 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 ay estabilizan el polinucleótido, mejorando así el tiempo de residencia en el citoplasma de una célula diana. Tales reactivos conducen preferentemente a una semivida mejorada de un polinucleótido en las células diana. Por ejemplo, la estabilidad de un ARNm y la eficacia de la traducción pueden aumentarse mediante la incorporación de "reactivos estabilizantes" que forman complejos con los polinucleótidos (por ejemplo, ARNm) que se producen de manera natural dentro de una célula (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.677.124) La incorporación de un reactivo estabilizante se puede llevar a cabo, por ejemplo, combinando la cola de 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 estabilizantes a modo de ejemplo incluyen una o más proteínas, péptidos, aptámeros, proteína accesoria de l traducción, proteínas de unión a ARNm y/o factores de iniciación de la traducción.

La estabilización de las composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) también puede mejorarse mediante el uso de restos inhibidores de opsonización, que típicamente son polímeros hidrófilos grandes que están unidos química o físicamente o incorporados de otro modo en la nanopartícula lipídica (por ejemplo, mediante la intercalación de un anclaje soluble en lípidos en la membrana misma, o uniéndose directamente a grupos activos de lípidos de membrana). Estos polímeros hidrófilos que inhiben la opsonización forman una capa superficial protectora que disminuye significativamente la absorción de los liposomas por el sistema de monocitos y macrófagos y el sistema reticuloendotelial (por ejemplo, como se describe en Patente de Estados Unidos n.º 4,920,016) Por ejemplo, las demoras en la absorción de nanopartículas lipídicas por el sistema reticuloendotelial pueden facilitarse mediante la adición de un revestimiento de superficie de polímero hidrófilo sobre o en nanopartículas lipídicas para enmascarar el reconocimiento y la absorción de la nanopartícula lipídica basada en liposomas por el sistema reticuloendotelial. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden un polímero de polietilenglicol (PEG) o un lípido modificado con PEG para potenciar adicionalmente la administración de tales nanopartículas lipídicas a la célula y tejidos diana.

Cuando el ARN se hibrida con una molécula polinucleotídica complementaria (por ejemplo, ADN o ARN) puede protegerse de las nucleasas. (Krieg, et al. Melton. Methods in Enzymology. 1987; 155, 397-415) La estabilidad del ARNm hibridado probablemente se deba a la especificidad inherente de una sola cadena de la mayoría de las ARNasas. En algunas realizaciones, el reactivo estabilizante seleccionado para formar un complejo de un polinucleótido es una proteína eucariota (por ejemplo, una proteína de mamífero). En otra realización más, el

polinucleótido (por ejemplo, ARNm) para uso en la terapia de los sentidos se puede modificar mediante hibridación con una segunda molécula de polinucleótido. Si se hibridaba una molécula de ARNm completa con una molécula de polinucleótido complementaria, se puede reducir el inicio de la traducción. En algunas realizaciones, la región no traducida 5' y la región de inicio AUG de la molécula de ARNm pueden dejarse sin hibridar opcionalmente. Después de la iniciación de la traducción, la actividad de desenrollado del complejo ribosómico puede funcionar incluso en dúplex de alta afinidad para que pueda llevarse a cabo la traducción. (Liebhaber. J. Mol. Biol. 1992; 226: 2-13; Monia, et al. J Biol Chem. 1993; 268: 14514-22.) Se entenderá que cualquiera de los métodos divulgados anteriormente para potenciar 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.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para mejorar la administración de ARNm encapsulado en nanopartículas lipídicas a una o más células, tejidos u órganos diana. En algunas realizaciones, la administración mejorada a una o más células diana comprende aumentar la cantidad de polinucleótido que entra en contacto o se administra de otra manera a las células diana. En algunas realizaciones, potenciar la administración a las células diana comprende reducir la cantidad de polinucleótido que entra en contacto con las células no diana. En algunas realizaciones, potenciar la administración a las células diana comprende permitir la transfección de al menos algunas células diana con el polinucleótido encapsulado. En algunas realizaciones, el nivel de expresión del polinucleótido encapsulado por las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones farmacéuticas objeto y la producción correspondiente de la proteína o enzima funcional codificada por este se incrementa en las células diana.

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

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 del ARNm de la nanopartícula lipídica a un compartimiento intracelular de la célula diana. En algunas realizaciones, la molécula adicional facilita la administración del ARNm en, por ejemplo, el citosol, el lisosoma, la mitocondria, el núcleo, las nucleasas o el proteosoma de una célula diana. También se incluyen agentes que facilitan el transporte de la proteína traducida de interés desde el citoplasma a su ubicación intercelular normal (por ejemplo, en la mitocondria) para tratar deficiencias en ese orgánulo. En algunas realizaciones, el agente se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un péptido, un aptámero y un oligonucleótido.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención facilitan la producción endógena de un sujeto de una o más proteínas y/o enzimas funcionales, y en particular la producción de proteínas y/o enzimas que demuestran menos inmunogenicidad en relación con sus equivalentes preparados de forma recombinante. En ciertas realizaciones de la presente invención, las nanopartículas lipídicas comprenden ARNm que codifica una proteína o enzima deficiente. Tras la distribución de tales composiciones a los tejidos diana y la posterior transfección de tales células diana, el ARNm exógeno cargado o encapsulado en las nanopartículas lipídicas que comprenden las composiciones puede traducirse *in vivo* para producir una proteína o enzima funcional 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 de manera exógena o recombinante para producir una proteína o enzima traducida endógenamente, y producir de ese modo (y cuando corresponda excretar) una proteína o enzima funcional. Las proteínas o enzimas traducidas también pueden caracterizarse por el *in vivo* inclusión de modificaciones postraduccionales nativas que a menudo pueden estar ausentes en las proteínas o enzimas preparadas de forma recombinante, reduciendo así adicionalmente la inmunogenicidad de la proteína o enzima traducida.

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

La presente divulgación también contempla el direccionamiento discriminatorio de una o más células y tejidos diana mediante medios de direccionamiento tanto pasivos como activos. El fenómeno de la focalización pasiva explota los patrones de distribución natural de las nanopartículas lipídicas *in vivo* sin depender del uso de excipientes adicionales o medios para mejorar el reconocimiento de la nanopartícula lipídica por una o más células diana. Por

ejemplo, es probable que las nanopartículas lipídicas que están sujetas a fagocitosis por las células del sistema retículo-endotelial se acumulen en el hígado o el bazo y, en consecuencia, pueden proporcionar medios para dirigir pasivamente la administración de las composiciones a tales células diana.

5 Como alternativa, la presente invención contempla la dirección activa, que implica el uso de excipientes adicionales, a los que se hace referencia en el presente documento como "ligandos dirigidos" que pueden estar unidos (covalentemente o no covalentemente) a la nanopartícula lipídica para estimular la localización de dicha nanopartícula lipídica en ciertas células diana o tejidos diana. Por ejemplo, la dirección puede estar mediada por la inclusión de uno o más ligandos de dirección endógenos (por ejemplo, apolipoproteína E) en o sobre la nanopartícula lipídica para estimular la distribución a las células o tejidos diana. El reconocimiento del ligando de direccionamiento por los tejidos diana facilita activamente la distribución tisular y la captación celular de las nanopartículas lipídicas y/o sus contenidos por las células y tejidos diana. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una o más de las nanopartículas lipídicas que comprenden la formulación farmacéutica pueden comprender un ligando dirigido a la apolipoproteína E en dichas nanopartículas lipídicas para facilitar o estimular el reconocimiento y unión de dicha nanopartícula lipídica a receptores de lipoproteína de baja densidad endógenos. expresado, por ejemplo, por hepatocitos. Como se proporciona en el presente documento, la composición puede comprender un ligando capaz de potenciar la afinidad de las composiciones por una o más células diana. Los ligandos dirigidos se pueden unir a la bicapa externa de la nanopartícula lipídica durante la formulación o la postformulación. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Además, algunas nanopartículas lipídicas pueden comprender polímeros fusogénicos tales como PEAA, hemaglutinina, otros lipopéptidos (véase la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 08/835,281 y 60/083,294) y otras características útiles para la administración intracelular o *in vivo*. En otras realizaciones, las composiciones de la presente invención demuestran eficacias de transfección mejoradas, y/o demuestran una selectividad mejorada hacia las células diana o los tejidos de interés. Por lo tanto, se contemplan composiciones o nanopartículas lipídicas que comprenden uno o más ligandos (por ejemplo, Péptidos, aptámeros, oligonucleótidos, una vitamina u otras moléculas) que son capaces de potenciar la afinidad de las composiciones o sus nanopartículas lipídicas constituyentes y sus contenidos de polinucleótidos por una o más células o tejidos diana. Los ligandos adecuados pueden estar opcionalmente unidos o unidos a la superficie de la nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, el ligando de direccionamiento puede abarcar la superficie de una nanopartícula lipídica o puede encapsularse dentro de la nanopartícula lipídica. Los ligandos adecuados se seleccionan basándose en sus propiedades físicas, químicas o biológicas (por ejemplo, afinidad selectiva y/o reconocimiento de marcadores o características de la superficie celular diana). Los sitios diana específicos de la célula y su correspondiente ligando de direccionamiento pueden variar ampliamente. Los ligandos de direccionamiento adecuados se seleccionan de modo que se explotan las características únicas de una célula diana, permitiendo así que la composición discrimine entre células diana y no diana. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden llevar marcadores superficiales (por ejemplo, apolipoproteína B o apolipoproteína E) que mejoran selectivamente el reconocimiento de, o la afinidad a los hepatocitos (por ejemplo, por el reconocimiento y unión a dichos marcadores superficiales). Además, se esperaría que el uso de galactosa como ligando de direccionamiento dirigiera las composiciones de la presente invención a hepatocitos parenquimatosos, o como alternativa, se esperaría que el uso de residuos de azúcar que contienen manosa como ligando de direccionamiento dirigiera las composiciones de la presente invención a células endoteliales hepáticas (por ejemplo, manosa que contiene residuos de azúcar que se pueden unir preferentemente al receptor de la asialoglicoproteína presente en los hepatocitos). (Véase Hillery AM, et al. "Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists" (2002) Taylor & Francis, Inc). La presentación de tales ligandos de direccionamiento que se han conjugado con restos presentes en la nanopartícula lipídica facilita, por lo tanto, el reconocimiento y la absorción de las composiciones liposómicas de la presente invención por una o más células y tejidos diana. Los ejemplos de ligandos de direccionamiento adecuados incluyen uno o más péptidos, proteínas, aptámeros, vitaminas y oligonucleótidos.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), que incluye, pero no se limita a, humanos, primates no humanos, roedores y similares, a los que las composiciones farmacéuticas o liposómicas de la presente invención puede ser administrado. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

La capacidad de los compuestos y las composiciones farmacéuticas o liposómicas descritas en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) para modular o potenciar la expresión de polinucleótidos encapsulados y la producción de un polipéptido o proteína divulga medios novedosos y más eficaces de efectuar la producción *in vivo* de polipéptidos y proteínas para el tratamiento de una multitud de enfermedades o afecciones patológicas. Dichas 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 con éxito de polinucleótidos tales como ARNm a órganos diana tales como el hígado y, en particular, a hepatocitos, puede usarse para el tratamiento y la corrección de errores de metabolismo innato que se localizan en el hígado. Por consiguiente, los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los métodos relacionados divulgados en el presente documento se pueden emplear para tratar una amplia gama de enfermedades y afecciones patológicas, en particular aquellas enfermedades que se deben a deficiencias de proteínas o enzimas. Los polinucleótidos encapsulados por los compuestos o composiciones farmacéuticas y liposómicas descritas en el presente documento (por ejemplo, nanopartículas lipídicas basadas en

HGT4004) pueden codificar un producto funcional (por ejemplo, una proteína, enzima, polipéptido, péptido, ARN funcional y/o molécula antisentido), y preferentemente codifica un producto del que se desea la producción *in vitro*.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se usan para la administración de ARNm terapéutico para tratar una serie de trastornos. En particular, las composiciones de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la deficiencia de proteínas y/o enzimas. En ciertas realizaciones, el ARNm encapsulado en nanopartículas lipídicas codifica proteínas funcionales o enzimas que se excretan o secretan por una o más células diana en el fluido extracelular circundante (por ejemplo, ARNm que codifica hormonas y neurotransmisores). Como alternativa, en otra realización, el ARNm encapsulado por las

10 composiciones farmacéuticas y liposómicas de la presente invención codifica proteínas funcionales o enzimas que permanecen en el citosol de una o más células diana (por ejemplo, ARNm que codifica una enzima asociada con trastornos del ciclo de urea o de almacenamiento lisosómico). Otros trastornos para los cuales las composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles incluyen, aunque sin limitación, trastornos tales como la atrofia muscular espinal (SMA) relacionada con SMN1; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); galactosemia relacionada con GALT; fibrosis quística (CF); trastornos relacionados con SLC3A1, incluyendo cistinuria; trastornos relacionados con COL4A5 que incluyen el síndrome de Alport; deficiencias de galactocerebrosidasa; adrenoleucodistrofia ligada a X y adrenomieloneuropatía; enfermedad de Huntington; enfermedad de Parkinson; distrofias musculares (tales como, por ejemplo, de Duchenne y de Becker); enfermedades de hemofilia, tales como, por ejemplo, hemofilia B (FIX) y hemofilia A (FVIII); ataxia de Friedreich; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; TSC1 y esclerosis tuberosa relacionada con TSC2; síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB); sistinosis relacionada con CTNS; trastornos relacionados con FMR1, incluyendo el síndrome del cromosoma X frágil, síndrome de temblor/ataxia asociado al cromosoma X frágil y síndrome de fallo ovárico prematuro del cromosoma X frágil; síndrome de Prader-Willi; enfermedad de Fabry; telangiectasia hemorrágica hereditaria (AT); enfermedad de Niemann-Pick de tipo C1; enfermedades relacionadas con la lipofuscinosis ceroide neuronal, incluyendo lipofuscinosis ceroide neonatal juvenil (JNCL), enfermedad de Batten juvenil, enfermedad de Santavuori-Haltia, enfermedad de Jansky-Bielschowsky y deficiencias de PTT-1 y TPP1; ataxia infantil EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 y EIF2B5 con hipomielinización del sistema nervioso central/materia blanca desaparecida; CACNA1A y ataxia episódica relacionada con CACNB4 tipo 2; trastornos relacionados con MECP2, incluyendo el síndrome de Classic Rett, encefalopatía neonatal severa relacionada con MECP2 y síndrome PPM-X; síndrome de Rett atípico relacionado con CDKL5; enfermedad de Kennedy (SBMA); arteriopatía cerebral autosómica dominante relacionada con Notch-3 con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL); trastornos convulsivos relacionados con SCN1A y SCNIB; 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; enfermedad de Wilson; y enfermedad de Fabry. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos, y en particular ARNm, de la presente invención pueden codificar proteínas o enzimas funcionales. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden incluir ARNm que codifica agalsidasa alfa, eritropoyetina,  $\alpha$ 1-antitripsina, carboxipeptidasa N, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, N-acetilglucosaminidasa, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, beta-glucosidasa, galactosa-6-sulfato sulfatasa, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, glucocerebrosidasa, heparan sulfamidasa, hialuronidasa, galactocerebrosidasa u hormona de crecimiento humano.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas divulgados en el presente documento se pueden administrar a un sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones se formulan en combinación con uno o más polinucleótidos adicionales, vehículos, ligandos de direccionamiento o reactivos estabilizadores u otros excipientes adecuados. Las técnicas para formulación y administración de drogas se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, última edición.

Las composiciones farmacéuticas (es decir, 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 el método de administración., la programación de la administración, la edad del sujeto, el sexo, el peso corporal y otros factores relevantes para los expertos en la técnica. La "cantidad efectiva" para los fines del presente documento puede determinarse mediante consideraciones relevantes que son conocidas por los expertos en la investigación clínica experimental, las técnicas farmacológicas, clínicas y médicas.

55 En algunas realizaciones, la cantidad administrada es eficaz para lograr al menos cierta estabilización, mejora o eliminación de síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas del progreso, la regresión o la mejora de la enfermedad por los expertos en la materia. Por ejemplo, una cantidad adecuada y un régimen de dosificación es uno que causa al menos una expresión transitoria de uno o más polinucleótidos en las células diana.

Las rutas de administración adecuadas de los compuestos y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, administración oral, rectal, vaginal, transmucosa o intestinal; administración parenteral, que incluye inyecciones intramedulares, subcutáneas, intramusculares, así como intratecal, intracerebroventricular. Inyecciones o infusiones intraventriculares, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares directas. En determinadas realizaciones, la administración de los compuestos o composiciones (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) divulgados en el presente documento a un sujeto facilita el

contacto de dichos compuestos o composiciones con una o más células, tejidos u órganos diana.

5 Como alternativa, las 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 diana, preferentemente en una formulación de depósito o de liberación sostenida, de manera que el contacto de las composiciones farmacéuticas las células diana con las nanopartículas lipídicas constituyentes pueden facilitarse aún más. La liberación local puede verse afectada de varias maneras, dependiendo del tejido al que se va a dirigir. Por ejemplo, los aerosoles que contienen composiciones de la presente invención se pueden inhalar (para administración nasal, traqueal o bronquial); las composiciones de la presente invención se pueden inyectar en el sitio de lesión, manifestación de enfermedad o dolor, por ejemplo; las composiciones se pueden proporcionar en pastillas para aplicación oral, traqueal o esofágica; se puede administrar en forma de líquido, tableta o cápsula para administración al estómago o los intestinos, se puede administrar en forma de supositorio para aplicación rectal o vaginal; o incluso puede ser administrado al ojo mediante el uso de cremas, gotas o incluso inyección. Las formulaciones que contienen los compuestos divulgados en el presente documento en complejos con moléculas terapéuticas o ligandos 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. Como alternativa, tales composiciones se pueden aplicar quirúrgicamente sin el uso de polímeros o soportes.

20 En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se formulan de manera que sean adecuadas para la liberación prolongada de, por ejemplo, ARNm encapsulado en las mismas. Dichas composiciones de liberación prolongada se pueden administrar convenientemente a un sujeto a intervalos de dosificación extendidos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces al día, diariamente o cada dos días. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administran a un sujeto dos veces por semana, una vez a la semana, cada diez días, cada dos semanas, cada tres semanas, o más preferentemente 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, por vía intramuscular, subcutánea, intravítrea) para administrar o liberar un polinucleótido (por ejemplo, ARNm) durante períodos de tiempo prolongados. Preferentemente, los medios de liberación prolongada empleados se combinan con modificaciones (por ejemplo, modificaciones químicas) introducidas en los polinucleótidos para mejorar la estabilidad.

35 Aunque ciertas composiciones de la presente invención se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar la invención y no están destinados a limitar la misma.

#### Vehículos de liberación de lípidos liofilizados

40 La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden vehículos de administración liposomal liofilizados que son capaces de efectuar la administración de ARNm encapsulado a una o más células, tejidos u órganos diana. En el presente documento se divulgan métodos y procesos para preparar tales composiciones farmacéuticas, así como métodos para tratar una o más enfermedades o afecciones mediante la administración de tales composiciones farmacéuticas a un sujeto que lo necesita. También se espera que las composiciones liofilizadas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) descritas en el presente documento tengan una estabilidad a largo plazo mejorada durante el almacenamiento bajo refrigeración o a temperatura ambiente (por ejemplo, temperatura ambiente) (por ejemplo, al menos uno, dos, tres, seis, nueve), doce, dieciocho, veinticuatro, treinta meses o más).

50 Como se usa en el presente documento para referirse a las composiciones liposómicas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas), los términos "liofilización" y "liofilizado" se refieren a un proceso mediante el cual dichas composiciones liposómicas se preparan en seco a partir de congelación rápida y en algunos casos una o más etapas de secado (por ejemplo, tras la exposición a condiciones de vacío), reduciendo de ese modo la concentración de agua en tales composiciones liposómicas para evitar o, como alternativa, limitar otras reacciones biológicas o químicas.

55 Las composiciones liposómicas de la invención pueden obtenerse realizando los ciclos de liofilización proporcionados en los ejemplos. Después de la congelación rápida de las composiciones liposómicas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas), las composiciones liposómicas se pueden secar mediante uno o más métodos adecuados, tales como exposición a condiciones de secado en vacío primario y secundario. En algunas realizaciones, las composiciones liposómicas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) se secan a las temperaturas y condiciones de vacío proporcionadas en los ejemplos. Tras la exposición a las condiciones de liofilización descritas en el presente documento, las composiciones de nanopartículas lipídicas liofilizados pueden rehidratarse usando, por ejemplo, un medio de rehidratación acuoso adecuado (por ejemplo, agua estéril, solución salina normal y/o dextrosa al 5 %) y administrarse a un sujeto.

65 Las composiciones farmacéuticas liofilizadas descritas en el presente documento se caracterizan por ser estables (por ejemplo, En relación con composiciones farmacéuticas no liofilizadas). Como se usa para describir las

composiciones liposómicas liofilizadas descritas en el presente documento, el término "estable" se refiere a una preclusión de tales composiciones liposómicas (por ejemplo, nanopartículas lipídicas) a partir de la agregación o floculación (por ejemplo, después de la reconstitución). La estabilidad de tales composiciones farmacéuticas liofilizadas se puede determinar con referencia a una serie de características físicas. Por ejemplo, la estabilidad puede determinarse con referencia al tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas que comprenden dicha composición. Preferentemente, después de la rehidratación de las composiciones liofilizadas descritas en el presente documento, la distribución de tamaño y las características físicas de la composición reconstituida son idénticas o como alternativas comparables a las composiciones antes de la liofilización. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la liofilización de las nanopartículas lipídicas no modifica o altera apreciablemente el tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas después de la liofilización y/o la reconstitución. Por ejemplo, tras la reconstitución (por ejemplo, con agua purificada) las nanopartículas lipídicas que comprenden una composición farmacéutica liofilizada no floculan o agregan, o como alternativa demuestran una floculación o agregación limitada o insignificante (por ejemplo, una determinada por el tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas reconstituidas).

En ciertas realizaciones, las composiciones liposómicas reconstituidas (es decir, nanopartículas lipídicas) de la invención exhiben una capacidad mejorada (por ejemplo, Aumentada) para transfectar una o más células diana. Por consiguiente, también se divulgan en el presente documento métodos para transfectar una o más células diana. Dichos métodos comprenden generalmente la etapa de poner en contacto la una o más células diana con, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas liofilizadas reconstituidas de la invención (por ejemplo, una nanopartícula lipídica basada en HGT4003 liofilizada que encapsula uno o más polinucleótidos) de modo que uno o más objetivos las células se transfectan con los materiales encapsulados en ellas (por ejemplo, uno o más polinucleótidos).

Se pueden usar uno o más lípidos (por ejemplo, lípidos catiónicos) como un componente de un vehículo de administración de lípidos (es decir, nanopartículas lipídicas) en las composiciones de la invención. Como se ha descrito anteriormente, un vehículo de administración de lípidos adecuado es una nanopartícula lipídica que comprende un ácido nucleico, el lípido catiónico escindible tal como, por ejemplo, HGT4003, HGT4004 y HGT4005 divulgados anteriormente, o mezclas del lípido catiónico escindible y un lípido catiónico adicional seleccionado de el grupo formado por C12-200, ICE, DOTMA, DOGS, DOSPA, DODAP, DOTAP, DSDMA, DODMA DLinDMA DLenDMA DDAB DMRIE CLinDMA CpLinDMA DMOBA DOcarbDAP DLinDAP DLincarbDAP DLinCDAP DLin-K-DMA DLin-K-XTC2-DMA, DLinKC2-DMA, HGT5000, HGT5001, HGT5002, o mezclas de los mismos.

Otros componentes adecuados de los vehículos de administración de lípidos incluyen lípidos no catiónicos, lípidos auxiliares, tales como, por ejemplo, colesterol y lípidos modificados con PEG como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, una nanopartícula lipídica puede prepararse usando HGT4003, DOPE, CHOL y DMG-PEG2000. Una nanopartícula lipídica puede estar compuesta por combinaciones de lípidos adicionales en diversas relaciones, que incluyen, por ejemplo, HGT4001, 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 del lípido (s) seleccionado (s), la naturaleza de las células o tejidos diana pretendidos y las características de los materiales o polinucleótidos que debe administrar la nanopartícula lipídica. Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la saturación de la cadena alquílica, así como el tamaño, la carga, el pH, la pKa, la fusogenicidad y la toxicidad del/los lípido (s) seleccionado (s).

Los vehículos de administración de lípidos liofilizados comprenden además al menos un lioprotector. El término "lioprotector" se usa en el presente documento para referirse a uno o más compuestos que, cuando se combinan con o se incluyen en la preparación de uno o más de los compuestos liposómicos divulgados en el presente documento, aumenta (por ejemplo, aumenta) la estabilidad química y/o física de el compuesto liposomal (por ejemplo, una nanopartícula lipídica) durante la liofilización, almacenamiento o reconstitución de dicho compuesto liposomal. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la inclusión de uno o más lioprotectores en la nanopartícula lipídica puede mejorar o mejorar la estabilidad de la composición liofilizada (por ejemplo, en condiciones normales de almacenamiento) y/o facilitar la reconstitución de la composición liofilizada usando un medio de rehidratación, preparando de ese modo una formulación acuosa. En algunas realizaciones, las nanopartículas lipídicas se preparan y, antes de la liofilización, el tampón presente en la formulación liposómica puede reemplazarse (por ejemplo, mediante centrifugación) con un lioprotector adecuado (por ejemplo, una solución acuosa de sacarosa que comprende entre aproximadamente 1-50 % o 10-25). % de sacarosa). En algunas realizaciones, el lioprotector se incluye como parte del tampón o medio en el que las formulaciones de liposomal se preparan o liofilizan (por ejemplo, durante la hidratación, diafiltración y/o dilución). Los ejemplos de lioprotectores adecuados que pueden usarse para preparar las composiciones liofilizadas descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, trehalosa, dextrano (por ejemplo, 1,5 kDa, 5 kDa y/o 40 kDa), inulina (por ejemplo, 1,8 kDa y/o 4 kDa) y cualquier combinación de los mismos

Se cree que la inclusión de un lioprotector de azúcar durante la liofilización puede servir para estabilizar la composición liofilizada. (Véase, Anchordoquy, et al., J. Pharm. Sci. (2000) 89: 289 - 296.) Una posible explicación para la estabilización observada puede incluir la hipótesis de aislamiento de partículas, que se refiere a la formación de una matriz de azúcar que actúa como una barrera física entre las partículas liposómicas.

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

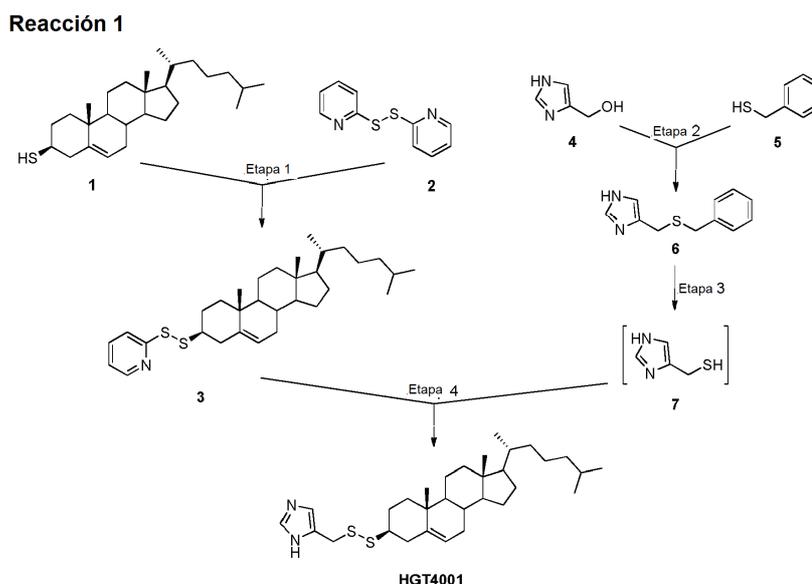
Los artículos "un" y "una" tal como se usan en la presente memoria descriptiva, a menos que se indique claramente lo contrario, se debe entender que incluyen los referentes en plural. Las descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, empleados o relevantes para un producto o proceso determinado, a menos que así el contexto indique lo contrario o se indique de otra manera evidente. La divulgación incluye realizaciones en las que está exactamente presente, se emplea o es relevante de otro modo un miembro del grupo para un producto o proceso dado. La divulgación también incluye realizaciones en las que están presentes, se emplean, o son relevantes de otro modo más de un miembro del grupo, o el grupo entero, para un producto o un proceso dado. Cuando los elementos se presentan como listas, (por ejemplo, en el grupo Markush o en un formato similar) debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se revela, y cualquier elemento (s) puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se hace referencia a la divulgación, o aspectos de la divulgación, que comprende elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la divulgación o aspectos de la divulgación consisten o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc. Por motivos de simplicidad, dichas realizaciones no se han expuesto específicamente en todos los casos en las presentes palabras en el presente documento.

Los ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones deben considerarse solo como ejemplos de referencia.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 - Preparación de HGT4001

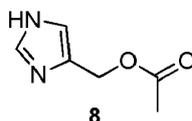
El compuesto 5-(((10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)disulfanil)metil)-1H-imidazol (disulfuro de imidazol-colesterol) (referido en el presente documento como "HGT4001") se preparó de acuerdo con el esquema de síntesis general que se muestra a continuación se muestra en la Reacción 1.



El compuesto intermedio 2-(((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)disulfanil)piridina (disulfuro de piridil colesterol) identificado como compuesto (3) se preparó de la siguiente manera. Se preparó una solución que comprendía 3,0 g

(7,45 mmoles) de compuesto (1) y 1,8 g (8,17 mmoles) de compuesto (2) en cloroformo (35 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante cuatro días. Se evaporó el disolvente, se añadió metanol (50 ml) al residuo y se evaporó. El sólido resultante se suspendió en metanol (50 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El producto disulfuro de piridil colesterol (3) se recogió mediante filtración, se lavó con metanol y se secó a alto vacío. Rendimiento: 3,6 g (95 %). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,43 (m, 1 H), 7,76 (m, 1 H), 7,62 (m, 1 H), 7,05 (m, 1 H), 5,32 (bd, J = 4 Hz, 1 H), 2,75 (m, 1 H), 2,35 (d, J = 8 Hz, 2 H), 2,05 -1,7 (m, 5 H), 1,7 -1,2 (m, 8 H), 1,2- 0,8 (m, 25 H), 0,65 (s, 3 H). MS (APCI, Pos): 512 (M + 1).

El compuesto intermedio 4-((benciltio)metil)-1H-imidazol identificado como compuesto (6) en la Reacción 1 se preparó de la siguiente manera. Se preparó una solución que comprendía 12,15 g (123,9 mmol) de compuesto (4) y 15,5 ml (132 mmol) de (5) en ácido acético glacial (200 ml) y se calentó a temperatura de reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar durante la noche. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en cloroformo (800 ml). La solución resultante se lavó con amoníaco diluido (agua 4:1:amoníaco concentrado, 200 ml) y salmuera (200 ml). La fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 500 g; metanol al 5-7 % en cloroformo) proporcionó 23 g del producto deseado. 4-((benciltio) metil)-1H-imidazol (Compuesto (6)), que representa un rendimiento del 91 %. La RMN mostró la presencia de una pequeña impureza (4 % en peso) que se identificó como un acetato y se identifica como el compuesto (8) a continuación. El material del compuesto 6 se usó para producir HGT4001 sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,60 (d, J = 1 Hz, 1 H), 7,35-7,2 (m, 5 H), 6,90 (d, J = 1 Hz, 1 H), 3,67 (s, 2 H), 3,62 (s, 2 H). MS (APCI, Pos): 205 (M + 1).



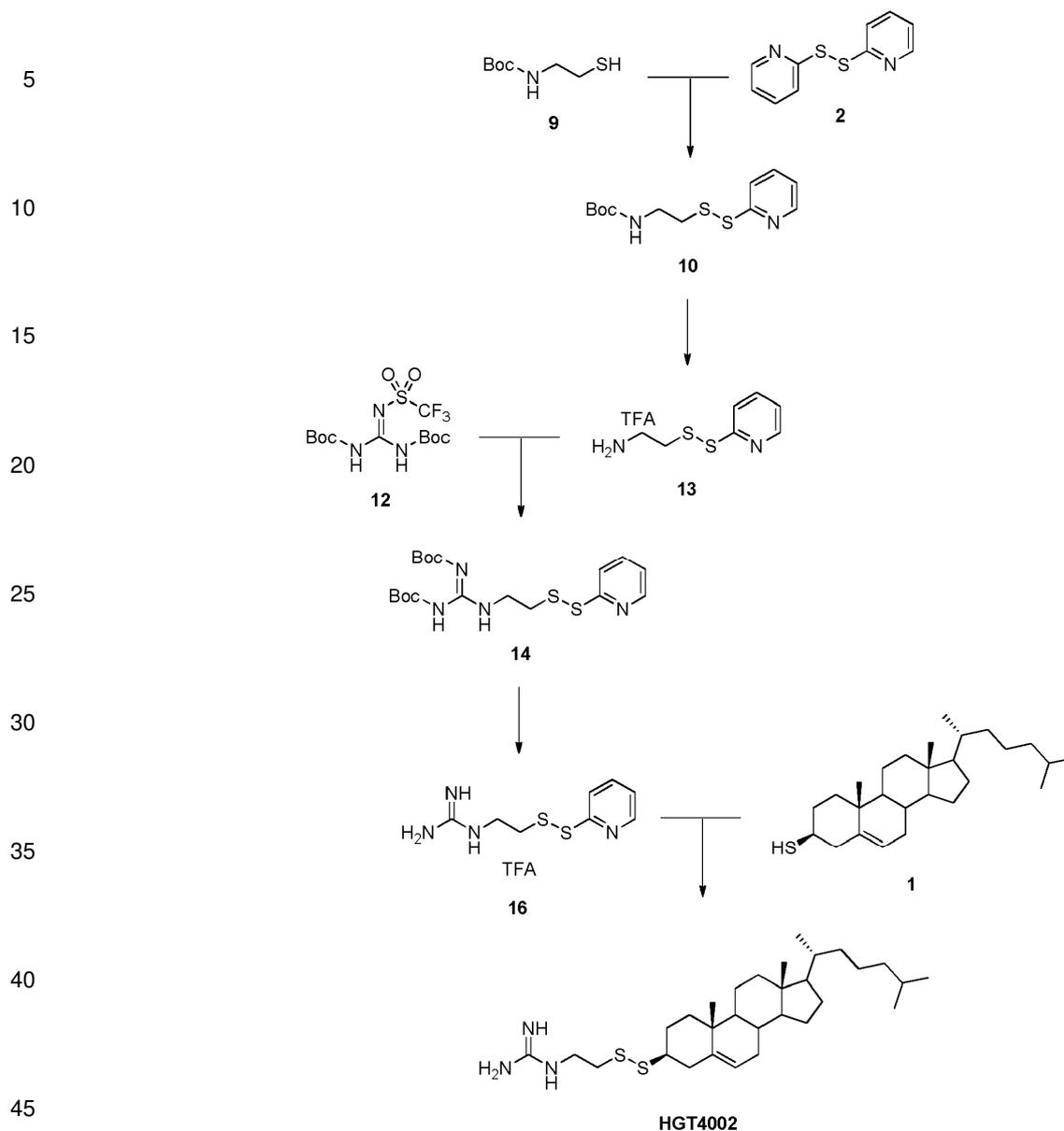
El compuesto intermedio (1H-imidazol-4-il)metanotiol identificado como compuesto (7) en el Esquema 1 se preparó de la siguiente manera. Se condensó una solución de amoníaco líquido (200 ml) sobre una suspensión que comprendía 15 g de compuesto (6) (70,5 mmol) en éter (30 ml). A esta solución amarilla resultante se añadieron 5 g de sodio (217 mmoles) en pequeñas porciones hasta que la mezcla permaneció azul oscuro. Luego se agitó durante 40 minutos. Se añadieron aproximadamente 10-15 g de NH<sub>4</sub>Cl hasta que desapareció el color y el disolvente se evaporó usando una corriente de nitrógeno para proporcionar el compuesto en bruto. (7), que se usó sin purificación.

El HGT4001 se preparó añadiendo 3,6 g de compuesto (3) (7 mmol) y 10 ml de trietilamina (71,8 mmol) a cloroformo (200 ml), y la solución resultante se desgasificó usando vacío y nitrógeno y se añadió rápidamente al compuesto (7) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en nitrógeno. Después de 3 días, se añadieron 200 ml de agua y la mezcla se extrajo con cloroformo (2 x 500 ml). Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y el disolvente se evaporó. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 200 g, se neutralizó usando 1 % de trietilamina en cloroformo, 2-5 % de etanol en cloroformo) proporcionó 1,25 g de HGT4001 (35 % de rendimiento en dos etapas). RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,61 (s, 1 H), 7,00 (s, 1 H), 5,33 (d, 1 H), 3,93 (s, 2 H), 2,58 - 2,46 (m, 1 H), 2,29 (d, 2 H), 1,91 (m, 5H), 1,61-0,84 (m, 33H), 0,66 (s, 3H). RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 141,6, 135,3, 134,3, 121,4, 118,1, 56,8, 56,2, 50,3, 50,2, 42,4, 39,8, 39,6, 39,1, 36,8, 36,2, 35,8, 31,9, 29,1, 28,3, 28,1, 24,4, 23,9, 22,9, 22,6, 21,0, 19,4, 18,8, 11,9. MS (APCI, Pos) 515 (M + 1). Elem. Anal.: C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, C (72,32 calc.), Encontrado 72,04; H (9,79 calc.), Encontrado 9,84; N (5,44, calc.), Encontrado 5,41.

### Ejemplo 2- Preparación de HGT4002

El compuesto 1-(2-(((3S,10R,13R)-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) disulfanil)etil)guanidina (referido en el presente documento como "HGT4002") se preparó de acuerdo con el esquema sintético general que se muestra a continuación en la Reacción 2.

## Reacción 2



50 El compuesto intermedio *(2-(piridin-2-ildisulfanil)etil)carbamato* de terc-butilo identificado como compuesto **(10)** en la Reacción 2 anterior se preparó añadiendo 5,0 g de compuesto **(9)** (28,2 mmol) y 6,82 g de compuesto **(2)** (31 mmol) a 100 ml de cloroformo (100 ml) y agitación a temperatura ambiente durante cuatro días para formar una solución. El disolvente se evaporó y el sólido amarillo resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 50-100 % de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar 9,0 g de compuesto impuro **(10)**. La RMN mostró la presencia del material deseado (56 % en peso), junto con el compuesto de material de partida **(2)** (24 %) y un compuesto disulfuro **(11)** (20 %) identificado a continuación. La mezcla obtenida se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

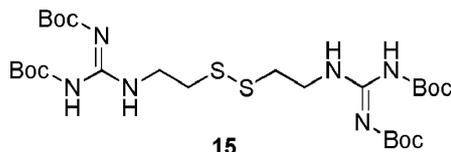
55 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,55-8,45 (m, 1 H), 7,9-7,8 (m, 2 H), 7,3-7,2 (m, 1 H), 7,07 (t, J = 5 Hz, 1 H), 3,25-3,15 (m, 2 H), 2,87 (t, J = 7 Hz, 2 H), 1,37 (s, 9 H). MS (APCI, Pos) 287 (M + 1), 231 (M + 1-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>).



65 El compuesto intermedio carbamato de *Bis-N,N'-terc-butil-1-(2-(piridin-2-ildisulfanil)etil)guanidina carbamato* **(14)** se preparó añadiendo 2,0 g de compuesto **(10)** (56 % de pureza, 3,9 mmoles) a diclorometano anhidro (12 ml) al que luego se añadió TFA (6 ml), y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El disolvente

se evaporó y el residuo se secó a alto vacío para proporcionar un compuesto en bruto. **(13)** (sal de TFA). La sal compuesta **(13)** se disolvió en 25 ml de diclorometano anhidro, se añadió trietilamina en exceso (7 ml) seguido de la adición de 2,7 g de compuesto **(12)** (7,0 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, seguido de dilución con cloroformo (175 ml) y lavado con agua (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml). La solución orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 0-10 % de metanol en cloroformo) para proporcionar 1,9 g de compuesto impuro **(14)**. La RMN mostró la presencia del compuesto deseado **(14)** (73 % en peso), junto con compuesto disulfuro **(15)** (27 % en peso) identificado a continuación. La mezcla se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11,48 (bs, 1H), 8,86 (bt, 1H), 8,55-8,5 (m, 1H), 7,65-7,6 (m, 2H), 7,25-7,15 (m, 1H), 3,8-3,65 (m, 2H), 2,99 (t, J = 6 Hz, 2 H), 1,51 (s, 9 H), 1,49 (s, 9 H). MS (APCI, Pos): complejo, no (M + 1) detectado.

15



El compuesto intermedio *sal de ácido trifluoroacético de 1-(2-(piridin-2-ilsulfanil)etil)guanidina*, identificado como compuesto **(16)** en la Reacción 2 anterior se preparó agregando 1,6 g de compuesto **(14)** (73 % de pureza, 2,8 mmoles) a diclorometano anhidro (33 ml), a lo que se añadió TFA (11 ml) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se evaporó y el residuo se secó a alto vacío para proporcionar un compuesto en bruto. **(16)** (sal de TFA), que se utilizó posteriormente en la siguiente etapa sin purificación.

El HGT4002 se preparó disolviendo la sal de TFA del compuesto **(16)** en diclorometano anhidro (50 ml), seguido de la adición de exceso de trietilamina (5 ml). Se añadieron 1,13 g de tiocolesterol **(1)** (2,8 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, seguido de dilución con cloroformo (200 ml) y lavado con agua (2 x 50 ml) y salmuera (100 ml). La solución orgánica resultante se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 0-30 % de etanol en cloroformo) y trituración en acetona para proporcionar 80 mg de HGT4002. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,60-6,90 (s ancho, 4 H), 5,35 (d, 1 H), 3,39 (t, 2 H), 2,84 (t, 2 H), 2,72 (m, 1 H), 2,28 (m, 2 H), 1,91 (m, 5 H), 1,58 -1,28 (m, 10 H), 1,20 - 0,82 (m, 23 H), 0,65 (s, 3 H). <sup>13</sup>C NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157,5, 141,5, 121,5, 56,7, 56,1, 50,1, 49,6, 42,4, 38,3, 36,7, 36,2, 35,7, 31,9, 29,0, 28,3, 27,9, 24,4, 23,7, 23,2, 22,9, 21,0, 19,5, 19,1, 12,2. MS (APCI, Pos): 520 (M + 1). Elem. Anal.: C<sub>30</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>, C (62,13 calc.), Encontrado 62,33; H (9,21 calc.), Encontrado 9,08; N (7,25, calc.), Encontrado 7,07; S (11,06, calcd.), Encontrado 10,83.

### Ejemplo 3 - Preparación de HGT4003

El compuesto *2-((2,3-Bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)-N,N-dimetiletanamina* (denominado en el presente documento "HGT4003") se preparó de acuerdo con el esquema de síntesis general que se muestra a continuación se muestra en la Reacción 3.

45

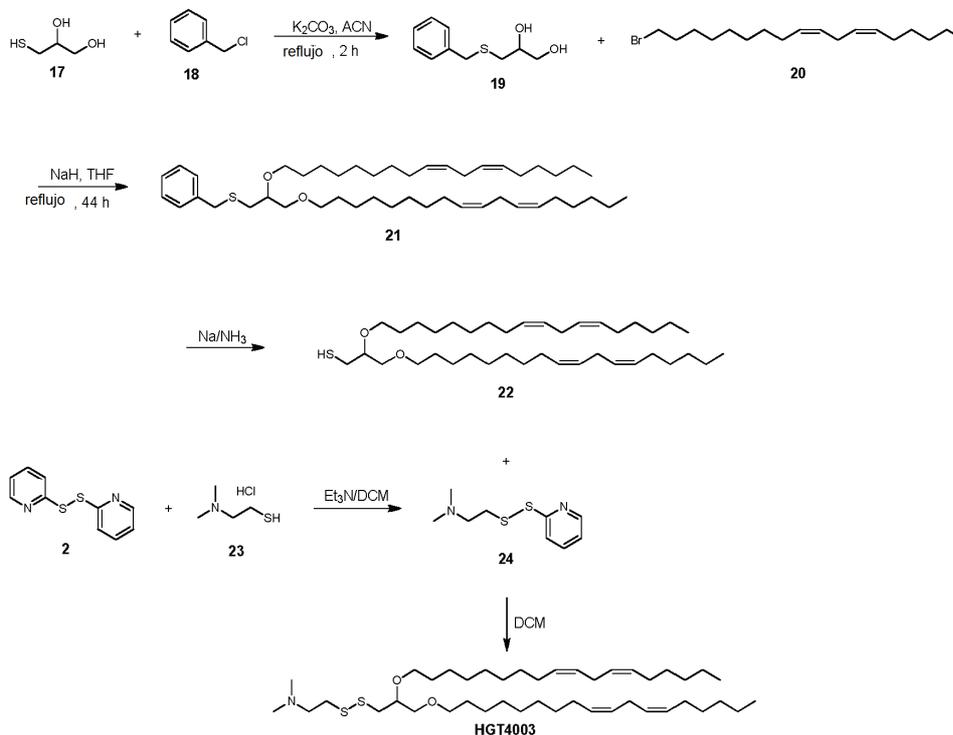
50

55

60

65

## Reacción 3



30 El compuesto intermedio 3-(*benciltio*)propano-1,2-diol, identificado como compuesto (**19**) en la Reacción 3 anterior se preparó añadiendo gota a gota 11,37 g de compuesto (**18**) (90,3 mmol) a una mezcla agitada de 9,73 g de compuesto (**17**) (90,3 mmol) y 18,64g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (135,1 mmol) en 60 ml de ACN. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 horas y después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró y el sólido se enjuagó con 20 ml de ACN. El filtrado se evaporó y el residuo líquido pálido se purificó por cromatografía en columna (eluyente: EtOAc al 10-100 % en hexanos) para dar 17,03 g de compuesto (**19**) como un líquido claro (95 %).

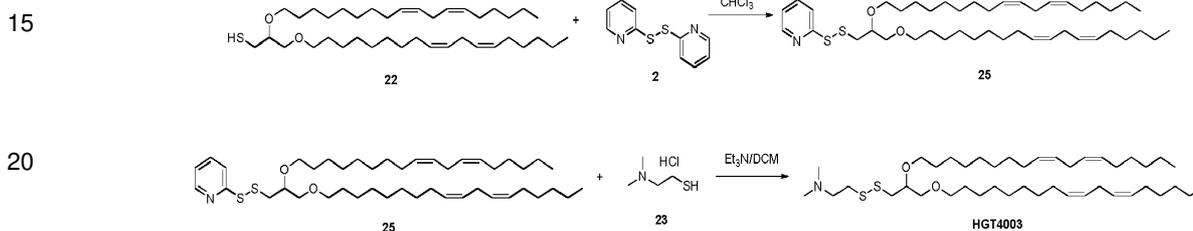
40 El compuesto intermedio *Bencilo*(2,3-bis((9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)sulfano, identificado como compuesto (**21**) en la Reacción 3 anterior se preparó añadiendo NaH (60 % en aceite mineral, 0,82 g, 20,5 mmol) a una mezcla agitada de 1,56 g de compuesto (**19**) (7,88 mmol) y 6,91 g de compuesto (**20**) (21,00 mmol) en THF (200 mL) bajo N<sub>2</sub>. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 44 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con Et<sub>2</sub>O (400 ml) y se lavó con agua (300 ml) y salmuera (300 ml). La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó, y el residuo líquido amarillo se purificó por cromatografía en columna (eluyente: 0-20 % de EtOAc en hexanos) para dar el compuesto (**21**) como un líquido amarillo claro (2,04 g, 37,3 %).

50 El compuesto intermedio 2,3-Bis((9*Z*,12*Z*)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi) propano-1-tiol, identificado como compuesto (**22**) en la Reacción 3 anterior se preparó añadiendo un Et<sub>2</sub>O (30 mL) solución de compuesto (**21**) (0,7 g, 1,01 mmol) a NH líquido<sub>3</sub> (30 mL) y condensado en un RBF de 2 cuellos a -78 °C bajo N<sub>2</sub>, seguido de la adición de pequeños trozos de Na (90 mg, 3,91 mmol). La mezcla resultante se agitó a -78°C durante 30 minutos cuando la TLC indicó la desaparición completa del compuesto (**21**) y reañadieron 340 mg de NH<sub>4</sub>Cl (6,34 mmol). El color azul profundo de la mezcla de reacción se desvaneció en un color amarillo claro en 10 minutos y se retiró el baño de acetona de hielo seco. La mezcla de reacción se purgó con N<sub>2</sub> mientras se calienta gradualmente a temperatura ambiente. Después de la mayor parte de NH<sub>3</sub> había sido impresionado por N<sub>2</sub> (el volumen de la mezcla de reacción se redujo a aproximadamente 20 ml) se añadió HCl acuoso (3 N, 30 ml). Esta mezcla se extrajo con DCM (60 ml). El extracto de DCM se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó El residuo líquido amarillo se purificó por cromatografía en columna (eluyente: 0-20 % de EtOAc en hexanos) para dar 490 mg de compuesto (**22**) como un líquido amarillo claro (80 %).

60 El compuesto intermedio *N,N*-dimetil-2-(piridin-2-ildisulfanil)etanamina, identificado como compuesto (**24**) en la Reacción 3 anterior, 2,8 g de compuesto (**2**) (12,7 mmol) y 1,41 g de compuesto (**23**) (10 mmol) se mezclaron en DCM (30 ml). La mezcla se agitó mientras se purgaba con N<sub>2</sub> durante 10 minutos y se añadieron 1,5 ml de Et<sub>3</sub>N (11,2 mmol). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y se aplicó en una columna de gel de sílice de 230 g. La columna se eluyó con 40-100 % de EtOAc/hexanos, seguido de 8-10 % de MeOH/DCM para dar 0,72 g de compuesto (**24**) como un líquido amarillo (34 %).

El HGT4003 se preparó combinando 487 mg de compuesto (**22**) (0.81 mmol) y 180 mg de compuesto (**24**) (0.84 mmol) en 2 ml de DCM, seguido de agitación a temperatura ambiente bajo N<sub>2</sub> por 16 horas. La solución de reacción se purificó por cromatografía en columna tres veces (eluyente: 20-100 % de EtOAc en hexanos) para dar 252 mg de **HGT4003** como un líquido amarillo claro (44 %). También se obtuvo a partir de purificaciones por cromatografía en columna 213 mg de compuesto (**25**) (37 %), identificado en la Reacción 4 a continuación. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,36-5,33 (m, 8 H), 3,65 (m, 1 H), 3,56 - 3,50 (m, 4 H), 3,43 (td, 2 H), 2,96 - 2,74 (m, 8 H), 2,60 (t, 2 H), 2,25 (s, 6 H), 2,04 (m, 8 H), 1,62-1,50 (m, 5 H), 1,39 -1,22 (m, 32 H), 0,88 (t, 6 H), RMN <sup>13</sup>C(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 130,3, 128,0, 71,8, 71,6, 70,6, 58,8, 45,5, 41,4, 36,9, 31,6, 30,1, 29,7, 29,5, 29,4, 27,3, 26,2, 25,7, 22,6, 14,2. MS (APCI, Pos): 709 (M + 1). Elem. Anal.: C<sub>43</sub>H<sub>81</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, C (72,92 calc.), Encontrado 72,75; H (11,53 calculado), encontrado 11,50; N (1,98, calc.), Encontrado 2,08; S (9,05, calc.), Encontrado 8,95.

#### Reacción 4



Una ruta alternativa a la síntesis de **HGT4003** se representa en la Reacción 4 anterior, empleando un bis(alquil) disulfuro de piridilo intermedio. El compuesto intermedio 2-((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-ilo)propil)disulfanil)piridina, identificado como compuesto (**25**) en la Reacción 4 anterior se preparó combinando 1,35 g de compuesto (**22**) (2,24 mmol) y 0,54 g de compuesto (**2**) (2,45 mmol) en 10 ml de CHCl<sub>3</sub> y se agitó a temperatura ambiente bajo N<sub>2</sub> durante 16 horas. La solución de reacción se purificó por cromatografía en columna tres veces (eluyente: 0-20 % de EtOAc en hexanos) para dar 1,1 g de compuesto (**25**) como un líquido amarillo claro (67 %). A continuación se añadieron 1,09 g de compuesto (**23**) (7,71 mmol) a la solución de CHCl<sub>3</sub> (20 ml) de compuesto (**25**) (1,1 g, 1,54 mmol) y Et<sub>3</sub>N (2,6 ml, 18,5 mmol) y se agitó a N<sub>2</sub>. La TLC después de 16 horas indicó la completa desaparición del compuesto (**25**). La solución de reacción se lavó luego con NaOH acuoso (1N, 20 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó. El residuo líquido amarillo se purificó por cromatografía en columna (eluyente: EtOAc al 5-100 % en hexanos) para dar 0,37 g de HGT4003 como un líquido amarillo claro (34 %).

#### Ejemplo 4

Las nanopartículas lipídicas que comprenden HGT4001, DOPE y DMG-PEG2000 y encapsulan el ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado para codones (FFL) (SEQ ID NO: 1) se formaron 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 con anticipación a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20 °C.

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

50 **ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado por codones (SEQ ID NO: 3):**

55

60

65

5 **X**AUGGAAGAUGCCAAAAACAUAAGAAGGGCCAGCGCCAUUCUACCCACUCGAAGACGGGA  
 CCGCCGGGAGCAGCUGCACAAAGCCAUGAAGCGCUACGCCUGGUGCCCGGCACCAUCGCC  
 UUUACCGAGCGACAUAUCGAGGUGGACAUUACCUACGCCGAGUACUUCGAGAUGAGCGUUCG  
 GCUGGCAGAAGCUAUGAAGCGCUAUGGGCUGAAUACAACCAUCGGAUCGUGGUGUGCAGCG  
 AGAAUAGCUUGCAGUUCUUCUUGCCGUGUUGGGUGCCUGUUCUUCGUGUGGGCUGUGGCC  
 10 CCAGCUAACGACAUCUACAACGAGCGGAGCUGCUGAACAGCAUGGGCAUCAGCCAGCCAC  
 CGUCGUUUUCGUGAGCAAGAAAGGGCUGCAAAAGAUCCUCAACGUGCAAAAGCAUGUAC  
 UCAUACAAAAGAUCAUCAUGGAUAGCAAGACCGACUACCAGGGCUUCCAAAGCAUGUAC  
 ACCUUCGUGACUUCUCAUUGCCACCCGGCUUCAACGAGUACGACUUCGUGCCGAGAGCUU  
 CGACCGGGACAAAACCAUCGCCUGAUCGAUACAGUAGUGGCAGUACCGGAUUGCCCAAGG  
 15 GCGUAGCCCUACCGCACCGCACCGCUUGUGUCCGAUUCAGUCAUGCCCGGACCCCAUCUUC  
 GGCAACCAGAUCAUCCCGACACCGCUAUCUCAGCGUGGUGCCAUUUACCCACGGCUUCGG  
 CAUGUUCACCACGCGUGGGCUACUUGAUCUGCGGCUUUCGGGUCGUGCUAUGUACCGCUUC  
 AGGAGGAGCUAUUCUUGCGCAGCUUGCAAGACUAUAAGAUUCAUUCUGCCUUGCGUGGCC  
 ACACUAUUUAGCUUCUUCGCUAAGAGCACUCUCAUCGACAAGUACGACCUAAGCAACUUGCA  
 20 CGAGAUCGCCAGCGGGCGGGCGCCGUCAGCAAGGAGGUAGGUGAGGGCCGUGGCCAAACGCU  
 UCCACCUACCAGGCAUCCGCCAGGGCUACGGCCUGACAGAAACAACCAGCGCCAUUCUGAUC  
 ACCCCGAAGGGGACGACAAGCCUGGCGCAGUAGGCAAGGUGGUGCCUUCUUCGAGGCUAA  
 GGUGGUGGACUUGGACACCGGUAAGACACUGGGUGUGAACCAGCGCGGCGAGCUGUGCGUCC  
 GUGGCCCAUGAUCUAGAGCGGCUACGUUAACAACCCCGAGGCUACAAACGCUUCAUCGAC  
 25 AAGGACGGCUGGUGCAGCAGCGGGCACAUCGCCUACUGGGACGAGGACGAGCACUUCUUCAU  
 CGUGGACCGGCUAAGAGCCUGAUCAAAUAACAAGGGCUACCAGGUAGCCCCAGCCGAACUGG  
 AGAGCAUCCUGCUGCAACACCCCAACUUCGACGCGGGGUCGCCGGCCUGCCCGACGAC  
 AGGACCGGCGAGCUGCCCGCGCAGUCGUCGUGGUAACACGGUAAAACCAUAGCCGAGAA  
 GGAGAUUCGUGGACUAUGUGGCCAGCCAGGUUACAACCGCCAAGAAGCUGCGCGGUGGUGUUG  
 30 UGUUCGUGGACGAGGUGCCUAAAGGACUGACCGGCAAGUUGGACGCCCGCAAGAUCGCGGAG  
 AUUCUCAUUAAGGCCAAGAAGGGCGCAAGAUCGCCGUGUAA**Y**

X = GGGAUCCUACC (SEQ ID NO: 5)

35 Y = UUUGAAUU (SEQ ID NO: 6)

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

Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml del lípido catiónico basado en imidazol HGT4001, DOPE y DMG-PEG2000 y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Separadamente, se preparó una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de FFL a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C. Concentración final = 0,69 mg/ml de ARNm de CO-FF (encapsulado).  $Z_{ave} = 70,3$  nm ( $Dv_{(50)} = 43,2$  nm;  $Dv_{(90)} = 80,3$  nm).

**Ejemplo 5**

El presente ejemplo ilustra que las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4003 proporcionan medios altamente eficaces para administrar construcciones de polinucleótidos a una o más células, tejidos y órganos diana. Las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4003 se formaron mediante métodos estándar de inyección de etanol. (Ponsa, *et al.*, *Int. J. Pharm.* (1993) 95: 51 - 56.) Las soluciones madre etanólicas de los lípidos se prepararon con anticipación a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20 °C.

El ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado por codones (FFL) se sintetizó mediante transcripción in vitro a partir de un molde de ADN plasmídico que codifica el gen, seguido por la adición de una estructura de capuchón en 5' (Cap1) (Fechter, POR EJEMPLO, *et al.*, *J. Gen. Virology* (2005) 86: 1239-1249) y una cola de poli (A) en 3' de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud según se determina mediante electroforesis en gel. Las regiones no traducidas en 5' y 3' presentes en cada producto de ARNm se representan como X e Y, respectivamente en la SEQ ID NO:4. El ARNm de FFL se almacenó en agua a una concentración final de 1 mg/ml a -80 °C hasta el tiempo de uso. Todas las concentraciones de ARNm se determinaron mediante el ensayo Ribogreen (Invitrogen). La

encapsulación de ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin la presencia de Triton-X 100 al 0,1 %. Se determinaron los tamaños de partículas (dispersión de luz dinámica (DLS)) y los potenciales zeta utilizando un instrumento Malvern Zetasizer en 1x PBS y soluciones 1 mM de KCl, respectivamente.

- 5 Se mezclaron alícuotas de soluciones etanólicas de 50 mg/ml de HGT4003, DOPE, colesterol y DMG-PEG2000 y se diluyeron con etanol hasta un volumen final de 3 ml. Por separado, se preparó una solución acuosa tamponada (citrate 10 mM/NaCl 150 mM, pH 4,5) de ARNm de FFL a partir de una solución madre de 1 mg/ml. La solución lipídica se inyectó rápidamente en la solución acuosa de ARNm y se agitó para producir una suspensión final en etanol al 20 %. La suspensión de nanopartículas resultante se filtró, se diafiltró con 1x PBS (pH 7,4), se concentró y se almacenó a 2-8 °C. Concentración final = 1,27 mg/ml de ARNm de CO-FF (encapsulado).  $Z_{ave} = 60,9$  nm ( $DV_{(50)} = 47,9$  nm;  $DV_{(90)} = 75,3$  nm).

15 Para determinar si las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4003 eran capaces de administrar construcciones polinucleotídicas encapsuladas a una o más células diana, se inyectó a los ratones CD-1 una dosis única de la nanopartícula lipídica que encapsulaba ARNm de FFL basada en HGT4003 y fueron sacrificados después de cuatro horas. Como se analiza a continuación, se administraron dosis únicas de la nanopartícula lipídica que encapsulaba ARNm de FFL basada en HGT4003 a los animales a través de una de las vías de administración intravenosa (IV), intracerebroventricular (ICV) o intratecal (IT). La actividad de la proteína luciferasa de luciérnaga producida en los hígados, bazo, cerebros y médulas espinales de los animales después de la expresión del ARNm de FFL se determinó en un ensayo de bioluminiscencia.

25 Brevemente, el ensayo de bioluminiscencia se realizó usando un sistema de ensayo de luciferasa Promega (elemento n° E1500/E4500 Promega). La preparación tisular se realizó de la siguiente manera: se descongelaron porciones de la muestra de tejido deseada (congelada instantáneamente), se lavó con agua RO/DI y se colocó en un tubo de homogeneización de perlas de cerámica. El tejido se trató con tampón de lisis y se homogeneizó. Tras someterse a cinco ciclos de congelación/descongelación seguidos de centrifugación a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de microcentrífuga. Repetir y almacenar los extractos de tejidos a -80 °C.

30 El reactivo de ensayo de luciferasa se preparó añadiendo 10 ml de tampón de ensayo de luciferasa al sustrato de ensayo de luciferasa y se mezcló mediante vortex. Se cargaron 20 µl de muestras de homogeneizado en una placa de 96 pocillos, seguido de 20 µl de control de placa para cada muestra. Por separado, se cargaron 120 µl de reactivo de ensayo de luciferasa en cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos y cada placa se insertó en las cámaras apropiadas usando un instrumento Biotek Synergy 2 y la luminiscencia se midió en unidades relativas de luz (URL).

35 Las formulaciones de nanopartículas lipídicas que encapsulan ARNm de FFL basadas en HGT4003 descritas en el presente documento se evaluaron administrando una única inyección intravenosa (IV) en bolo a los animales estudiados. Después de cuatro horas, se sacrificó a los animales y se recogieron el hígado y el bazo de cada animal. La luminiscencia a través de la proteína FFL producida a partir del mensaje de FFL exógeno administrado se detectó y se analizó. La **figura 1** ilustra un ejemplo usando un sistema de nanopartículas lipídicas basadas en HGT4003 administrado por vía intravenosa y demuestra un enriquecimiento de más de un orden de magnitud de la proteína FFL producida en el hígado en comparación con el bazo ( $2,34 \times 10^6$  URL/mg de proteína frente a  $1,71 \times 10^5$  URL/mg de proteína, respectivamente), que ilustra que el uso de las nanopartículas basadas en HGT4003 permite un enriquecimiento de materiales encapsulados en el hígado sobre el bazo.

45 Además, se evaluaron las formulaciones de nanopartículas lipídicas que encapsulan ARNm de FFL basadas en HGT4003 administrando una sola inyección en bolo al sistema nervioso central, ya sea mediante la vía de administración intracerebroventricular (ICV) o intratecal (IT) a los estudios en animales. Después de cuatro horas, se sacrificó a los animales y se extrajeron el cerebro y la médula espinal de cada animal. La luminiscencia a través de la proteína FFL producida a partir del mensaje FFL exógeno administrado se detectó y se analizó. Como se ilustra en **la figura 2**, después de la administración de las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4003, la producción de proteína FFL se enriqueció en el cerebro siguiendo la ruta de administración por vía ICV en comparación con la vía de administración IT.

55 Se observó una señal luminiscente detectable sobre la basal en todos los animales a los que se administraron las formulaciones de nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm de FFL basadas en HGT4003, independientemente de la vía de administración seleccionada. La presencia de una señal luminiscente sobre el fondo infiere la expresión del ARNm de FFL administrado exógenamente y la producción de la proteína luciferasa de luciérnaga a partir de dicho ARNm de FFL. La luminiscencia observada en el hígado de los animales mejoró sobre señales similares observadas en el bazo, lo que sugiere un enriquecimiento de las nanopartículas lipídicas en las células y los tejidos del hígado. De manera similar, cuando se administraron las nanopartículas encapsuladas con ARNm de FFL basadas en HGT4003 mediante la ruta de administración de ICV, la producción de proteína de FFL se enriqueció en el cerebro siguiendo la vía administración IT. Por consiguiente, el presente ejemplo ilustra que las nanopartículas lipídicas basadas en HGT4003 proporcionan medios altamente eficaces para administrar construcciones de polinucleótidos a una o más células, tejidos y órganos diana.

65

**Ejemplo 6 - Formulaciones liposómicas liofilizadas**

Las nanopartículas lipídicas se formaron mediante métodos estándar de inyección de etanol (Ponsa, *et al.*, *Int. J. Pharm.* (1993) 95: 51 - 56.) Las soluciones madre etanólicas de los lípidos se prepararon con anticipación a una concentración de 50 mg/ml y se almacenaron a -20 °C. Se almacenó ARNm de luciferasa de luciérnaga optimizado en codones (FFL) (SEQ ID NO: 3) en agua a una concentración final de 1 mg/ml a -80 °C hasta el momento de uso.

Todas las concentraciones de ARNm de FFL se determinaron mediante el ensayo Ribogreen (Invitrogen). La encapsulación de ARNm se calculó realizando el ensayo Ribogreen con y sin presencia de Triton-X 100 al 0,1 %. Los tamaños de partícula (dispersión dinámica de luz (DLS)) y los tamaños de partícula se determinaron usando un instrumento Malvern Zetasizer en 1x PBS y soluciones de KCl 1 mM, respectivamente. La actividad in vitro de las formulaciones de ARNm encapsulado se evaluó usando células 293T y se incubaron 10 µg de ARNm equivalente de la formulación seleccionada con las células 293T durante 8 horas a 37 °C. La producción de luciferasa se midió usando el kit Perkin Elmer BriteLite Plus.

En general, la liofilización de las nanopartículas lipídicas se llevó a cabo congelando los liposomas preparados en una solución que comprende un lioprotector (sacarosa) y posteriormente eliminando cualquier agua o humedad por sublimación al vacío. En particular, antes de la liofilización, el tampón presente en la formulación liposómica se reemplazó por sacarosa al 10 % mediante centrifugación. Las soluciones de nanopartículas lipídicas resultantes se sometieron después a un proceso de liofilización caracterizado por parámetros específicos para las etapas de congelación, secado primario y secado secundario, como se identifica en la Tabla 1 a continuación. La torta liofilizada se reconstituyó con la cantidad apropiada de agua purificada antes de someterse a la caracterización física y a los análisis bioquímicos divulgados a continuación.

**Tabla 1**

Fase	Temperatura (°C)	Vacío (mTorr)	Tiempo	Rampa/Espera
Congelación	5	500	6 horas	H
	-45	500		R
	-45	500		H
Secado primario	-45	100	60 horas	H
	-35	100		R
	-35	100		H
	-30	100		R
	-30	100		H
	-20	100		R
	-20	100		H
	0	100		R
Secado secundario	25	100	6 horas	R
	25	100		H

**Ejemplo 7**

Se preparó una formulación de una nanopartícula lipídica que comprendía ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) encapsulada en una nanopartícula lipídica C12-200: DOPE: CHOL: DMG-PEG2000 (40: 30: 20: 10, N/P2). Una porción del lote de la formulación de nanopartículas lipídicas preparada se liofilizó a continuación de acuerdo con el protocolo expuesto en la Tabla 1.

Las propiedades físicas observadas de las formulaciones de nanopartículas lipídicas frescas (no liofilizadas) y liofilizadas se compararon de acuerdo con los protocolos divulgados anteriormente y se encontró que eran consistentes. Como se ilustra en la Tabla 2 a continuación, el tamaño de partícula promedio ( $Z_{ave}$ ) para las nanopartículas lipídicas frescas y liofilizadas fueron 103,8 nm y 117,0 nm, respectivamente. El índice de polidispersidad (PDI) para las nanopartículas lipídicas frescas fue de 0,236 en comparación con 0,247 para las nanopartículas lipídicas liofilizadas. El  $Dv_{50}$  y  $Dv_{90}$  para las nanopartículas lipídicas frescas eran 60,2 nm y 156 nm, respectivamente en comparación con un  $Dv_{50}$  y  $Dv_{90}$  de 49,0 nm y 176 nm para las nanopartículas lipídicas

liofilizadas, respectivamente. En consecuencia, las características físicas observadas también sugieren que tanto las nanopartículas lipídicas frescas como las liofilizadas eran estables y, además, que los tamaños de partícula permanecían relativamente comparables.

5

**Tabla 2**

Lote 5926-48	Z <sub>ave</sub> (nm)	PDI	Dv <sub>50</sub> (nm)	Dv <sub>90</sub> (nm)
Antes de la liofilización	103,8	0,236	60,2	156
Después de la liofilización	117,0	0,247	49,0	176

10

**Ejemplo 8**

15

Se preparó una formulación de una nanopartícula lipídica que comprendía ARNm de luciferasa de luciérnaga (FFL) encapsulado en una nanopartícula lipídica DLinkC2-DMA: DOPE: CHOL: DMG-PEG2000 (50: 25: 20: 5, N/P 5). Un lote de la formulación de nanopartículas lipídicas preparada se liofilizó de acuerdo con el protocolo expuesto en la Tabla 5 a continuación.

20

Los procesos de liofilización se llevaron a cabo congelando los liposomas preparados en una solución que comprende un lioprotector (sacarosa) y posteriormente eliminando cualquier agua o humedad por sublimación al vacío. En particular, antes de la liofilización, el tampón en las formulaciones liposómicas se reemplazó por sacarosa al 10 % mediante centrifugación. Las soluciones liposómicas resultantes se sometieron después a un proceso de liofilización caracterizado por parámetros específicos para las etapas de congelación, secado primario y secado secundario identificadas en la Tabla 3 a continuación. La torta liofilizada se reconstituyó con una cantidad apropiada de agua purificada antes de las caracterizaciones físicas y análisis bioquímicos divulgados a continuación.

25

**Tabla 3**

Fase	Temperatura (°C)	Vacío (mTorr)	Tiempo	Rampa/Espera
<b>Congelación</b>	5	500	11 horas	H
	-45	500		R
	-45	500		H
<b>Secado primario</b>	-45	100	61 horas	H
	-35	100		R
	-35	100		H
	-30	100		R
	-30	100		H
	-20	100		R
	-20	100		H
	0	100		R
<b>Secado secundario</b>	25	100	8 horas	R
	25	100		H

30

35

40

45

50

55

Las formulaciones frescas (no liofilizadas) y liofilizadas preparadas a células 293T se usaron para administrar el ARNm de FFL encapsulado y la luminiscencia se determinó de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente. Como se ilustra en la Tabla 4 a continuación, el valor de luminiscencia de  $4,21 \times 10^6$  se observó para las nanopartículas lipídicas frescas antes de la liofilización en comparación con  $2,65 \times 10^6$  observado después de la reconstitución de la formulación liofilizada.

60

El tamaño de partícula promedio (Z<sub>ave</sub>) para las nanopartículas lipídicas frescas y liofilizadas fue 89,11 nm y 96,41 nm, respectivamente. El índice de polidispersidad (PDI) para las nanopartículas lipídicas frescas fue de 0,205 en comparación con 0,204 para las nanopartículas lipídicas liofilizadas. El Dv<sub>50</sub> y Dv<sub>90</sub> para las nanopartículas lipídicas frescas fueron 63,8 nm y 117 nm, respectivamente, en comparación con un Dv<sub>50</sub> y Dv<sub>90</sub> de 65,1 nm y 135 nm para las nanopartículas lipídicas liofilizadas, respectivamente. Como se demuestra en la Tabla 6, tanto el tamaño de

65

encapsulación del ARNm de FFL fue del 93 % y del 87 % para las nanopartículas lipídicas frescas y liofilizadas, respectivamente. Además, las características físicas observadas sugieren que tanto las nanopartículas lipídicas frescas como las liofilizadas eran estables y, además, que los tamaños de partícula permanecían relativamente comparables.

5

**Tabla 4**

Lote 6087-100-2	Z <sub>ave</sub> (nm)	PDI	Dv <sub>50</sub> (nm)	Dv <sub>90</sub> (nm)	Encapsulación (%)	Luminiscencia en células 293T
Nanopartículas de luciferasa FF antes de la liofilización	89,11	0,205	63,8	117	93	4,21 x 10 <sup>6</sup>
Resuspensión después de la liofilización	96,41	0,204	65,1	135	87	2,65 x 10 <sup>6</sup>

10

15

**Ejemplo 9**

Se preparó una formulación de una nanopartícula lipídica que comprende ARNm de eritropoyetina (EPO) (SEQ ID NO: 4), flanqueada por la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 en los extremos 5' y 3', respectivamente, y encapsulada en una nanopartícula lipídica DLinkC2- DMA: DOPE: CHOL: DMG-PEG2000 (50: 25: 20: 5, N/P 5). Un lote de la formulación de nanopartículas lipídicas preparada se liofilizó de acuerdo con el protocolo expuesto en la Tabla 3.

20

**ARNm de eritropoyetina humana (EPO) (SEQ ID NO: 4)**

25

```
AUGGGGGUGCACGAAUGUCCUGCCUGGCUGUGGCCUUCUCCUGUCCUGCGUCGUCUCCUCU
GGGCCUCCAGUCCUGGGCGCCCCACCACGCCUCAUCUGUGACAGCCGAGUCCUGGAGAGGU
ACCUCUUGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAAUAUCACGACGGCCUGUGCUGAACACUGCAGCUUG
AAUGAGAAUAUCACUGUCCAGACACCAAAGUAAUUUCUAUGCCUGGAAGAGGAUGGAGGU
CGGGCAGCAGGCCGUAGAAGUCUGGCAGGGCCUGGCCUUGCUGUCGGAAGCUGUCCUGCGGG
GCCAGGCCUUGUUGUCAACUCUCCAGCCUGGGAGCCCCUGCAGCUGCAUGUGGAUAAA
GCCGUCAGUGGCCUUCGCAGCCUACCCACUCUGCUUCGGGCUCUGGGAGCCCAGAAGGAAGC
CAUCUCCCCUCCAGAUGCGGCCUCAGCUGCUCCACUCCGAACAUCACUGCUGACACUUUCC
GCAAACUCUCCGAGUCUACUCCAUUUCCUCCGGGGAAAGCUGAAGCUGUACACAGGGGAG
GCCUGCAGGACAGGGGACAGAUGA
```

30

35

Las propiedades físicas observadas de la formulación de nanopartículas lipídicas tanto antes como después de la liofilización se compararon de acuerdo con los protocolos divulgados anteriormente y se descubrió que eran consistentes. Como se ilustra en la Tabla 5 a continuación, el tamaño de partícula promedio (Z<sub>ave</sub>) para las nanopartículas lipídicas frescas (no liofilizadas) y liofilizadas fue 85,9 nm y 95,4 nm, respectivamente, lo que sugiere que tanto las nanopartículas lipídicas frescas como las liofilizadas eran estables. El índice de polidispersidad (PDI) para las nanopartículas lipídicas frescas fue de 0,188 en comparación con 0,231 para las nanopartículas lipídicas liofilizadas. El Dv<sub>50</sub> y el Dv<sub>90</sub> para las nanopartículas lipídicas frescas fueron 61,0 nm y 112 nm, respectivamente, en comparación con un Dv<sub>50</sub> y Dv<sub>90</sub> de 67,2 nm y 134 nm para las nanopartículas lipídicas liofilizadas, respectivamente. La eficacia de encapsulación del ARNm de EPO fue del 94 % y del 86 % para las nanopartículas lipídicas frescas y liofilizadas, respectivamente. Como también se demuestra en la Tabla 7, tanto el tamaño de partícula como la eficacia de encapsulación se mantuvieron bien durante la liofilización.

40

45

Finalmente, se midió la proteína de la eritropoyetina producida por las células 293T usando el kit RY D Systems Human EPO Quantikine IVD ELISA. Como se representa en la Tabla 5, la proteína eritropoyetina producida después de la administración del ARNm de EPO a las células 293T tanto para las formulaciones previas como posteriores a la liofilización fue comparable, y no hubo diferencias significativas en la producción de proteína eritropoyetina al comparar las formulaciones de nanopartículas lipídicas antes y después de la liofilización.

50

**Tabla 5**

Lote 6087-100-4	Z <sub>ave</sub> (nm)	PDI	Dv <sub>50</sub> (nm)	Dv <sub>90</sub> (nm)	Encapsulación (%)	EPO (mUI/ml)
Nanopartículas de EPO antes de la liofilización	85,9	0,188	61,0	112	94	373,1
Resuspensión después de la liofilización	95,4	0,231	67,2	134	86	387,9

55

60

**Ejemplo 10**

65

Se realizó un estudio de estabilidad de seis meses sobre nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm de EPO liofilizado. Se determinaron la distribución del tamaño de partícula, la eficacia de encapsulación de ARNm así como la expresión de EPO en ratones CD-1.

5 La formulación lipídica comprendía ARNm de EPO encapsulado en KC2: DOPE: CHOL: DMGPEG2K (50: 25: 20: 5) como se describe en el Ejemplo 9. La relación N/P (definida como la relación entre el número de nitrógeno en los lípidos catiónicos y el número de fosfato en ácido nucleico) fue 5.

10 Se almacenó un vial a 2-8 grados C. Se almacenó un vial a temperatura ambiente. La humedad no se controló para ambas condiciones de almacenamiento.

La torta liofilizada se reconstituyó con la cantidad apropiada de agua para inyectables antes de la caracterización física y los estudios en animales.

15 El tamaño de partícula se obtuvo con Malvern Zetasizer Nano-ZS. La eficacia de encapsulación del ARNm en partículas de lípidos se determinó usando el kit de ensayo Invitrogen RiboGreen. El ARNm no encapsulado se detectó directamente. El ARNm total se midió después de la lisis de las nanopartículas lipídicas en presencia de 0,45 % p/v de Triton X-100. La eficacia de la encapsulación se calculó como (ARNm total - ARNm no encapsulado)/ARNm total x 100 %.

20 Se usaron ratones CD-1 de tipo silvestre para evaluar la expresión relativa de EPO después de una sola administración IV de dos formulaciones de nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm de hEPO. Los niveles de EPO en suero se midieron a las 6 horas de la administración de la dosis. Cuatro ratones CD-1 (2 machos, 2 hembras), de 7 semanas de edad, se utilizaron para este estudio. A su llegada, se aleatorios a los animales a 25 grupos de tratamiento que contenían 2 animales por grupo (1 macho, 1 hembra por grupo). El día 1, se pesaron los animales y se registraron los pesos corporales. Cada ratón recibió una sola dosis IV de 99 µg de ARNm/animal en un volumen de dosis de 300 µl/animal. A las 6 horas de la administración de la dosis, se sacrificó a los ratones por asfíxia por CO<sub>2</sub>, seguido de toracotomía y los volúmenes máximos obtenibles de sangre se recogieron y procesaron para obtener el suero. Todos los tratamientos administrados fueron bien tolerados en el ratón CD-1 después de una sola administración IV. Los niveles séricos de hEPO se midieron mediante ELISA. Se observó EPO en suero de 30 todos los animales de estudio que recibieron cualquiera de las formulaciones.

Los resultados de la prueba se resumen en la Tabla 6. No se observaron cambios significativos en la distribución del tamaño de las partículas después del almacenamiento de las nanopartículas lipídicas liofilizadas durante 6 meses tanto a temperatura de refrigeración como a temperatura ambiente. Además, la eficacia de encapsulación del ARNm en las nanopartículas lipídicas esencialmente no se modificó durante el almacenamiento. Estos resultados sugieren que la integridad de la partícula lipídica se mantuvo bien durante el almacenamiento en la configuración liofilizada. La estabilidad de 6 meses en condiciones aceleradas de temperatura ambiente admite una potencial vida útil de 2 años en condiciones de refrigeración. Además, se detectó hEPO en suero en ratones CD-1 de tipo silvestre a las 6 h después de la inyección intravenosa de suspensión reconstituida de nanopartículas lipídicas liofilizadas después del almacenamiento en refrigeración o temperatura ambiente. Estos resultados demuestran que la integridad de la partícula lipídica se protegió eficazmente durante el almacenamiento en la configuración liofilizada.

**Tabla 6**

Lote 6087-100-4	Z <sub>ave</sub> (nm)	PDI	Dv50 (nm)	Dv90 (nm)	Encapsulación (%)	hEPO en suero a las 6 h (mUI/ml)
Nanopartículas de EPO antes de la liofilización	85,9	0,188	61,0	112	94	No determinado
Resuspensión de nanopartículas liofilizadas que se almacenaron a 2-8 °C durante 6 meses	90,04	0,165	61,1	119	95	Macho 5,077
						Hembra 95,937
Resuspensión de nanopartículas liofilizadas que se almacenaron a temperatura ambiente durante 6 meses	92,06	0,156	67,0	124	94	Macho 25,015
						Hembra 61,855

60 Abreviaturas: 1) Zave (Zpromedio) es el valor medio de la distribución de la intensidad; 2) PDI (índice de polidispersidad) describe el ancho de distribución; 3) Dv50 es la mediana para una distribución del volumen; 4) Dv90 significa que el 90 por ciento de la distribución del volumen se encuentra por debajo de este valor.

**Ejemplo 11**

65

Se llevaron a cabo estudios de liofilización sobre nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm usando 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina como lioprotector. Para comparación, también se evaluó el lioprotector de sacarosa.

5 El ARNm se encapsuló en partículas de lípidos C12-200: DOPE: CHOL: DMGPEG2K (40: 30: 25: 5) mediante el método de dilución de etanol. La relación N/P era 20. El tampón en las formulaciones se reemplazó por una solución acuosa que contenía una cantidad apropiada de sacarosa o 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina mediante centrifugación antes de la liofilización. Las soluciones resultantes se sometieron a un proceso de liofilización caracterizado por parámetros específicos para las etapas de congelación, secado primario y secado secundario. La Tabla 7 describe un ciclo de liofilización para formulaciones que contienen sacarosa. La Tabla 8 describe un ciclo de liofilización para formulaciones que contienen 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina. La torta liofilizada se reconstituyó con una cantidad apropiada de agua purificada antes de la caracterización física y el análisis bioquímico. El tamaño de partícula se obtuvo con Malvern Zetasizer Nano-ZS. La eficacia de encapsulación del ARNm en partículas de lípidos se determinó usando el kit de ensayo Invitrogen RiboGreen. El ARNm no encapsulado se detectó directamente. El ARNm total se midió después de la lisis de nanopartículas lipídicas en presencia de 0,45 % p/v de Triton X-100. La eficacia de la encapsulación se calculó como (ARNm total - ARNm no encapsulado)/ARNm total x 100 %.

Se usaron ratones CD-1 de tipo salvaje para evaluar la expresión relativa de EPO en ratones después de una sola administración IV de dos formulaciones de nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARNm de EPO. Los niveles de EPO en el suero se midieron a las 6 horas después de la administración de la dosis. Se usaron tres ratones CD-1 macho, de 7 semanas de edad, en cada grupo. Al llegar, se aleatorizó los animales a grupos de tratamiento que contenían 3 animales por grupo. El día 1, se pesaron los animales y se registraron los pesos corporales. Cada ratón recibió una sola dosis IV de 15 µg de ARNm/animal en un volumen de dosis de 50 µl/animal. A las 6 horas de la administración de la dosis, se sacrificó a los ratones por asfixia con CO<sub>2</sub>, seguido de toracotomía y se recogieron volúmenes máximos obtenibles de sangre y se procesaron para suero. Todos los tratamientos administrados fueron bien tolerados en el ratón CD-1 después de una sola administración IV. Los niveles séricos de EPO se midieron por ELISA. Se observó EPO en suero de todos los animales de estudio que recibieron cualquiera de las formulaciones.

**Tabla 7**

Fase	Temperatura (°C)	Vacío (mTorr)	Tiempo	Rampa/Espera
Congelación	5	500	8 horas	H
	-45	500		R
	-45	500		H
Secado primario	-45	100	69 horas	H
	-35	100		R
	-35	100		H
	-30	100		R
	-30	100		H
	-20	100		R
	-20	100		H
	0	100		R
	0	100		H
	25	100		R
25	100	H		
Secado secundario	0	100	4 horas	

**Tabla 8**

Fase	Temperatura (°C)	Vacío (mTorr)	Tiempo	Rampa/Espera
Congelación	5	500	7 horas	H
	-45	500		R
	-45	500		H
Secado primario	-45	100	69 horas	H
	-20	100		R
	-20	100		H
	-10	100		R
	-10	100		H
	0	100		R
	0	100		H
	10	100		R
	10	100		H
	20	100		R
20	100	H		
Secado secundario	0	100	4 horas	

Todos los resultados de la prueba se resumen en la Tabla 9. Se observó crecimiento del tamaño de partícula durante la liofilización cuando se usó sacarosa como lioprotector en una relación en peso de 6:1 con respecto a los lípidos totales. Sin embargo, el tamaño de partícula se mantuvo bien cuando se usó 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina, en cambio, incluso a una relación en peso relativamente baja de 5:1. N/P fue 20. Además, la eficacia de la encapsulación del ARNm en las nanopartículas lipídicas se mantuvo bien durante la liofilización. Estos resultados sugieren que la integridad de la partícula lipídica se protegía de forma eficaz durante la liofilización. Además, los niveles de hEPO en suero en ratones CD-1 de tipo salvaje a las 6 horas de la administración de la dosis sn comparables antes y después de la liofilización. En resumen, la 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina es un lioprotector eficaz para las nanopartículas lipídicas encapsuladas con ARN formuladas con lípido C12-200.

**Tabla 9**

ID del lote	5926-101 nanopartículas antes de la liofilización	5926-101 resuspensión posterior a la liofilización	5926-154 nanopartículas antes de la liofilización	5926-154 resuspensión posterior a la liofilización
ARNm (mg/ml)	0,3	0,3	0,3	0,3
Lioprotector	N/A	sacarosa	N/A	2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina
Lioprotector/Lípidos totales	N/A	6:1	N/A	5:1
Zave (nm)	74,90	112,4	99,94	104,9
PDI	0,112	0,199	0,205	0,203
Dv50 (nm)	58,2	80,3	71,8	73,3
Dv90 (nm)	96,6	181	142	159
% de Encapsulación	83	76	83	91
EPO media en suero a las 6 h (mUI/ml)	no determinado	no determinado	142,279 ± 55,823	218,945 ± 72,294

Abreviaturas: 1)  $Z_{ave}$  ( $Z_{promedio}$ ) es el valor medio de la distribución de intensidad; 2) PDI (índice de polidispersidad) describe el ancho de distribución; 3) Dv50 es la mediana para una distribución de volumen; 4) Dv90 significa que el 90 por ciento de la distribución de volumen se encuentra por debajo de este valor.

Los ejemplos anteriores ilustran que las formulaciones de nanopartículas lipídicas liofilizadas demostraban características físicas equivalentes o equivalentes con respecto a las nanopartículas lipídicas no liofilizadas que se prepararon, que incluyen estabilidad comparable, tamaños de partículas de nanopartículas lipídicas y eficiencias de encapsulación. Con respecto a los polinucleótidos de ARNm encapsulados, las nanopartículas lipídicas liofilizados también demostraron una producción comparable de proteína. Por ejemplo, varias de las composiciones de nanopartículas lipídicas liofilizados evaluadas demostraron una producción comparable de proteína de luciferasa de luciérnaga determinada por la presencia de una señal luminiscente, y de ese modo infiriendo la expresión y/o producción del ARNm encapsulado administrado exógenamente. Los resultados anteriores sugieren que las composiciones y formulaciones de nanopartículas lipídicas liofilizadas descritas en el presente documento son estables y capaces de minimizar la degradación de compuestos encapsulados (por ejemplo, polinucleótidos). Se espera que tales composiciones de nanopartículas lipídicas liofilizados tengan una mayor vida útil tras el almacenamiento bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y refrigerada, presentando así medios atractivos para mejorar la disponibilidad y los costes potenciales asociados con tales composiciones farmacéuticas.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> TRANSLATE BIO, INC..  
 <120> LÍPIDOS ESCINDIBLES  
 20 <130> P071879EP  
 <140> No asignado todavía  
 <141> 2012-06-08  
 <150> EP12728004.8  
 <151> 2012-06-08  
 25 <150> PCT/US2012/041663  
 <151> 2012-06-08  
 <150> US61/494,745  
 <151> 2011-06-08  
 <150> US61/494,882  
 30 <151> 2011-06-08  
 <160> 11  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 140  
 35 <212> ARN  
 <213> Citomegalovirus humano  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(3)  
 40 <223>/note = "esta región puede o no estar presente"  
 <400> 1

ggacagaucg ccuggagacg ccauccacgc uguuuugacc uccauagaag acaccgggac 60

45 cgauccagcc uccgcggccg ggaacggugc auuggaacgc ggauuccccg ugccaagagu 120

gacucaccgu ccuugacacg 140

<210> 2  
 <211> 100  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

55 cggguggcau ccugugacc ccucccagu gccucuccug gccuggaag uugccacucc 60

agugcccacc agccuugucc uaauaaaauu aaguugcauc 100

<210> 3  
 60 <211> 1672  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 65 <223>/note = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

ES 2 795 110 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(11)  
 <223>/note = "5' región no traducida"  
 5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1665)..(1672)  
 <223>/note = "3' región no traducida"  
 <400> 3  
 10           gggauccuac cauggaagau gccaaaaaca uuaagaaggg cccagcgcca uucuacccac           60  
               ucgaagacgg gaccgccggc gagcagcugc acaagccau gaagcgcuac gccucggugc           120  
 15           ccggcaccau cgccuuuacc gacgcacaua ucgaggugga cauuaccuac gccgaguacu           180  
               ucgagaugag cguucggcug gcagaagcua ugaagcgcu ugggcugaau acaaaccauc           240  
               ggaucguggu gugcagcgag aauagcuugc aguucuucau gcccguguug ggugcccuugu           300  
 20           ucaucggugu ggcuguggcc ccagcuaacg acaucuaca cgagcgcgag cugcugaaca           360  
               gcaugggcau cagccagccc accgucguau ucgugagcaa gaaagggcug caaaagauc           420  
               ucaacgugca aaagaagcua ccgaucauac aaaagauc aucauggau agcaagaccg           480  
 25           acuaccaggg cuuccaaagc auguacaccu ucgugacuuc ccauuugcca cccggcuuca           540  
               acgaguacga cuucgugccc gagagcuucg accgggacaa aaccaucgcc cugaucauga           600  
 30           acaguagugg caguaccgga uugcccaagg gcguagcccu accgcaccgc accgcuugug           660  
               uccgauucag ucaugcccgc gaccccaucu ucggcaacca gaucaucucc gacaccgcua           720  
               uccucagcgu ggugccauuu caccacggcu ucggcauguu caccacgcug ggcuacuuga           780  
 35           ucugcggcuu ucgggucgug cucauguacc gcuucgagga ggagcuauuc uugcgcagcu           840  
               ugcaagacua uaagauucaa ucugcccugc uggugccac acuauuuagc uucuucgcu           900  
               agagcacucu caucgacaag uacgaccuaa gcaacuugca cgagaucgcc agcggcgggg           960  
 40           cgccgcucag caaggaggua ggugaggccg ugGCCAAACG CUUCCACCUA CCAGGCAUCC           1020  
               gccagggcua cggccugaca gaaacaacca gcgccauucu gaucaccccc gaaggggacg           1080  
               acaagccugg cgcaguaggc aagguggugc ccuucuuca ggcuaggug guggacuugg           1140  
 45           acaccgguaa gacacugggu gugaaccagc gcggcgagcu gugcguccgu ggccccauga           1200  
               ucaugagcgg cuacguuaac aaccccgagg cuacaaacgc ucucaucgac aagcagggcu           1260  
               ggcugcacag cggcgacauc gccuacuggg acgaggacga gcacuucuu aucguggacc           1320  
 50           ggcugaagag ccugaucaaa uacaagggu accagguagc cccagccgaa cuggagagca           1380  
               uccugcugca acaccccaac auucucgacg ccggggucgc cggccugccc gacgacgaug           1440  
 55           ccggcgagcu gcccgccgca gucgucgugc uggaacacgg uaaaaccaug accgagaagg           1500  
               agaucgugga cuauguggcc agccagguaa caaccgcaa gaagcugcgc ggugguguug           1560  
               uguucgugga cgaggugccu aaagcagcua ccggcaaguu ggacgcccgc aagaucggcg           1620  
 60           agauucucau uaaggccaag aagggcggca agaucgccgu gaaauuugaa uu           1672  
 <210> 4  
 <211> 582  
 <212> ARN  
 65 <213> Homo sapiens

ES 2 795 110 T3

<400> 4

	augggggugc acgaaugucc ugccuggcug uggeuucucc ugucccugcu gucgcucccu	60
5	cugggccucc caguccuggg cgtcccacca cgccucaucu gugacagccg aguccuggag	120
	agguaccucu uggaggccaa ggagggccag aauaucacga cgggcugugc ugaacacugc	180
	agcuugaaug agaauaucac ugucccagac accaaaguua auuucuaugc cuggaagagg	240
10	auggaggucg ggcagcaggc cguagaaguc uggcagggcc ugGCCcugcu gucggaagcu	300
	guccugcggg gccaggcccu guuggucaac ucuucccagc cgugggagcc ccugcagcug	360
	cauguggaua aagccgucag ugGCCuucgc agccucacca cucugcuucg ggcucuggga	420
15	gccagaagg aagccaucuc cccuccagau gcggccucag cugcuccacu ccgaacaauc	480
	acugcugaca cuuuccgcaa acucuuccga gucuacucca auuuccuccg gggaaagcug	540
20	aagcuguaca caggggaggc cugcaggaca ggggacagau ga	582

<210> 5  
 <211> 11  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223>/note = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 5  
 30 gggauccuac c 11  
 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <221> fuente  
 <223>/note = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 6  
 40 uuugaauu 8  
 <210> 7  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <221> fuente  
 <223>/note = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 7

50	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	90

<210> 8  
 <211> 200  
 55 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223>/note = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 8

65

# ES 2 795 110 T3

	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	60
	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	120
5	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	180 200
10	<p>&lt;210&gt; 9 &lt;211&gt; 300 &lt;212&gt; ARN &lt;213&gt; Secuencia artificial &lt;220&gt;</p>	
15	<p>&lt;221&gt; fuente &lt;223&gt;/note = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético" &lt;400&gt; 9</p>	
20	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	60 120
	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	180
25	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	240 300
30	<p>&lt;210&gt; 10 &lt;211&gt; 400 &lt;212&gt; ARN &lt;213&gt; Secuencia artificial &lt;220&gt;</p>	
35	<p>&lt;221&gt; fuente &lt;223&gt;/note = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético" &lt;400&gt; 10</p>	
40	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	60 120
	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	180
45	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p> <p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	240 300
	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	360
50	<p>aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa</p>	400
55	<p>&lt;210&gt; 11 &lt;211&gt; 500 &lt;212&gt; ARN &lt;213&gt; Secuencia artificial &lt;220&gt;</p>	
60	<p>&lt;221&gt; fuente &lt;223&gt;/note = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético" &lt;400&gt; 11</p>	
65		

ES 2 795 110 T3

	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
5	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
10	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	420
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	480
15	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	500
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar una nanopartícula lipídica liofilizada, dicho método comprendiendo:

- 5 (a) proporcionar una nanopartícula lipídica en una solución acuosa que comprende uno o más lioprotectores seleccionados del grupo que consiste de sacarosa, trehalosa, dextrano e inulina, en donde la nanopartícula lipídica es un liposoma que encapsula un ARNm y comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido PEG-modificado y colesterol; y
- 10 (b) liofilizar la nanopartícula lipídica realizando los pasos de congelar y secar rápidamente la nanopartícula lipídica a las condiciones de temperatura y vacío proporcionadas en las Tablas 1, 3, 7 u 8;

**Tabla 1**

Fase	Temperatura (°C)	Vacío (mTorr)	Tiempo	Rampa/Espera
Congelación	5	500	6 horas	H
	-45	500		R
	-45	500		H
Secado primario	-45	100	60 horas	H
	-35	100		R
	-35	100		H
	-30	100		R
	-30	100		H
	-20	100		R
	-20	100		H
	0	100		R
0	100	H		
Secado secundario	25	100	6 horas	R
	25	100		H

**Tabla 3**

Fase	Temperatura (°C)	Vacío (mTorr)	Tiempo	Rampa/Espera
Congelación	5	500	11 horas	H
	-45	500		R
	-45	500		H
Secado primario	-45	100	61 horas	H
	-35	100		R
	-35	100		H
	-30	100		R
	-30	100		H
	-20	100		R
	-20	100		H
	0	100		R
0	100	H		
Secado secundario	25	100	8 horas	R
	25	100		H

65

**Tabla 7**

Fase	Temperatura (°C)	Vacío (mTorr)	Tiempo	Rampa/Espera
Congelación	5	500	8 horas	H
	-45	500		R
	-45	500		H
Secado primario	-45	100	69 horas	H
	-35	100		R
	-35	100		H
	-30	100		R
	-30	100		H
	-20	100		R
	-20	100		H
	0	100		R
	0	100		H
	25	100		R
25	100	H		
Secado secundario	0	100	4 horas	

**Tabla 8**

Fase	Temperatura (°C)	Vacío (mTorr)	Tiempo	Rampa/Espera
Congelación	5	500	7 horas	H
	-45	500		R
	-45	500		H
Secado primario	-45	100	69 horas	H
	-20	100		R
	-20	100		H
	-10	100		R
	-10	100		H
	0	100		R
	0	100		H
	10	100		R
	10	100		H
	20	100		R
20	100	H		
Secado secundario	0	100	4 horas	

en donde tras la reconstitución las nanopartículas lipídicas tienen un tamaño de partícula medio de menos de 125nm en una solución PBS.

60 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde el lípido catiónico se selecciona del grupo que consiste de C12-200, ICE, DOTMA, DOGS, DOSPA, DODAP, DOTAP, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, DDAB, DMRIE, CLinDMA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, DLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, DLinKC2-DMA, HGT5000 ((15Z,8Z)-N,N-dimetil-6-(9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-15,18-dien-1-amina), HGT5001 ((15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-4,15,18-trien-1-amina), HGT5002 ((15Z,18Z)-N,N-dimetil-6-(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il)tetracosa-5,15,18-trien-1-amina), HGT4001 (5-

65

(((10,13-dimetil-17-(6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H- ciclo-penta[a]fenantren-3-il)disulfanil)metil)-1H-imidazol), HGT4002 (1-(2-(((3S,10R,13R)-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-ciclo-penta[a]fenantren-3-il)disulfanil)etil)guanidina), HGT4003 (2-((2,3-Bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)-N,N-dimetiletanamina), HGT4004 (5-(((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)metil)-1H-imidazol) y HGT4005 (1-(((2,3-bis((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-iloxi)propil)disulfanil)metil)guanidina).

3. Una composición farmacéuticamente estable que comprende una nanopartícula lipídica liofilizada, en donde la nanopartícula lipídica es un liposoma que encapsula un ARNm y comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido PEG-modificado y colesterol, en donde la composición farmacéutica estable comprende además uno o más lioprotectores, en donde el uno o más lioprotectores se seleccionan del grupo que consiste de sacarosa, trehalosa, dextrano e inulina y en donde, tras la reconstitución, las nanopartículas lipídicas tienen un tamaño de partícula medio de menos de 125 nm en una solución PBS, en donde la composición farmacéutica estable puede obtenerse por el método de la reivindicación 1 o 2.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde el ARNm está modificado para mejorar la estabilidad con respecto a la versión del tipo salvaje o de origen natural del ARNm y/o la versión del ARNm naturalmente endógeno para las células diana.
5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en donde tras la reconstitución las nanopartículas lipídicas tienen un Dv50 de menos de 100nm, 75nm, 50nm, 25nm o menos.
6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde tras la reconstitución las nanopartículas lipídicas tienen un Dv90 de menos de 200nm, 150nm, 125nm, 100nm, 75nm, 50nm, 25nm o menos.
7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en donde tras la reconstitución las nanopartículas lipídicas tienen un valor de índice de polidispersidad de menos de 1, 0,95, 0,9, 0,8, 0,75, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,25, 0,2, 0,1, 0,05 o menos.
8. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde tras la reconstitución las nanopartículas lipídicas tienen un tamaño de partícula medio de menos de 100nm, 75nm, 50nm, 25nm o menos en una solución PBS.
9. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en donde (i) el uno o más lípidos catiónicos se seleccionan del grupo que consiste de C12-200, DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio propano), DODAP (1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano), DOTMA (1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano), DLinDMA, DLinKC2-DMA, HGT4003, HGT5001, e ICE, y/o (ii) el uno o más lípidos PEG-modificados comprenden una cadena de poli(etileno)glicol de hasta 5kDa de longitud unida covalentemente a un lípido que comprende una o más cadenas de alquilo de C6-C20 de longitud.
10. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-9, en donde la nanopartícula lipídica comprende (i) C12-200, DOPE, colesterol y DMG-PEG-2000, o (ii) DLinKC2-DMA, DOPE, colesterol y DMG-PEG200.
11. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-10, en donde la composición farmacéutica comprende un lípido ionizable.
12. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-11, en donde el lipoprotector comprende un 10% de sacarosa.
13. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-12, en donde la composición es estable (i) durante por lo menos 1 mes o por lo menos 6 meses tras el almacenamiento a 4° C, o (ii) durante por lo menos 6 meses tras el almacenamiento a 25° C.
14. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-13, en donde la actividad biológica del ARNm excede el 75% de la actividad biológica observada antes de la liofilización de la composición.
15. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 3-14, en donde el ARNm codifica una proteína o una enzima, opcionalmente en donde la proteína o enzima se selecciona del grupo que consiste de regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), agalsidasa alfa, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-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, hialuronidasa y galactocerebrosidasa, ornitina transcarbamilasa (OTC), carbamoil-fosfato sintetasa 1 (CPS1), argininosuccinato sintetasa (ASS1), argininosuccinato liasa (ASL) y arginasa 1 (ARG1).

5 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de atrofia muscular espinal (AME) relacionada con SMN1; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); galactosemia  
relacionada con GALT; fibrosis quística (CF); trastornos relacionados con SLC3A1, incluyendo cistinuria; trastornos  
10 relacionados con COL4A5 incluyendo el síndrome de Alport; deficiencias de galactocerebrosidasa;  
adrenoleucodistrofia y adrenomieloneuropatía ligadas al cromosoma X; enfermedad de Huntington; enfermedad de  
Parkinson; distrofias musculares (como, por ejemplo, Duchenne y Becker); enfermedades de hemofilia como, por  
ejemplo, hemofilia B (FIX) y hemofilia A (FVIII); ataxia de Friedreich; enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher;  
esclerosis tuberosa relacionada con TSC1 y TSC2; síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB); cistinosis relacionada con  
15 CTNS; 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; las enfermedades relacionadas  
con lipofuscinosis ceroides neuronales, incluyendo la lipofuscinosis ceroidea neuronal juvenil (JNCL), la enfermedad  
de Batten juvenil, la enfermedad de Santavuori-Haltia, la enfermedad de Jansky-Bielschowsky y deficiencias de PTT-  
20 1 y TPP1; ataxia infantil relacionada con EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 y EIF2B5 con  
hipomielinización/desaparición de sustancia blanca del sistema nervioso central; ataxia episódica tipo 2 relacionada  
con CACNA1A y CACNB4; los trastornos relacionados con MECP2, incluyendo síndrome de Rett clásico,  
encefalopatía neonatal grave relacionada con MECP2 y el síndrome PPM-X; síndrome de Rett atípico relacionado  
con CDKL5; enfermedad de Kennedy (SBMA); arteriopatía cerebral autosómica dominante relacionada con Notch-3  
25 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 deleciones de ADN mitocondrial; hipoplasia suprarrenal ligada a X;  
agammaglobulinemia ligada a X; enfermedad de Wilson; y enfermedad de Fabry.

25 17. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la composición se  
implanta en un sujeto.

30 18. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde tras la reconstitución la  
composición se administra a un sujeto por una o más de las vías de administración siguientes: intravenosa, oral,  
rectal, vaginal, transmucosal, sublingual, subdural, nasal, intramuscular, subcutánea, inyección intramedular,  
intratecal, intraventricular, intraperitoneal, intranasal, oftálmica e intraocular.

35

40

45

50

55

60

65

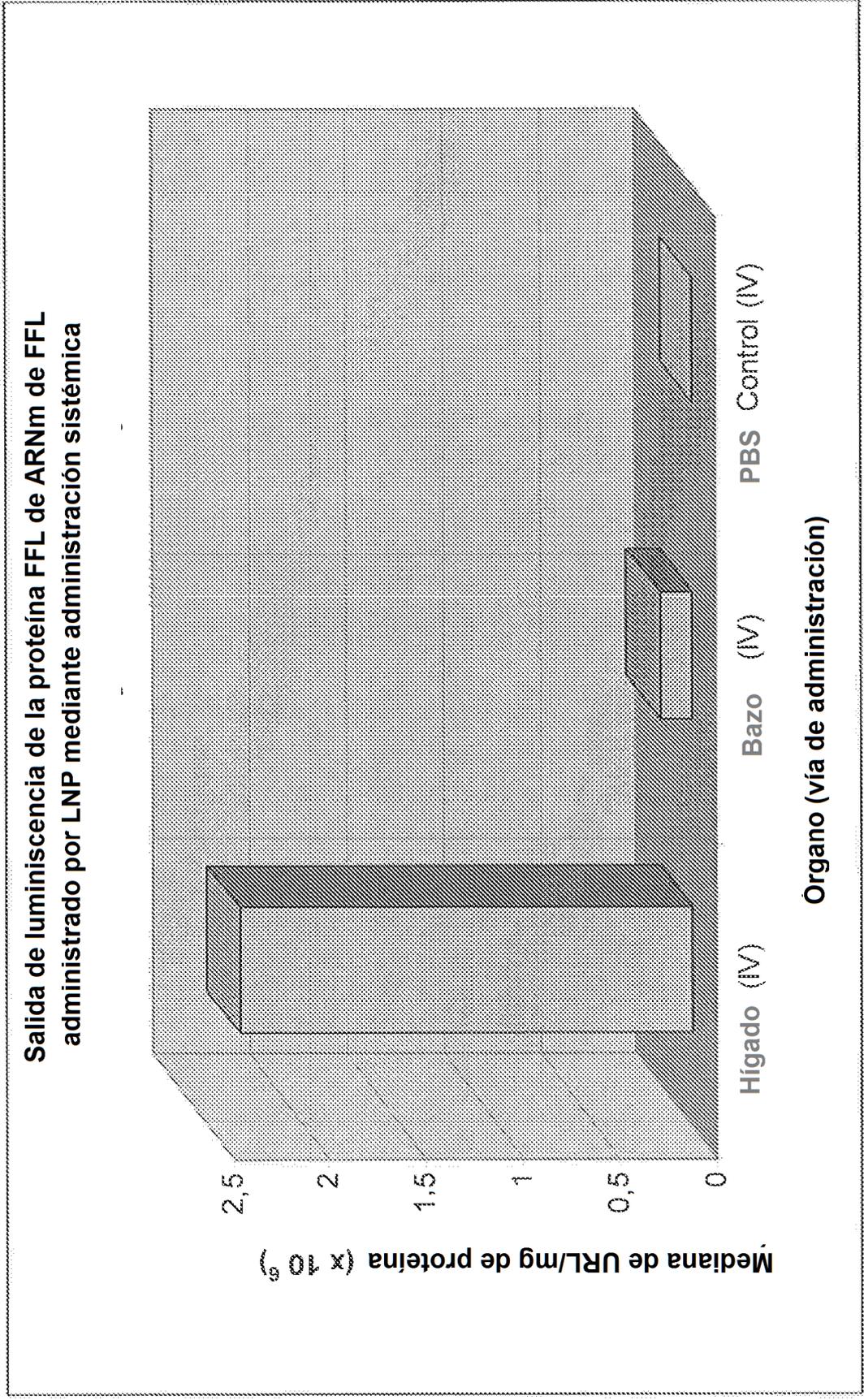


FIG.1

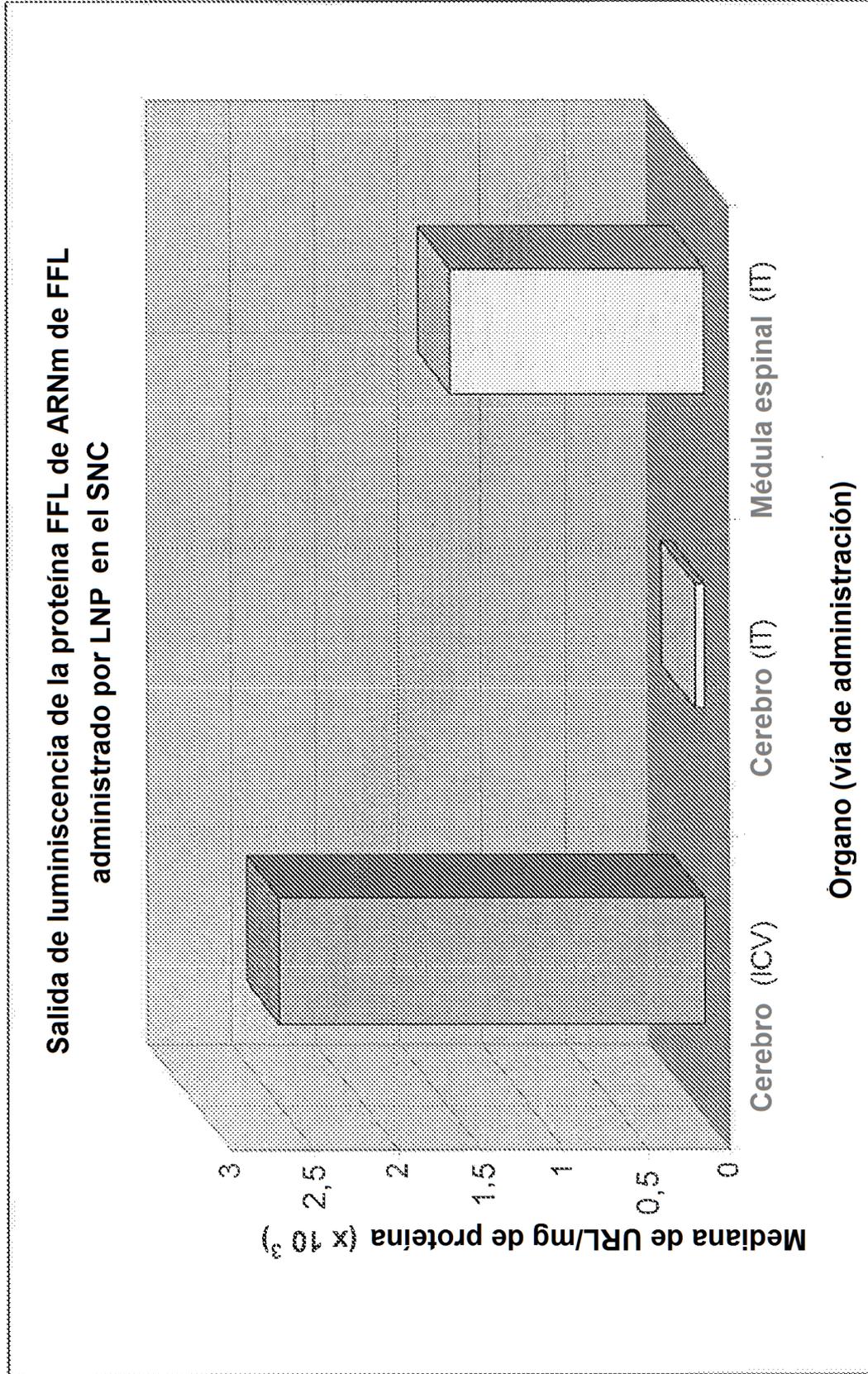


FIG. 2